



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou
interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão
umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado**

Nádia de Cássia Noronha

**Ribeirão Preto
2021**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientado(a): Nádia de Cássia Noronha

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Co-orientador(a): Prof^a. Dr^a. Kamilla Swiech

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 21/12/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2021

NORONHA,
N.C.

“ Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado”

Espaço de 2,5
cm reservado
para etiqueta de
localização da
biblioteca

DOUTORADO
FCFRPUSP
2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Noronha, Nádia de Cássia

“Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado”. Ribeirão Preto, 2021. 136 p.: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador (a): Malmegrim de Farias, Kelen Cristina Ribeiro

Co-orientador(a): Swiech, Kamilla

1. células estromais mesenquimais; 2. biorreator; 3. microcarregador; 4. hipóxia; 5. IL-17; 6. potencial angiogênico; 7. potencial imunossupressor

FOLHA DE APROVAÇÃO

NORONHA, Nádia de Cássia

Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a minha amada mãe Fátima, pelo amor incondicional e por ser referência de luta, força e resiliência, e à minha querida e saudosa avó Lady (*in memoriam*), exemplo de trabalho e fé inabalável.

Agradecimentos especiais

À Profa. Dra. Kelen Malmegrim, orientadora e amiga, pela oportunidade, acolhimento e confiança, por todo aprendizado, apoio, estímulo e respeito.

À Profa. Dra. Kamilla Swiech, pela co-orientação, confiança e apoio neste projeto, pela oportunidade de todo aprendizado e discussões.

À Dra. Amanda Mizukami, mentora, por todo cuidado e carinho, atenção, ensinamentos, discussões e paciência.

À minha amada família, meus pais, José Carlos Noronha e Aparecida de Fátima Gouvêa Noronha, e minha querida irmã, Daniele C. Noronha, por todo amor, apoio, incentivo, encorajamento, luta. Meu alicerce, base de tudo o que eu sou e real motivo de todo meu esforço.

À toda minha grande família, em especial minha avó Djanira Cancian Gouvêa, e tias queridas, Ana Lúcia, Elivane e Antônia, que sempre me ajudaram em momentos difíceis desde o início dessa jornada.

Ao meu amado marido, Matheus Corrêa, pelo amor de todos esses anos, carinho, dedicação, companheirismo e apoio, pelos sonhos compartilhados, pelo amor com a minha família, por ser exatamente como é.

Agradecimentos

Às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP, que viabilizaram este estudo.

À Dra. Maristela Delgado Orellana do Laboratório de Terapia Celular (FUNDHERP), pela contribuição e parceria de sempre.

Ao laboratório de Citometria de Fluxo (FUNDHERP), Patrícia, Rita, e especialmente à Camila, pela amizade, aprendizado e todas as contribuições que foram essenciais para este trabalho.

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino (coordenadora do Lab. de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer FCFRP-USP), pela colaboração com as análises de autofagia, por toda boa vontade e atenção.

À Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro (coordenadora do Lab. de Hematologia FCFRP-USP), pela colaboração e apoio todos esses anos.

À Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues (coordenadora do Lab. de Imunologia Celular FMRP-USP), pela colaboração, trocas de ideias e discussões enriquecedoras durante nossas reuniões semanais do grupo de pesquisa.

Aos técnicos Luciana Ambrósio do Lab. de Hematologia FCFRP-USP e Luiz Fernando Chaim do Lab. de Terapia Celular FCFRP-USP, por toda eficiência e ajuda especialmente nessa etapa final.

Aos amigos do laboratório de Cultura Celular (FUNDHERP), onde desenvolvi todo o projeto e se tornou minha segunda casa, Mário Abreu, Rafael Biaggio e Tárík Heluy.

Aos amigos do grupo de pesquisa e que passaram pelo grupo, Lucas, Waldir, Rafaela, Maynara, Djúlio, João, Júlia e Renata, pela amizade, momentos alegres e incontáveis ensinamentos. Em especial Natália C. Dias dos Santos e Juçara Cominal, pela amizade e por todos ensinamentos compartilhados na bancada.

A todo grupo de funcionários do Hemocentro, em especial aos funcionários da manutenção e limpeza, que mantêm tudo funcionando e assim possibilitam nosso trabalho.

Aos meus queridos professores e educadores, em especial ao Prof. Rubens, Prof. Luís Paulo, Profa. Silvânia, Profa. Carina e Prof. Ailton, que plantaram a semente do amor pelos estudos e pela ciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“Não consigo conceber um Deus pessoal que tenha influência direta nas ações dos indivíduos ou que julgue as criaturas da sua própria criação. Minha religiosidade consiste numa humilde admiração pelo espírito infinitamente superior que se revela no pouco que conseguimos compreender sobre o mundo passível de ser conhecido. Essa convicção profundamente emocional da presença de um poder superior racional, que se revela nesse universo incompreensível forma a minha ideia de Deus”

Albert Einstein

RESUMO

NORONHA, N. C. **Efeitos do pré-condicionamento com hipóxia e/ou interleucina-17 em células estromais mesenquimais de cordão umbilical cultivadas em biorreator de tanque agitado**. 2021. 136f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

As células estromais mesenquimais (MSC) têm sido usadas no tratamento de uma variedade de doenças devido ao seu notável potencial regenerativo, imunossupressor e imunomodulador. No entanto, muitos estudos clínicos revelaram resultados limitados, que têm levado pesquisadores à busca de estratégias que melhorem a eficácia terapêutica dessas células. É importante ressaltar que a aplicação clínica de MSC requer a implementação de bioprocessos de expansão celular escalonáveis combinados com condições de cultivo isentas de xenoantígenos. O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar e avaliar funcionalmente células estromais mesenquimais de cordão umbilical (UC-MSC) expandidas em biorreator de tanque agitado, sob condições livre de xenoantígenos, pré-condicionadas ou não com hipóxia e/ou interleucina-17 (IL-17). Primeiramente, foi estabelecido um protocolo de expansão de UC-MSC em sistema de cultivo 3D, escalonável e livre de xenoantígenos, podendo ser concomitantemente pré-condicionadas. Os resultados demonstraram UC-MSC expandem eficientemente por cinco dias em sistema 3D agitado em condições de normóxia ou hipóxia usando microcarregadores revestidos de colágeno humano e meio suplementado com soro AB humano. UC-MSC expandidas em sistema de cultivo 3D agitado e condição de hipóxia mantiveram o imunofenótipo, potencial de diferenciação e potencial imunossupressor *in vitro* característicos de MSC, comparadas às condições controles. Notavelmente, esta condição de cultivo aumentou significativamente as propriedades angiogênicas *in vitro* das UC-MSC. Em seguida, os efeitos dos pré-condicionamentos das UC-MSC com IL-17 combinado ou não com hipóxia foi avaliado. UC-MSC pré-condicionadas com IL-17 e hipóxia apresentaram maior capacidade imunossupressora *in vitro*, comparadas às outras condições, porém sem diferença estatística. O pré-condicionamento das UC-MSC com IL-17 em condição de normóxia aumentou significativamente a secreção de CD147, molécula com funções imunossupressoras. O secretoma das UC-MSC expandidas em sistema de cultivo 3D agitado e pré-condicionadas em condições de hipóxia apresentou grande número de proteínas pró-angiogênicas, anti-angiogênicas, citocinas pró-inflamatórias e pró-inflamatórias, fatores de crescimento, dentre outras. Por outro lado, o secretoma das UC-MSC expandidas da mesma forma, porém pré-condicionadas com IL-17/normóxia e IL-17/hipóxia apresentou uma significativa diminuição do número e/ou concentração de proteínas bioativas secretadas. Por fim, os resultados mostraram que UC-MSC expandidas em sistema de cultivo 3D em biorreator de tanque agitado, independente do pré-condicionamento, apresentam concomitantemente “assinatura angiogênica” pela secreção de VEGF e TGF- β e “assinatura imunossupressora” pela secreção de PGE-2 e IDO, evidenciadas também pelos ensaios funcionais de angiogênese e inibição da proliferação de linfócitos, respectivamente.

Palavras-chave: células estromais mesenquimais; biorreator; microcarregador; hipóxia; IL-17; potencial angiogênico; potencial imunossupressor.

ABSTRACT

NORONHA, N. C. **Effects of preconditioning with hypoxia and/or interleukin-17 on umbilical cord mesenchymal stromal cells cultured in stirred tank bioreactor.** 2021. 136p. Thesis (Doctorate). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Mesenchymal stromal cells (MSC) have been used in the treatment of a variety of diseases due to their remarkable regenerative, immunosuppressive, and immunomodulatory potential. However, many clinical studies have revealed limited results, which have led researchers to search for strategies to improve their therapeutic efficacy. Importantly, the clinical application of MSC requires the implementation of scalable cell expansion bioprocesses combined with xenoantigen-free culture conditions. The general objective of this work was to characterize and functionally evaluate umbilical cord mesenchymal stromal cells (UC-MSC) expanded in a stirred tank bioreactor, under xenoantigen-free conditions, preconditioned or not with hypoxia and/or interleukin-17 (IL-17). Firstly, a UC-MSC expansion protocol was established in a scalable, xenoantigen-free, agitated 3D culture system, in which cells can be preconditioned at the same time. The results demonstrated that UC-MSC efficiently expands for five days in a stirred 3D culture system under conditions of normoxia or hypoxia using microcarriers coated with human collagen and medium supplemented with human AB serum. Expanded UC-MSC in a stirred 3D culture system, under hypoxia condition, maintained the immunophenotype, differentiation potential and *in vitro* immunosuppressive potential characteristic of MSC, compared to control conditions. Notably, this culture condition significantly increased the *in vitro* angiogenic properties of UC-MSC. Next, the effects of UC-MSC preconditioning with IL-17 combined or not with hypoxia was evaluated. UC-MSC preconditioned with IL-17 and hypoxia showed greater *in vitro* immunosuppressive capacity, compared to other conditions, but without statistical differences. The preconditioning of UC-MSC with IL-17 under normoxia significantly increased the secretion of CD147, a molecule with immunosuppressive functions. The secretome of UC-MSC expanded in stirred 3D culture system and preconditioned under hypoxic conditions presented a large number of pro-angiogenic, anti-angiogenic, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, growth factors, among others. On the other hand, the secretome of UC-MSC expanded in the same way but preconditioned with IL-17/normoxia and IL-17/hypoxia presented a significant decrease in the number and/or concentration of secreted bioactive proteins. Finally, our results showed that UC-MSC expanded in stirred 3D culture system, independent of preconditioning, presented concomitantly "angiogenic signature" by the secretion of VEGF and TGF- β and "immunosuppressive signature" by the secretion of PGE-2 and IDO, also evidenced by functional assays of angiogenesis and inhibition of lymphocyte proliferation, respectively.

Keywords: mesenchymal stromal cells; bioreactor; microcarriers; hypoxia; IL-17; angiogenic potential; immunosuppressive potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das abordagens de pré condicionamento/ priming de MSC mais utilizadas.....	34
Figura 2. Delineamento experimental.....	39
Figura 3. Perfil de crescimento das UC-MSC com o microcarregador SphereCol em condições livre de xenoantígenos.....	39
Figura 4. Expansão de UC-MSC em biorreator de tanque agitado pré-condicionadas ou não à hipóxia em condições livres de xenoantígenos.....	39
Figura 5. Imagens de UC-MSC cultivadas sob hipóxia com o microcarregador SphereCol em biorreator de tanque agitado após a coloração com DAPI.....	39
Figura 6. Imagens representativas das UC-MSC cultivadas em biorreator após coloração com o corante FDA.....	39
Figura 7. Recuperação celular das UC-MSC pós-cultivo em microcarregadores em biorreator de tanque agitado.....	39
Figura 8. Análise metabólica das UC-MSC expandidas em biorreator em condições livre de xenoantígeno em normóxia (DO 20%) e hipóxia (DO 5%) em 5 dias de cultivo.....	39
Figura 9. Perfil imunofenotípico das UC-MSC pré e pós-expansão e pré-condicionamento em biorreator de tanque agitado.....	39
Figura 10. Análise de multipotencialidade de UC-MSC previamente expandidas em biorreator em condição de hipóxia.....	39
Figura 11. Ensaio de migração de HUVEC tratadas com meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator sob hipóxia.....	39
Figura 12. Imagens representativas do ensaio de potencial indutor da migração de HUVEC.....	39
Figura 13. Efeito do meio condicionado de UC-MSC expandidas/pré-condicionadas em biorreator na migração de HUVEC.....	39
Figura 14. Dinâmica do ensaio do potencial angiogênico do meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator em condições de hipóxia.....	39
Figura 15. Imagens representativas de ensaio de potencial angiogênico do meio condicionado de UC-MSC expandidas em biorreator em condições de normóxia ou hipóxia.....	39
Figura 16. Potencial angiogênico dos meios condicionados de UC-MSC expandidas em biorreator em condições de normóxia ou hipóxia.....	39
Figura 17. Potencial angiogênico de UC-MSC.....	39
Figura 18. Histogramas representativos das análises de citometria de fluxo da inibição da proliferação de linfócitos T.....	39
Figura 19. Potencial de inibição da proliferação de linfócitos por UC-MSC cultivadas em biorreator.....	39
Figura 20. Expansão de UC-MSC em biorreator de tanque agitado e pré-condicionamento com Interleucina-17 em normóxia ou hipóxia.....	39
Figura 21. Imagens representativas das UC-MSC pré-condicionadas com IL-17 e hipóxia (<i>priming</i> combinado) em biorreator de tanque agitado após coloração com o corante FDA.....	39
Figura 22. Análise metabólica das UC-MSC expandidas em biorreator de tanque agitado em normóxia (DO 20%) ou hipóxia (DO 5%) e condicionadas com IL-17.....	39

Figura 23. Análise de multipotencialidade de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	39
Figura 24. Efeito do meio condicionado de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17, na migração de HUVEC.	39
Figura 25. Potencial angiogênico do meio condicionado de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	39
Figura 26. Potencial de inibição da proliferação de linfócitos de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	39
Figura 27. Perfil de expressão de proteínas relacionadas a angiogênese no secretoma de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17	39
Figura 28. Perfil de proteínas angiogênicos no secretoma de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17	39
Figura 29. Perfil de citocinas no secretoma de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	39
Figura 30. Perfil de citocinas no secretoma de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	39
Figura 31. Concentração de PGE-2, IDO, TGF-β e VEGF no secretoma de UC-MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	39
Figura 32. Análise do processo autofágico em UC-MSC cultivadas em biorreator em normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil imunofenotípico de UC-MSC pré e pós-cultivo em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17.....	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS1	metalopectidase com motivo 1 de trombospondina 1
AKT	proteína quinase B
AMPK	proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANG	angiogenina
ANGPT1	angiopoetina tipo 1
ATG	<i>AuTophagy related Genes</i> , genes relacionados com a autofagia
Beclin-	proteína espiralada semelhante a miosina que interage com Bcl2
CCL e CXCL	quimiocinas ligantes de motivos C-C e C-X-C
CCR e CXCR	receptores de quimiocinas
BPM	Boas Práticas de Manufatura
CD	grupamento de diferenciação
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHI3-L1	proteína 1 semelhante a quitinase-3
DAMPs	padrões moleculares associados à dano
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
EBM	meio basal para células endoteliais
EGF	fator de crescimento epidermal
EGM	meio de crescimento para células endoteliais
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK1/2	quinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares
Fas e FasL	antígeno indutor de apoptose tipo 1 e seu ligante
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
FOXO3	fator de transcrição " <i>forkhead box</i> " tipo 3
FOXP3	fator de transcrição " <i>forkhead box</i> " tipo P3
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
G-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos
GDF-15	fator de crescimento e diferenciação celular 15
GDNF	fator neurotrófico derivado de células gliais
HB-EGF	fator de crescimento semelhante ao EGF ligante de heparina
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
HLA	human leukocyte antigen
HO-1	heme oxigenase tipo 1
HUVEC	células endoteliais extraídas de cordão umbilical humano
ICAM	molécula de adesão inter-celular
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN- γ	Interferon gamma
IGF-1	fator de crescimento do tipo 1 semelhante à insulina
IGFBP	proteína de ligação à IGF-1
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
JAK-1	janus quinase 1
LC3B-I e -II	cadeia leve 3 associada a microtúbulos subunidade 1 e 2
LIF	fator inibidor de leucemias
MAPK	quinase ativada por mitógenos
MC	meio condicionado
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos tipo 1

MHC	major histocompatibility complex
M-CSF	fator estimulador de colônias de macrófagos
MIF	fator inibidor da migração de macrófagos
MMP	metaloproteinase de matriz
MSC	células mesenquimais estromais multipotentes
mTOR	proteína alvo da rapamicina
NFκB	factor nuclear kappa B
NK	células assassinas naturais
NO	óxido nítrico
PAMP	padrões moleculares associados à patógenos
PBMC	células mononucleares de sangue periférico
PBS	tampão fostato salino
PD-1/L1	receptor de morte celular programada tipo 1 e seu ligante
PDGF/R	fator de crescimento derivado de plaquetas e seu receptor
PGE2	prostaglandina E-2
PHA	fitohemaglutinina
PI3KC3	subunidade catalítica tipo 3 da fosfatidilinositol quinase 3
PIGF	fator de crescimento placentário
PK1	piruvato quinase 1
PVDF	membrana de fluoreto de polivinilideno
ROS	espécies reativas de oxigênio
RPMI	meio <i>roswell park memorial institute</i>
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
SEM	erro padrão da média
SFB	soro fetal bovino
SHBG	globulina ligadora de hormônios sexuais
SOD	superóxido dismutase
STAT3	proteína 3 de ativação dos transdutores de sinal para o núcleo
TBS/T	salina tamponada com tris e polissorbato 20
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
Th1, Th2 e Treg	linfócitos auxiliares responsáveis pelos padrões de respostas tipo 1, linfócito T regulador
TIMPS	inibidores de metaloproteinases de matriz
TNF-α	fator de necrose tumoral α
TSG-6	gene 6 estimulado por TNF- α

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Células Estromais Mesenquimais Multipotentes.....	21
1.2. Mecanismos imunomoduladores das MSC.....	23
1.3. Mecanismos angiogênicos das MSC.....	28
1.4. MSC humanas de cordão umbilical.....	29
1.5. Autofagia e MSC.....	30
1.6. Pré-condicionamento ou “priming” de MSC.....	32
1.7. Expansão de MSC em biorreatores.....	37
2. HIPÓTESE, JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	39
3. OBJETIVOS.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1. Delineamento experimental.....	39
4.2. Isolamento, cultura e caracterização das UC-MS.....	39
4.2.1. Produção de soro AB.....	39
4.2.2. Isolamento e expansão das UC-MS.....	39
4.2.3. Definição das condições para expansão com o microcarregador SphereCol em frasco Spinner.....	39
4.2.4. Expansão em biorreator de tanque agitado com Sphere-Col.....	39
4.2.5. Pré-condicionamento ou “priming” das UC-MS em condição de hipóxia.....	39
4.2.6. Pré-condicionamento ou “priming” das UC-MS com IL-17.....	39
4.2.7. Recuperação celular (Harvest).....	39
4.2.8. Coloração com DAPI e FDA.....	39
4.2.9. Imunofenotipagem das UC-MS.....	39
4.2.10. Ensaio de diferenciação.....	39
4.2.11. Análise metabólica.....	39
4.3. Ensaio funcional in vitro.....	39

4.3.1. Ensaio de potencial parácrino a partir do meio condicionado na migração de células HUVEC	39
4.3.2. Ensaio de avaliação de potencial angiogênico parácrino a partir de meio condicionado	39
4.3.3. Ensaio de imunossupressão da proliferação de células T	39
4.4. Proteome Array	39
4.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	39
4.6. Análise do marcador de autofagia LC3B	39
4.7. Análises estatísticas	39
5. RESULTADOS	39
5.1. PARTE I	39
5.1.1 Padronização da expansão das UC-MSc ancoradas a microcarregadores em biorreator de tanque agitado	39
5.1.2. Cultivo em biorreator de tanque agitado e pré-condicionamento com hipóxia	39
5.1.3. Caracterização do perfil imunofenotípico e do potencial de multidifeciação de UC-MSc expandidas e pré-condicionadas em hipóxia em biorreator de tanque agitado	39
5.1.4 Ensaio funcionais in vitro	39
5.1.4.1 Potencial angiogênico	39
5.1.4.2. Avaliação das propriedades imunossupressoras das UC-MSc	39
5.2. PARTE II	39
5.2.1. Pré-condicionamento de UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em normóxia ou hipóxia com IL-17	39
5.2.2. Caracterização das UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia e pré-condicionadas com IL-17	39
5.2.3. Potencial angiogênico de UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia e pré-condicionadas com IL-17	39
5.2.4. Propriedade imunossupressora de UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia e pré-condicionadas com IL-17	39
5.2.5. Análise do secretoma das UC-MSc expandidas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17	39
5.2.6. Análise do processo autofágico de UC-MSc cultivadas em biorreator de tanque agitado em condição de normóxia ou hipóxia, pré-condicionadas ou não com IL-17	39
6. DISCUSSÃO	39
Parte I. Estratégia de pré-condicionamento de cultivo 3D em Hipóxia	39
Parte II. Estratégia de pré-condicionamento de cultivo 3D em hipóxia e/ou IL-17.	39
7. RESUMO DOS RESULTADOS	39
8. CONCLUSÃO	40

9. PUBLICAÇÕES RELACIONADAS A TESE DE DOUTORADO	41
10. REFERÊNCIAS.....	42
10. ANEXOS	58
10.1. Anexo I.....	58
10.2. Anexo II.....	59
10.3. Anexo III.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células Estromais Mesenquimais Multipotentes

As células estromais mesenquimais (MSC, do inglês “mesenchymal stromal cells”) constituem uma população heterogênea de células progenitoras multipotentes com propriedades imunomoduladoras e regenerativas. Essas células foram originalmente isoladas a partir da medula óssea de roedores como uma população de células aderentes com morfologia fibroblastoide, identificadas como células precursoras osteogênicas e posteriormente como componentes essenciais na manutenção do nicho de células-tronco hematopoéticas (Friedenstein *et al.*, 1970; Owen and Friedenstein, 1988). Atualmente, sabe-se que essas células se encontram no estroma de todos os tecidos adultos, possivelmente com localização perivascular, e contribuem fundamentalmente em processos de homeostase, regeneração e reparo tecidual (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010; Le Blanc and Mougiakakos, 2012; Frenette *et al.*, 2013; Anthony and Link, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Devido a sua capacidade de aderência ao plástico (poliestireno, superfície: TC (*Tissue Culture*) padrão para células aderentes), as MSC podem ser facilmente isoladas e expandidas a partir de uma variedade de tecidos além da medula óssea, como tecido adiposo, polpa dentária e tecidos fetais como cordão umbilical, sangue de cordão umbilical, placenta apesar de sua baixa frequência (Le Blanc and Mougiakakos, 2012). Na medula óssea, sua frequência é estimada em cerca 0,001%-0,01%, por exemplo. As MSC apresentam multipotencialidade, ou seja, capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares especialmente da linhagem mesodérmica, sob condições de cultivo definidas *in vitro* e *in vivo* de maneira mais limitada do que se acreditava inicialmente. Embora tenham características morfológicas e imunofenotípicas, populações de MSC isoladas de diferentes tecidos apresentam diferentes graus de plasticidade e de autorrenovação (Parekkadan and Milwid, 2010; Bernardo and Fibbe, 2013).

Devido à heterogeneidade dessas populações, diante das diferentes fontes, doadores e protocolos de cultivo, e a falta de marcadores específicos, critérios mínimos de definição a fim da caracterização mais uniforme dessas células foram estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Gênica e Celular (Dominici *et*

al., 2006). Além da capacidade de aderência ao plástico e do potencial de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, essas células devem apresentar expressão dos marcadores de superfície CD90, CD73 e CD105, e ausência ou baixa expressão de marcadores das linhagens hematopoética e endotelial, CD34, CD45, CD14 ou CD11b e CD31, e HLA-DR (Le Blanc and Mougiakakos, 2012). As MSC também expressam baixos níveis de MHC de classe I e não expressam MHC de classe II e moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD86) em condições de homeostase, e foram anteriormente consideradas hipoinmunogênicas. No entanto, estudos clínicos mais recentes avaliando o perfil imunológico de pacientes submetidos ao transplante com MSC, já descreveram a geração de aloanticorpos, no entanto, sem correlação com a segurança, sendo consideradas relativamente seguras para transplantes alogênicos (Torre *et al.*, 2021). As MSC têm ainda mecanismos de evasão imunológica importantes no contexto de transplante alogênico, como a capacidade em suprimir ativação de células T e a maturação de células apresentadoras de antígenos (APC) (Ankrum *et al.*, 2014; Klimczak and Kozłowska, 2016).

Apesar da diversidade dessas populações, existe um consenso de que essas células compartilham propriedades imunomoduladoras, regenerativas, anti-apoptóticas, anti-fibróticas e angiogênicas (Le Blanc and Davies, 2018). Assim, nos últimos anos, as MSC têm sido extensivamente estudadas acerca do seu potencial terapêutico para uma variedade de doenças imunológicas, inflamatórias e degenerativas, como esclerose múltipla, doença do enxerto contra hospedeiro, doença de Crohn, condições cardiovasculares, como infarto do miocárdio e isquemia.

As propriedades das MSC são mediadas tanto por contato célula-célula, mecanismo importante para o efeito anti-apoptótico e modulação da matriz extracelular, como pelo efeito parácrino através do seu secretoma, que inclui uma variedade de fatores solúveis, como fatores de crescimento e citocinas, além de microvesículas extracelulares envolvidas na transferência de proteínas/peptídeos, mRNA e miRNAs para células-alvo. Dessa forma, as MSC podem ser consideradas o próprio “produto”, no contexto de transplantes alogênicos e autólogos, ou uma “biofábrica” de vesículas/ exossomos e moléculas bioativas (Galipeau *et al.*, 2016; Konala *et al.*, 2016; Marote *et al.*, 2016).

Atualmente, acredita-se que os efeitos terapêuticos das MSC são mediados principalmente pelo seu secretoma, uma vez que em resposta a uma combinação de

moléculas presentes no microambiente inflamado, essas células sofrem um processo de ativação ou “licenciamento” adquirindo um fenótipo anti-inflamatório e produzem grandes quantidades de fatores imunomoduladores, fatores de crescimento e quimioatraentes específicos (Wang *et al.*, 2014), sendo capazes de modular significativamente células imunes inatas e adaptativas (Cagliani *et al.*, 2017).

1.2. Mecanismos imunomoduladores das MSC

Embora ainda não esteja totalmente claro sobre quais fatores desencadeiam e determinam a heterogeneidade dos mecanismos envolvidos, várias moléculas têm sido implicadas nos processos de imunomodulação e regeneração mediados pelas MSC, tais como indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), fator derivado de estroma-1 (SDF-1), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento de hepatócito (HGF), prostaglandina E-2 (PGE-2), hemoxigenase-1 (HO), fator inibidor de leucemia (LIF), antígeno leucocitário humano-G (HLA-G), proteína do gene 6 estimulada por TNF (TSG-6), entre outras diversas citocinas/quimiocinas, como IL-8, quimioatraente importante de neutrófilos e CCL2, para monócitos, entre outras (Najar *et al.*, 2016; Cagliani *et al.*, 2017; Chinnadurai *et al.*, 2018).

Assim, as MSC também são capazes de modular o microambiente por induzir células imunes a secretar fatores anti-inflamatórios ou expressarem moléculas de superfície com propriedades imunossupressoras, como PD-L1 e FasL. A secreção de fatores, especialmente TGF- β e PGE-2, pelas MSC induz a diferenciação e expansão de subpopulações de fenótipo imunorregulador, tais como subpopulações de células T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ e CD8⁺CD28⁻ T, células B reguladoras, células dendríticas e macrófagos M2, produtoras de IL-10 (Bouchlaka *et al.*, 2017), levando a um estado tolerogênico, ou seja, não-reatividade imunológica. As MSC ainda são capazes de influenciar a diferenciação Th1, Th2 e Th17 (Algeri *et al.*, 2015; Najar *et al.*, 2016; Markov *et al.*, 2021; Qian *et al.*, 2021).

Após estímulo inflamatório, especialmente por IFN- γ , MSC humanas expressam altos níveis da enzima indoleamina-2,3-dioxygenase (IDO), uma molécula chave na supressão de células T através da depleção do aminoácido essencial triptofano e geração de metabólitos pela via quinurenina, gerando uma resposta de

estresse via quinase GCN2 que induz parada no ciclo celular e apoptose (Munn *et al.*, 2005; Munn and Mellor, 2013; Chinnadurai *et al.*, 2014). Além disso, a ativação da via GCN2 a partir de IDO em células T CD4+CD25- naive induz expressão de Foxp3 de maneira dependente de TGF- β (Fallarino *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009). Diversos trabalhos identificaram a atividade enzimática de IDO como um dos principais mecanismos imunossupressores em MSC humanas (Shi *et al.*, 2018; Burnham *et al.*, 2020), e tem sido sugerido que a variabilidade das MSC de diferentes doadores quanto à capacidade de supressão de células T está correlacionado ao nível de expressão de IDO. Além disso, IDO expressa por MSC também é capaz de influenciar a diferenciação de monócitos em macrófagos imunossupressores M2 produtores de IL-10 (Francois *et al.*, 2012). A partir de IDO e PGE-2, MSC suprimem a ativação de células NK, inibindo a expressão dos receptores de ativação NKp30, NKp44 e NKG2D na superfície dessas células, assim como inibe suas funções efetoras, como produção de citocinas e atividade citotóxica (Spaggiari *et al.*, 2008).

Rovira e colaboradores (2016) demonstraram que a indução de expressão de IDO em MSC humanas após licenciamento com citocinas *in vitro* está correlacionado com o aumento da acetilação de H3K9 (histona H3 lisina 9) no promotor IDO1, demonstrando o envolvimento com remodelação da cromatina. Curiosamente, essas alterações foram mantidas após criopreservação, e após uma reexposição com citocinas as MSC foram capazes de acumular altos níveis de mRNA de IDO em curto período de tempo (Rovira Gonzalez *et al.*, 2016). Bottcher e colaboradores demonstraram que a depleção de triptofano induzida por IDO perturba a sinalização por mTOR, diminuindo glicólise, promovendo autofagia e induzindo a geração de células T de memória (Bottcher *et al.*, 2016). Por outro lado, MSC murinas induzem supressão principalmente pela expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando à produção de grandes quantidades de óxido nítrico, envolvido na supressão da fosforilação de STAT5 e proliferação de células T. A expressão de iNOS também ocorre em resposta ao estímulo inflamatório pela combinação dos fatores TNF- α , IL-1(α ou kg2d) ou IFN- γ (Ren *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2012).

Diversos estudos demonstraram que MSC administradas por infusão intravenosa são aprisionadas na microvasculatura pulmonar e sofrem apoptose rapidamente. No entanto, torna-se cada vez mais evidente que este processo de *clearance* das MSC apoptóticas modula respostas imunes e é importante para seus efeitos terapêuticos (De Witte *et al.*, 2018; Preda *et al.*, 2021). Witte e colaboradores

(2018) demonstraram que UC-MSC administradas por via intravenosa em camundongos foram rapidamente fagocitadas por macrófagos que adquirem fenótipo anti-inflamatório (De Witte *et al.*, 2018).

Em estudo realizado com modelo murino de doença do enxerto *versus* hospedeiro (do inglês, *graft-versus-host disease*, *GvHD*) foi demonstrado que após infusão, as MSC sofrem apoptose por células citotóxicas e são eferocitadas por fagócitos, que são então induzidos a produzirIDO. Pacientes com GvHD que apresentavam alta atividade citotóxica contra MSC responderam mais efetivamente à infusão, demonstrando ser este um mecanismo fundamental para imunossupressão induzida por MSC (Galleu *et al.*, 2017). Monócitos cultivados com MSC apoptóticas efetivamente foram capazes de inibir a proliferação de células T após estímulo CD3/CD28. O efeito imunossupressor foi relacionado com aumento da expressão deIDO, PGE-2 e IL-10. A inibição de COX-2 nos monócitos, mediador chave na síntese de PGE-2, não interferiu na eferocitose das MSC apoptóticas, no entanto, foi suficiente para prevenir a indução deIDO, PD-L1 e IL-10, reduzindo significativamente a atividade imunossupressora desses monócitos sobre células T. Pacientes com GvHD que apresentaram melhor resposta clínica também apresentaram maiores níveis plasmáticos de PGE-2 (Cheung *et al.*, 2019).

Assim comoIDO, a síntese de PGE-2 também é induzida nas MSC após estímulos inflamatórios, tais como com as citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α . PGE-2 é um mediador lipídico derivado do ácido araquidônico que tem sua síntese regulada por ciclooxigenases e possui potentes propriedades imunomoduladoras (Burnham *et al.*, 2020). Muitos estudos têm demonstrado que o potencial terapêutico de MSC é dependente de PGE-2 (Németh *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2015). Por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, Németh e colaboradores demonstraram que MSC derivadas de medula óssea foram capazes de atenuar a sepse por meio da reprogramação de macrófagos pela secreção de PGE-2, que atua através dos receptores EP2 e EP4 nos macrófagos, induzindo diferenciação dos mesmos em perfil de M2 produtores de IL-10 (Németh *et al.*, 2009). O estudo conduzido por Chen e colaboradores (2010) demonstrou que a inibição da síntese de PGE-2 diminuiu significativamente o efeito imunossupressor de MSC derivadas de cordão umbilical sobre PBMC, enquanto a neutralização de TGF- β eIDO teve poucos efeitos (Chen *et al.*, 2010). Um estudo posterior também demonstrou que UC-MSC transfectadas para superexpressar COX-2 apresentaram efeitos imunomoduladores mais potentes em ensaios *in vitro* que MSC controles ou

superexpressando IDO1, sendo capazes de inibir significativamente a síntese de TNF- α e IFN- γ por linfócitos. O aumento da expressão de COX-2 também induziu maior expressão de genes imunomoduladores nas MSC, tais como IDO, TGF- β , HLA-G5, IL-10, HO e TSG-6 (Li *et al.*, 2015).

A infusão de MSC diminuiu a apoptose e induziu a proliferação de hepatócitos atenuando a insuficiência hepática aguda em modelo experimental a partir da secreção de PGE-2. A regeneração hepática induzida pelas MSC foi relacionada ao aumento da expressão de genes e proteínas YAP1 (Yes-associated protein), importantes no desenvolvimento e regeneração do fígado, que foi diminuída quando a secreção de PGE-2 foi inibida nas MSC (Liu *et al.*, 2019).

Em um estudo recente, Wang e colaboradores (2021) demonstraram que a administração de MSC suprimiu a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos do fígado através da inibição da via de sinalização TAK1 (TGF- β -activated kinase 1)-NF- κ B, melhorando a inflamação em modelo de insuficiência hepática aguda via secreção de PGE-2, uma vez que MSC deficientes em COX-2 não apresentaram o mesmo efeito. Além disso, estes autores demonstraram que as MSC induziram polarização de macrófagos M2 no fígado, evidenciado pelo aumento da expressão de mRNA dos marcadores Arg1, Mgl1, Mgl2 e Yml nos macrófagos, acompanhado do aumento dos níveis séricos de IL-10. A inibição de EPI-4, receptor de PGE-2, reduziu de maneira significativa os efeitos das MSC em atenuar a inflamação e na polarização de macrófagos (Wang *et al.*, 2021). O trabalho de Kota *et al.* também correlacionou o potencial terapêutico de MSC com a secreção de PGE-2 em modelo de traumatismo craniano. A supressão da expressão de COX-2 prejudicou significativamente a capacidade de BM-MSK em inibir a neuroinflamação, enquanto a supressão de IDO não afetou o efeito das MSC (Kota *et al.*, 2017).

Outros mecanismos importantes aparentemente independentes de IDO e PGE-2 têm sido descritos. MSC expressam isoformas solúveis de HLA-G que são moléculas imunossupressoras (Selmani *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2016). A expressão de HLA-G5 ocorre constitutivamente à baixos níveis em MSC e pode ser aumentada por estímulos inflamatórios e após contato com células T ativadas. A expressão de HLA-G5 por MSC inibe a secreção de IFN- γ e atividade citolítica de células NK. A neutralização de HLA-G5 demonstrou que esta molécula contribui para a supressão da proliferação de células T em reação mista de linfócitos e expansão de células T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ (Selmani *et al.*, 2008). A neutralização de HLA-G5 também

inibiu parcialmente a capacidade de UC-MSc em aumentar a frequência de células Treg a partir de PBMC de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico *in vitro* (Chen et al., 2017).

Chinnadurai e colaboradores demonstraram MSC licenciadas com IFN- γ inibem a proliferação e função efetora de células T através da expressão de B7H1/PD-L1 e B7DC/ PD-L2, de maneira independente de IDO (Chinnadurai *et al.*, 2014). Também foi demonstrado que a secreção de PD-L1 e PD-L2 solúvel por MSC após exposição à IFN- γ e TNF- α suprime a ativação de células T CD4+, inibe a fosforilação de AKT e a secreção de IL-2, induzindo hiporresponsividade e morte celular (Davies *et al.*, 2017). Lavini-Ramos e colaboradores demonstraram que MMP9 tem um papel central na integração de vias envolvidas na imunossupressão, estando correlacionada ao aumento da expressão de CCL22, TNF- α , FasL, RUNX3 e SEMAD4 em MSC de perfil altamente supressor e aumento da expressão de CCR4, IL-4, TBX21, entre outras moléculas, em células T (Lavini-Ramos *et al.*, 2017). Experimentos de cultivo de MSC com linfócitos demonstraram um aumento da expressão de CD39 e consequente da secreção de adenosina, molécula imunossupressora, pelas MSC e também por CD39+CD73+ Tregs em experimentos de co-cultivo, revelando outro importante mecanismo imunorregulador das MSC (Saldanha-Araujo *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que MSC apresentam importantes propriedades antimicrobianas, mediadas por mecanismos de contato e pela secreção de peptídeos e proteínas antimicrobianos (AMPs) solúveis ou encapsulados por vesículas extracelulares. As MSC aumentam o *clearance* das bactérias em modelos pré-clínicos de sepse, síndrome respiratória aguda e infecções relacionadas a fibrose cística (Alcayaga-Miranda *et al.*, 2017). Os efeitos antivirais dessas células também têm sido investigados nos últimos anos, especialmente relacionados a expressão de ISGs (do inglês, *IFN-stimulated genes*) que têm como alvo diferentes estágios do ciclo viral. Devido às suas propriedades de reduzir inflamação, promover regeneração tecidual, e após infusão facilmente migrarem para os pulmões, houve um rápido aumento do número de ensaios clínicos avaliando a eficácia terapêutica das MSC em pacientes acometidos pela infecção pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 (Rocha *et al.*, 2020).

Além das diversas propriedades imunorreguladoras/imunossupressoras, as MSC possuem a propriedade de migrar para sítios inflamatórios devido à elevada expressão de receptores de quimiocinas, metaloproteinases de matriz (MMPs) e

moléculas de adesão, ICAM-1 e VCAM-1, sugerindo assim um papel importante na regeneração tecidual, podendo tanto induzir a proliferação e diferenciação de células residentes como fibroblastos, células endoteliais e progenitores teciduais a partir da produção de fatores solúveis, quanto diferenciarem-se em células mesodérmicas funcionais e “substituir” células lesadas, embora de maneira mais limitada *in vivo* (Wang *et al.*, 2014; Markov *et al.*, 2021).

1.3. Mecanismos angiogênicos das MSC

Além das biomoléculas imunossupressoras e imunomoduladoras, o secretoma das MSC contém dezenas de fatores pró-angiogênicos, anti-apoptóticos e anti-fibróticos que auxiliam no reparo de tecidos lesionados (Kehl *et al.*, 2019). Inflamações crônicas, infecções estabelecidas e queimaduras severas, por exemplo, levam à destruição tecidual prolongada. Nesse contexto, o aporte de oxigênio e nutrientes é prejudicado, resultando em isquemia. Dessa forma, angiogênese, a formação de novos vasos, é essencial para otimizar a perfusão sanguínea, e conseqüentemente, maximizar o número de células residentes viáveis, conter o processo fibrótico e restaurar a função do tecido acometido (Di Pietro *et al.*, 2016; Ho *et al.*, 2017; Kehl *et al.*, 2019).

Kehl e colaboradores (2019) mostraram que as MSC humanas possuem potencial angiogênico variável, característica que pode estar relacionada ao seu tecido de origem. Após a avaliação do perfil proteômico do meio condicionado de MSC isoladas do tecido adiposo, de medula óssea e do cordão umbilical, os autores observaram que o meio condicionado das MSC da medula óssea e do cordão umbilical apresentam maiores concentrações de fatores pró-angiogênicos e atraem maior número de macrófagos (Kehl *et al.*, 2019).

Vários estudos em modelos animais demonstram que os macrófagos são cruciais no remodelamento da matriz extracelular, uma vez que auxiliam na degradação da matriz velha e estimulam outros tipos celulares (por exemplo, fibroblastos, endoteliócitos, pericitos e células musculares lisas), que em conjunto, regeneram o tecido lesionado (Corliss *et al.*, 2016). Nesse sentido, as MSC são essenciais para promoverem a expansão de populações celulares que restauram a malha tissular, incluindo os macrófagos (Jin *et al.*, 2019).

MSC humanas expressam vários genes que codificam moléculas relacionadas a mecanismos anti-fibróticos, tais como ADAMTS2, bFGF, COL15A1, COL16A2, COL18A1, COL5A3, DPT, ELN, FBLN2, FBLN5, FMOD, HAPLN1, HGF, HTRA1, LOX, MFAP2/4, MMPs, NID2 e TIMP2, que juntas coordenam a deposição e organização das fibrilas de colágeno, fibronectina e elastina pela atividade dos fibroblastos (Motegi & Ishikawa, 2017; Kehl *et al.*, 2019).

Dentre os genes que codificam fatores pró-angiogênicos e antiapoptóticos também expressos pelas MSCs, estão o ANG, ANGPT1, bFGF, CXCL12, EGF, ESM1, IGF-1, IL-6, JAG1, LIF, MCP-1, MMP-1, PDGF, PIGF, PTN, STC1, TGF- β (Kehl *et al.*, 2019; Maacha *et al.*, 2020).

1.4. MSC humanas de cordão umbilical

Embora as MSC isoladas de medula óssea ainda sejam as mais estudadas e exploradas, as MSC derivadas de tecidos neonatais, como placenta (PL-MS), matriz de cordão umbilical (UC-MS) ou de tecido conjuntivo da mucosa de cordão, denominada geléia de Wharton (do inglês, *Wharton's Jelly*; *WJ-MS*), têm sido cada vez mais exploradas para aplicações clínicas pois podem ser facilmente isoladas e expandidas em grandes quantidades *in vitro*. Alguns estudos têm demonstrado que MSC isoladas de cordão umbilical (do inglês, *umbilical cord derived mesenchymal stromal cell*; *UC-MS*) apresentam uma maior capacidade de proliferação/expansão, menor tempo médio de duplicação, maior estabilidade funcional e genética até altas passagens, maior potencial de diferenciação quando comparado à MSC isoladas de outras fontes, além de serem facilmente disponíveis, pois os procedimentos para coleta não são invasivos, seguros e não oferecem riscos (Hass *et al.*, 2011; El Omar *et al.*, 2014; Hoffmann *et al.*, 2017).

Bárcia e colaboradores avaliaram a imunogenicidade e imunossupressão de MSC isoladas de cordão umbilical e medula óssea. Os resultados demonstraram que UC-MS de diferentes doadores consistentemente inibem mais a proliferação de linfócitos, quando comparado a BM-MS, apresentando menor imunogenicidade. UC-MS apresentaram maiores níveis de expressão de moléculas imunomoduladoras de superfície CD200, CD273, CD274 e das citocinas IL-1 β , IL-8, LIF e TGF- β 2, e maior potencial imunossupressor em modelo experimental de inflamação aguda (Bárcia *et*

al., 2015). WJ-MSC apresentaram maior potencial imunossupressor *in vitro* quando comparadas às BM-MSC, independente de condicionamento com IFN- γ . A análise de marcadores de ativação em linfócitos indicou diferentes padrões de expressão quando co-cultivados com WJ-MSC ou BM-MSC, e diferentes níveis de expressão das moléculas imunomoduladoras IDO, HGF e PGE-2 foram observados entre as MSC das duas fontes independentemente ou em resposta ao estímulo com citocina inflamatória, demonstrando que a inflamação pode afetar distintamente MSC de diferentes fontes (Prasanna *et al.*, 2010).

Amable *et al.* também observaram maior potencial proliferativo e maior secreção de quimiocinas e fatores de crescimento por WJ-MSC, em comparação com AT- e BM-MSC (Amable *et al.*, 2014). Em outro estudo comparativo, WJ-MSC apresentaram maiores efeitos supressores em comparação a AT-, PL- e BM-MSC. Em relação a genes do sistema imune, as WJ-MSC apresentaram menor expressão dos genes do MHC II, TLR4, TLR3, JAG1, NOTCH2 e NOTCH3. As WJ-MSC também apresentaram taxa de crescimento mais rápida e maior potencial de diferenciação osteogênica (Li *et al.*, 2014).

Devido a resultados promissores em estudos pré-clínicos (Banerjee *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017), a segurança e potencial terapêutico das UC-MSC tem sido amplamente investigado para uma extensa gama de doenças em estudos clínicos desde 2009. Estes estudos demonstram segurança da terapia com UC-MSC evidenciada pela ausência de efeitos adversos em longo prazo, de formação de tumor ou de rejeição celular. Os estudos revelaram diferentes níveis de eficácia (Can *et al.*, 2017).

1.5. Autofagia e MSC

A autofagia é o principal processo de reciclagem e degradação lisossomal de proteínas e organelas altamente conservado em células eucarióticas e tem um papel importante na manutenção da homeostase (Khandia *et al.*, 2019). O processo de autofagia pode ocorrer por três vias distintas, diante dos mecanismos de entrega da carga citoplasmática aos lisossomos, denominadas macroautofagia (ou simplesmente, autofagia), microautofagia ou autofagia mediada por chaperona, sendo a primeira a mais estudada em MSC (Khandia *et al.*, 2019). Na autofagia, os

componentes são sequestrados em vesículas de membrana dupla, denominados autofagossomos, que são formados por um processo de múltiplas etapas direcionado a partir dos complexos proteicos ULK, ATG9L, ATG14L (PI (3)K (fosfatidilinositol-3-OH quinase)), ATG16L1, ATG2-WIPI, o sistema de conjugação ATG12 e LC3. Desta forma, os genes relacionados a autofagia (ATG), como Atg7, Atg12, Atg5 e Becn1, regulam a maturação do autofagossomo (Shibutani *et al.*, 2015; Riffelmacher *et al.*, 2018).

A formação de autofagossomos ocorre a níveis basais em condições de não-estresse, mas pode ser induzida por diferentes condições de estresse celular, como a privação de nutrientes, e pode estar desregulada em muitas condições patológicas, como doenças autoimunes, degenerativas e câncer (Hu *et al.*, 2019; Ceccariglia *et al.*, 2020). Recentemente tem sido proposto que o processo de autofagia pode estar associado com as funções das MSC, seja pela modulação da autofagia nessas células, alterando diretamente suas funções, seja pelo potencial das MSC em modular a autofagia em células imunes, e desta forma, afetando seus efeitos terapêuticos (Hu *et al.*, 2019; Ceccariglia *et al.*, 2020).

MSC apresentaram níveis aumentados de autofagia a partir da regulação positiva de BECN1 em resposta ao microambiente inflamatório de fibrose hepática *in vivo* (Wang *et al.*, 2020). No entanto, a inibição da autofagia via silenciamento de BECN-1 melhorou o seu efeito anti-fibrótico, que foi relacionado à diminuição da infiltração de células inflamatórias, reduzida proliferação e secreção de pro-colágeno por células estreladas hepáticas, que são progenitoras de miofibroblastos, e inibição da produção de citocinas inflamatórias TNF- α , IFN- γ e TGF- β 1, parcialmente mediada via secreção de PGE-2 (Wang *et al.*, 2020). Esses resultados corroboraram um estudo anterior que demonstrou o mesmo efeito em modelo experimental de encefalomielite autoimune (Dang *et al.*, 2014).

Em contrapartida, no estudo conduzido por Gao e colaboradores (2016), a indução da autofagia por rapamicina em MSC aumentou o potencial de inibição da proliferação de células TCD4⁺, associado principalmente ao aumento da secreção de TGF- β 1 (Gao *et al.*, 2016). O tratamento com rapamicina também aumentou a migração de células TCD4⁺ através da secreção de CXCL8/ IL-8, e a diferenciação de células Treg, via secreção de TGF- β 1, assim como inibiu linfócitos perfil Th1 e a secreção das citocinas IL-17, IFN- γ e IL-2 (Cen *et al.*, 2019). Exossomos derivados de BM-MSK de ratos melhoraram a função renal e renovação tecidual com significativo

aumento da expressão dos marcadores de autofagia Beclin-1 e LC3-II e diminuição da expressão de mTOR em modelo de nefropatia diabética (Ebrahim *et al.*, 2018).

Chinnadurai *et al.* (2015) demonstraram que o tratamento com IFN- γ aumentou a capacidade imunossupressora de MSC, que foi acompanhado do aumento da expressão de genes associados a indução de autofagia, como BECN-1, ATG12, ATG5, ATG16L1, ATG7 e LC3. No entanto, o potencial imunossupressor foi mantido quando a autofagia foi inibida (Chinnadurai *et al.*, 2015). Portanto, os resultados da literatura são bastante conflitantes até o momento, mas existem fortes evidências indicando que o processo de autofagia, ocorrendo nas MSC ou induzido por elas, desencadeia mecanismos que estão direto ou indiretamente associados ao maior potencial terapêutico dessas células.

1.6. Pré-condicionamento ou “*priming*” de MSC

Apesar das MSC demonstrarem grande potencial imunossupressor *in vitro* e em modelos pré-clínicos, os resultados em ensaios clínicos ainda são bastante conflitantes. Essas discrepâncias podem ser atribuídas, em parte, pela incapacidade dessas células de sobreviverem e/ou exercerem suas funções no microambiente lesionado/inflamado após serem transplantadas. Nesse sentido, um grande número de trabalhos tem buscado diversas estratégias para melhorar funcionalmente e/ou aumentar a sobrevivência dessas MSC *in vivo*, seja pela modificação do meio ou condição de cultivo, ou com estimulação pró-inflamatória (pré-condicionamento ou *priming*) (Beegle *et al.*, 2015; De Witte *et al.*, 2015; Klimczak and Kozłowska, 2016; Sangiorgi *et al.*, 2016; Saporov *et al.*, 2016; Najjar *et al.*, 2017; Najjar *et al.*, 2018; Noronha *et al.*, 2019) (Figura 1).

Alguns protocolos de expansão têm demonstrado que o condicionamento com hipóxia aumenta a proliferação e secreção de diversos fatores solúveis pelas MSC (De Witte *et al.*, 2015; Zhilai *et al.*, 2016). Vale ressaltar que a tensão de oxigênio nos tecidos raramente excede 5-7%, fazendo com que a expansão em ambientes com altos teores de oxigênio leve a uma necessária adaptação e, possivelmente, ao estresse celular, e uma posterior readaptação quando elas são transplantadas (Lavrentieva *et al.*, 2010). Alguns estudos já evidenciaram que os elevados níveis ambientais de O₂ podem levar à senescência precoce, extensão do tempo de

duplicação da população e dano ao DNA (Fehrer *et al.*, 2007; Leroux *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2011; Estrada *et al.*, 2012; Haque *et al.*, 2013; Betous *et al.*, 2017).

Nesse contexto, diversos trabalhos já demonstraram que MSC cultivadas em hipóxia, mimetizando assim suas condições de teor de oxigênio tecidual *in vivo*, apresentam maior potencial angiogênico e regenerativo (Leroux *et al.*, 2010). A exposição de MSC à hipóxia induz mecanismos anti-apoptóticos, através da fosforilação de AKT e BAD, e aumento de expressão de BCL-XL e BAG1, além de maior secreção de VEGF (Bader *et al.*, 2015).

UC-MSc cultivadas em hipóxia apresentaram reduzido consumo de oxigênio, maior capacidade proliferativa, reduzida ou ausência de apoptose celular, indução de HIF1 α (fator induzido por hipóxia-1), e elevação da expressão dos genes PDK-1, GLUT-1 e LDH (associados ao metabolismo energético) e redução da respiração mitocondrial (Lavrentieva *et al.*, 2010). Além disso, essas células apresentam consequente aumento do consumo de glicose, uma menor produção de espécies reativas de oxigênio, com isso, menores taxas de encurtamento telomérico e estadiamento da senescência celular (Lavrentieva *et al.*, 2010). Além disso, MSC isoladas de placenta quando submetidas à hipóxia, aumentam a expressão de diversas moléculas de adesão e apresentam maior potencial angiogênico *in vitro* (Mathew *et al.*, 2017). Além disso, essas células ainda apresentam aumento da expressão de GLUT-2 e secreção de insulina, essencial para a mediação do transporte de glicose necessário para processos regenerativos (Mathew *et al.*, 2017). Alguns trabalhos já demonstraram que o aumento de HIF1 α também está associado à maior expressão de receptores de quimiocinas, como CXCR4, CXCR7 e CX3CR1, facilitando assim a migração de MSC transplantadas para o sítio alvo (Haque *et al.*, 2013).

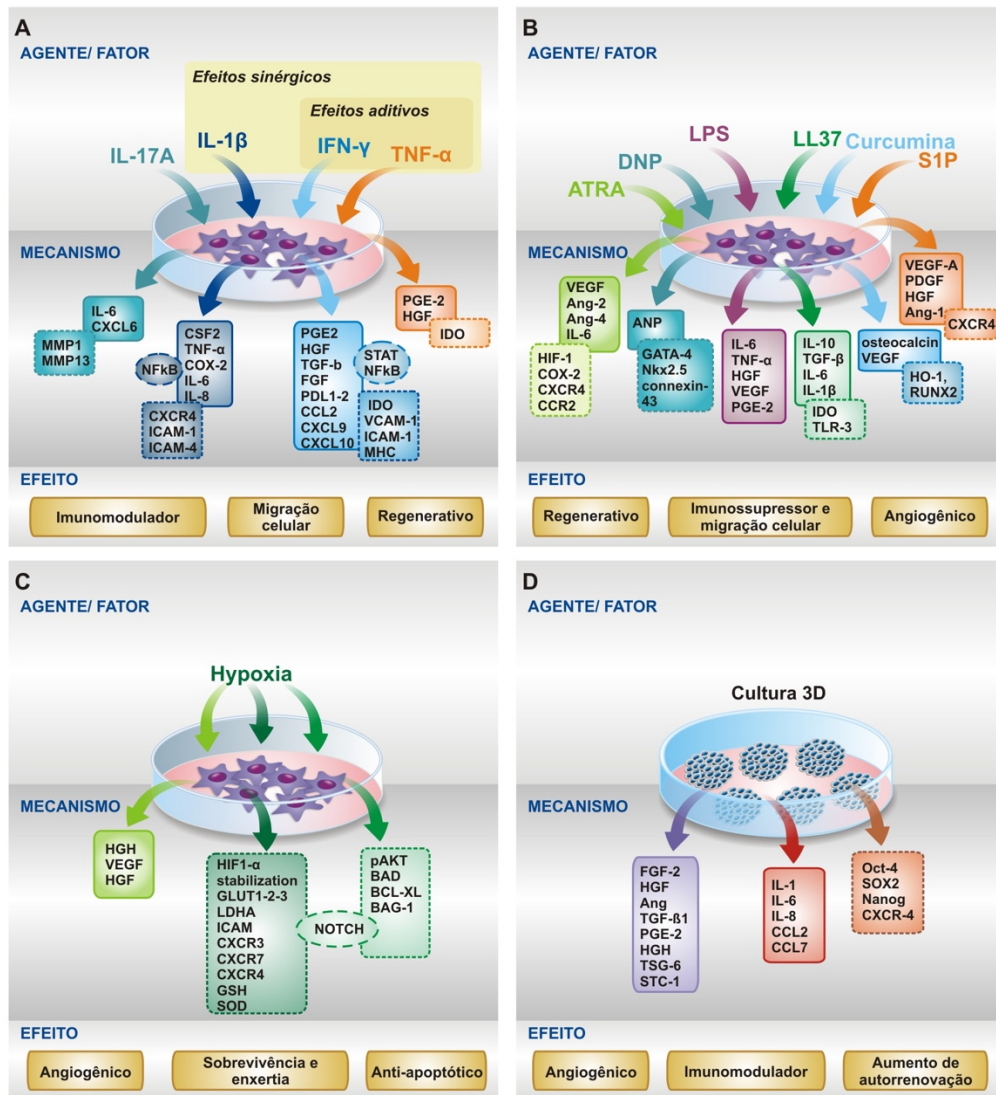


Figura 1. Representação esquemática das abordagens de pré-condicionamento/priming de MSC mais utilizadas. (A) citocinas ou fatores de crescimento, **(B)** agentes químicos/fármacos, **(C)** hipóxia e **(D)** culturas 3D. Alguns dos mecanismos de efeitos conhecidos para cada estratégia de condicionamento estão citados em retângulos com linhas retas (para moléculas secretadas) e com linhas pontilhadas (para genes expressos). Os principais efeitos (angiogênico, sobrevivência, migração, imunossupressor, imunomodulador) desencadeados pelas abordagens de condicionamento estão mostrados nos retângulos em amarelo. Fonte: modificado de Noronha et al. (2019).

Por outro lado, diversos trabalhos demonstraram o efeito do condicionamento de MSC com citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , pelo aumento do potencial imunossupressor, maior secreção de diversos fatores (tais como IDO e PGE-2), e maior inibição de proliferação de células T CD4⁺, T CD8⁺ e NK. Interessantemente, Chinnadurai e colaboradores demonstraram que o licenciamento com IFN γ pode reestabelecer as propriedades imunossupressoras de MSC senescentes, através da ativação de genes reguladores, incluindo IDO (Chinnadurai *et al.*, 2017). No entanto, o licenciamento de MSC com essas citocinas também induz

a alta expressão de moléculas MHC (I e II) e co-estimuladoras (De Witte *et al.*, 2015; Saparov *et al.*, 2016).

Nesse cenário, o pré-condicionamento com interleucina-17 (IL-17) tem demonstrado resultados interessantes. A IL-17 (ou IL-17A) é a mais amplamente estudada dentre os seis membros da família de interleucinas IL-17 atualmente descritos (IL-17A - F), é predominantemente secretada por células Th17, mas também em pequenas quantidades por células T CD8⁺, células B e células estromais, incluindo MSC (Gaffen, 2009; Mojsilovic *et al.*, 2015). Apesar disso, ainda existem poucos dados disponíveis sobre a influência da IL-17 nos processos de proliferação, diferenciação e função das MSC.

A IL-17 é expressa em resposta a citocinas, tais como TGF- β , IL-1, IL-6, IL-21 e IL-23, através da ativação de fatores de transcrição ROR γ t e STAT3 (Gaffen, 2009; Han *et al.*, 2014; Mojsilovic *et al.*, 2015). A sinalização via IL-17 induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento, enzimas de remodelamento tecidual, além de outros mediadores pelas células-alvo. Desta forma, a via de sinalização da IL-17 é efetivamente importante em processos fisiológicos, particularmente na homeostasia do metabolismo ósseo e hematopoético (Mojsilovic *et al.*, 2015; Ono *et al.*, 2016), bem como na patogênese de várias doenças autoimunes e inflamatórias.

Alguns trabalhos demonstraram que a IL-17 aumenta a proliferação de BM-MSCs humanas e murinas de uma maneira dose-dependente (Huang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009; Mojsilovic *et al.*, 2015). Em BM-MSCs humanas, esse efeito foi dependente da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir da ativação da via MAPK/ERK por meio de ACT-1 (molécula adaptadora) e TRAF-6 [(TNF) receptor-associated factor 6]. O mesmo trabalho demonstrou que a IL-17 induziu maior migração, motilidade e diferenciação osteoblástica nas BM-MSCs. IL-17 também induziu a expressão de M-CSF e RANKL nas BM-MSCs, estimulando assim a osteoclastogênese *in vitro* e *in vivo* (Huang *et al.*, 2009). Em contrapartida, Osta *et al.* (2014) observaram que IL-17 pode induzir a formação de matriz óssea em BM-MSCs somente em combinação com TNF- α , no entanto com significativa diminuição da expressão de RANKL (Osta *et al.*, 2014).

IL-17 pode aumentar a produção de leptina em BM-MSCs, que inibe adipogênese e promove osteogênese via JAK/STAT (Noh, 2012). Além da inibição da diferenciação adipogênica de maneira dose-dependente, observou-se aumento a

expressão de mRNA e secreção de IL-6 e IL-8 durante o processo de diferenciação, assim como aumento da expressão de COX-2 e dos níveis de PGE-2 em adipócitos diferenciados a partir de BM-MSC com o tratamento com IL-17 (Shin *et al.*, 2009). No entanto, a diferenciação osteogênica foi suprimida em MSC murinas por IL-17, via I κ B quinase e NF κ B (Chang *et al.*, 2013). Em outro trabalho, a IL-17 não afetou o potencial de diferenciação de BM-MSC de camundongos (Mojsilovic *et al.*, 2011).

Ono e colaboradores (2016) demonstraram que uma subpopulação de células T inatas, definidas como T $\gamma\delta$ que se encontram distribuídas principalmente nos tecidos periféricos, promovem a formação e regeneração óssea através da expressão de IL-17A, acelerando a formação óssea estimulando a proliferação e diferenciação de células progenitoras mesenquimais IL-17A⁺. Camundongos deficientes em IL-17A apresentaram formação óssea osteoblástica prejudicada (Ono *et al.*, 2016), sugerindo importante papel da IL-17 na regeneração óssea induzida em parte por progenitores mesenquimais teciduais.

Por outro lado, Kondo e colaboradores mostraram que a IL-17 inibe a diferenciação condrogênica em MSC humanas através da supressão de proteína quinase A (PKA) e consequente diminuição da fosforilação de SOX9, fator de transcrição envolvido na condrogênese (Kondo *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que em MSC derivadas de medula óssea e tecido adiposo de camundongos, que a IL-17 pode atuar em sinergismo com TNF- α e IFN- γ , promovendo maior imunossupressão de células T via produção de iNOS. Essas MSC tratadas com essa combinação de citocinas também foram capazes de reduzir a inflamação e a lesão tecidual em modelo murino de hepatite, também de maneira dependente de iNOS (Han *et al.*, 2014).

Em 2015, Sivanathan e colaboradores demonstraram que MSC humanas derivadas de medula óssea condicionadas com IL-17, mantiveram imunofenótipo, morfologia e níveis de expressão de MHC classe I comparáveis às MSC não tratadas, além de não apresentarem aumento da expressão de MHC II e moléculas co-estimuladoras, mantendo assim um fenótipo hipoinmunogênico. Além disso, as MSC condicionadas com IL-17 apresentaram maior potencial imunossupressor de células T ativadas, atribuído ao aumento da expressão de IL-6 e não de IDO, COX-2 e TGF- β . Neste trabalho, as MSC inibiram a expressão de CD25⁺ e secreção de citocinas de perfil Th1 (como TNF- α , IFN- γ e IL-2) em células T, e foram capazes de induzir células iTreg (Sivanathan *et al.*, 2015). Em trabalho subsequente, o mesmo grupo identificou

67 genes diferentemente expressos entre as células MSC tratadas com IL-17 e MSC não tratadas, genes principalmente associados à migração e resposta quimioestática, sendo os genes que codificam MMP1, MMP13 e CXCL6, altamente expressos nas MSC condicionadas a IL-17 (Sivanathan *et al.*, 2017).

Krstić *et al.* mostraram que o pré-condicionamento com IL-17 aumentou a migração e mobilização de MSC derivadas de sangue periférico em ensaio de cicatrização de ferida e gel de colágeno. Concomitantemente, induziu maior expressão de ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA), envolvida na migração celular pela clivagem de plasmina, protease que decompõe diretamente componentes da matriz extracelular. Além disso, IL-17 aumentou a adesão das MSC a células endoteliais, bem como migração transendotelial, sugerindo que esta citocina pode contribuir para migração de MSC para tecidos lesados e regeneração tecidual (Krstić *et al.*, 2015).

Recentemente, Du-Rocher *et al.* (2020) identificaram a partir da análise de expressão global de mRNA (Chip Array) de MSC co-cultivadas com linfócitos ativados, as vias de sinalização de IFN- γ e IL-17 como as duas principais vias envolvidas no processo de imunossupressão. IL-17 não melhorou diretamente a imunossupressão mediada pelas MSC, mas desencadeou maior migração de MSC (Du-Rocher *et al.*, 2020), corroborando com o trabalho citado anteriormente.

1.7. Expansão de MSC em biorreatores

Devido à baixa frequência das MSC nos tecidos e necessidade de altas doses para infusão nos diversos contextos terapêuticos (1-100 milhões de células/Kg paciente), torna-se essencial a padronização de bioprocessos e tecnologias para expansão em níveis escalonáveis, reprodutíveis e seguros, que possibilitem obtenção de grandes quantidades de células com qualidade terapêutica e ainda com menor custo. Diversas abordagens e tecnologias têm sido testadas e empregadas nesse sentido, sendo que os biorreatores oferecem vantagens consideráveis, como o controle e monitoramento de todo o processo, segurança e escalonabilidade.

Em 2013, foi demonstrado pela primeira vez que o cultivo de BM-MSK humanas em biorreator de tanque agitado, com um volume de trabalho de 2,5L e usando

microcarregador de plástico (poliestireno reticulado) não-poroso que permite o ancoramento das células, resultou em $1,7 \times 10^5$ células/mL em 12 dias de cultivo, uma expansão de cerca de 6 vezes, equivalente a 65 frascos T de 175 cm² (Rafiq *et al.*, 2013).

Além da necessidade de bioprocessos escalonáveis, há um crescente interesse para o estabelecimento de protocolos de expansão livres de xenoantígenos, uma vez que o soro fetal bovino, o suplemento mais amplamente utilizado em protocolos de isolamento e expansão celular, apresenta altas concentrações de proteínas xenogênicas que podem levar a reações imunológicas, além de maior risco de contaminação (vírus, endotoxinas), variação lote a lote e questões éticas (Santos *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2014). Alguns estudos desenvolvidos nos últimos anos pelo nosso grupo de pesquisa (Centro de Terapia Celular, CTC) com propostas de escalonamento já demonstraram bons resultados (Caruso *et al.*, 2014; Mizukami *et al.*, 2016; Dos Santos *et al.*, 2017; Tozetti *et al.*, 2017).

Mizukami e colaboradores estabeleceram um processo de expansão de UC- MSC em biorreator de tanque agitado usando microcarregadores macroporosos revestidos com gelatina (Cultispher®S) em meio livre de soro (serum-free), e em apenas quatro dias de cultivo obtiveram uma expansão de 7,5 vezes. Além disso, essas células mantiveram potencial imunossupressor e de diferenciação (Mizukami *et al.*, 2016). Mais recentemente, Tozetti e colaboradores, demonstraram ainda que as UC- MSC cultivadas em biorreator de tanque agitado em meio suplementado com soro AB humano, apresentaram menor consumo de glicose e menor formação de lactato quando comparado ao cultivo em frascos spinner, no entanto com baixa recuperação celular, que foi atribuída ao estresse de cisalhamento hidrodinâmico (Tozetti *et al.*, 2017).

Em protocolo semelhante, porém usando meio comercial livre de xenoantígenos, Santos e colaboradores, demonstraram que MSC de duas fontes distintas, medula óssea e tecido adiposo, foram facilmente expandidas em biorreator de tanque agitado, alcançando quantidades clinicamente significativas em apenas 07 dias com um volume de trabalho de 800 mL e sob diferentes condições de saturação de O₂ (4% e 2%). Ambas MSC mantiveram potencial de proliferação e diferenciação, assim como imunofenótipo e metabolismo semelhantes (Dos Santos *et al.*, 2014). Egger e colaboradores demonstraram que MSC humanas derivadas de tecido adiposo expandidas em biorreator de tanque agitado sob condição de hipóxia (5% DO) na

forma de agregados tridimensionais (esferoides), apresentaram aumento da proliferação e da atividade glicolítica, além de manterem imunofenótipo e potencial de multidiferenciação (Egger *et al.*, 2017). Recentemente, usando o mesmo sistema de mini-biorreator de tanque agitado, Moreira *et al.* (2020) alcançaram uma densidade máxima de $2,7 \pm 0,4 \times 10^5$ células/mL após 7 dias de cultivo de AT-MSC usando microcarregadores de plástico (não especificado) (SoloHill) a uma concentração de 20g/L e soro AB humano (Moreira *et al.*, 2020)

8. CONCLUSÃO

Neste estudo estabelecemos um novo protocolo de expansão de UC-MSc em sistema de cultivo 3D em biorreator de tanque agitado, escalonável e livre de xenoantígenos, durante o qual as células podem ser pré-condicionadas com hipóxia, citocinas, fatores de crescimento, fármacos, dentre outros. Nossa hipótese de que as UC-MSc expandidas e pré-condicionadas com hipóxia e/ou IL-17 em cultivo 3D apresentariam maior potencial imunossupressor e/ou angiogênico *in vitro* do que células sem pré-condicionamento, foi parcialmente confirmada.

Mostramos que o pré-condicionamento das UC-MSc com cultivo 3D e hipóxia aumentou significativamente o potencial angiogênico parácrino *in vitro* das células, o que foi associado ao aumento da secreção de VEGF. O pré-condicionamento com IL-17/normóxia diminuiu significativamente o potencial angiogênico das UC-MSc *in vitro*, comparado às outras condições. No entanto, resultados revelaram um possível mecanismo imunossupressor via CD147, ainda não descrito, que foi estimulado pelo pré-condicionamento das UC-MSc com IL-17/normóxia.

\

9. PUBLICAÇÕES RELACIONADAS A TESE DE DOUTORADO

Foram publicados dois artigos durante doutoramento, uma revisão de literatura e um artigo original com parte dos resultados obtidos:

Noronha, Nádia C.; Mizukami, Amanda; Caliari-Oliveira, Carol; Cominal, Juçara G.; Rocha, José Lucas M.; Covas, Dimas T.; Swiech, Kamilla; Malmegrim, Kelen C.R. *Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies*. Stem Cell Research and Therapy, 2019, 10(1), 131; doi: **10.1186/s13287-019-1224-y**; Fator de impacto: 6,83; Citações Scopus: 133 em 24/10/21.

Noronha, Nádia C., Mizukami, Amanda, Orellana, Maristela D., Oliveira, Maria C., Covas, Dimas T., Swiech, Kamilla, Malmegrim, Kelen C.R. *Hypoxia priming improves in vitro angiogenic properties of umbilical cord derived-mesenchymal stromal cells expanded in stirred-tank bioreactor*. Biochemical Engineering Journal 168 (2021) 107949; doi: **10.1016/j.bej.2021.107949**; Fator de impacto: 3,97; Citações Scopus: 1 em 24/10/21.

10. REFERÊNCIAS

- ALCAYAGA-MIRANDA, F.; CUENCA, J.; KHOURY, M. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. **Front Immunol**, v. 8, p. 339, 2017. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28424688> >.
- ALGERI, M. et al. Mesenchymal stromal cells and chronic inflammatory bowel disease. **Immunol Lett**, v. 168, n. 2, p. 191-200, Dec 2015. ISSN 0165-2478.
- AMABLE, P. R. et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. **Stem Cell Res Ther**, v. 5, n. 2, p. 53, Apr 2014. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739658> >.
- ANKRUM, J. A.; ONG, J. F.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 3, p. 252-60, Mar 2014. ISSN 1087-0156.
- ANTHONY, B. A.; LINK, D. C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. **Trends Immunol**, v. 35, n. 1, p. 32-7, Jan 2014. ISSN 1471-4906.
- BADER, A. M. et al. Hypoxic Preconditioning Increases Survival and Pro-Angiogenic Capacity of Human Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138477, 2015. ISSN 1932-6203.
- BALDARI, S. et al. Challenges and Strategies for Improving the Regenerative Effects of Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 10, Oct 2 2017. ISSN 1422-0067.
- BANERJEE, A. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells modulate dextran sulfate sodium induced acute colitis in immunodeficient mice. **Stem Cell Res Ther**, v. 6, p. 79, Apr 16 2015. ISSN 1757-6512.
- BEEGLE, J. et al. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. **Stem Cells**, v. 33, n. 6, p. 1818-28, Jun 2015. ISSN 1066-5099.
- BERNARDO, MARIA E.; FIBBE, WILLEM E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 4, p. 392-402, 2013/10/03/ 2013. ISSN 1934-5909. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590913004062> >.
- BETOUS, R. et al. Human Adipose-Derived Stem Cells Expanded Under Ambient Oxygen Concentration Accumulate Oxidative DNA Lesions and Experience Procarcinogenic DNA Replication Stress. **Stem Cells Transl Med**, v. 6, n. 1, p. 68-76, Jan 2017. ISSN 2157-6564 (Print) 2157-6564.

BOTTCHER, M. et al. Mesenchymal Stromal Cells Disrupt mTOR-Signaling and Aerobic Glycolysis During T-Cell Activation. **Stem Cells**, v. 34, n. 2, p. 516-21, Feb 2016. ISSN 1066-5099.

BOUHLAKA, M. N. et al. Human Mesenchymal Stem Cell-Educated Macrophages Are a Distinct High IL-6-Producing Subset that Confer Protection in Graft-versus-Host-Disease and Radiation Injury Models. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 23, n. 6, p. 897-905, Jun 2017. ISSN 1083-8791.

BURNHAM, A. J.; FOPPIANI, E. M.; HORWITZ, E. M. Key Metabolic Pathways in MSC-Mediated Immunomodulation: Implications for the Prophylaxis and Treatment of Graft Versus Host Disease. **Front Immunol**, v. 11, p. 609277, 2020. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33365034> >.

BÁRCIA, R. N. et al. What Makes Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Superior Immunomodulators When Compared to Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells? **Stem Cells Int**, v. 2015, p. 583984, 2015. ISSN 1687-966X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064137> >.

CAGLIANI, J. et al. Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications. **Journal of stem cell and regenerative biology**, v. 3, n. 2, p. 10.15436/2471-0598.17.022, 04/10 2017. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5667922/> >.

CAN, A.; CELIKKAN, F. T.; CINAR, O. Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials. **Cytotherapy**, 2017/09/28/ 2017. ISSN 1465-3249. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1465324917306631> >.

CARUSO, S. R. et al. Growth and functional harvesting of human mesenchymal stromal cells cultured on a microcarrier-based system. **Biotechnol Prog**, v. 30, n. 4, p. 889-95, Jul-Aug 2014. ISSN 1520-6033.

CECCARIGLIA, S. et al. Autophagy: a potential key contributor to the therapeutic action of mesenchymal stem cells. **Autophagy**, v. 16, n. 1, p. 28-37, 01 2020. ISSN 1554-8635. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31185790> >.

CEN, S. et al. Autophagy enhances mesenchymal stem cell-mediated CD4+ T cell migration and differentiation through CXCL8 and TGF- β 1. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 265, 08 23 2019. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31443687> >.

CHANG, J. et al. NF-kappaB inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting beta-catenin degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 23, p. 9469-74, Jun 04 2013. ISSN 0027-8424.

CHEN, A. K. et al. Increasing efficiency of human mesenchymal stromal cell culture by optimization of microcarrier concentration and design of medium feed. **Cytotherapy**, v. 17, n. 2, p. 163-73, Feb 2015. ISSN 1477-2566. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304664> >.

CHEN, C. et al. Mesenchymal stem cells upregulate Treg cells via sHLA-G in SLE patients. **Int Immunopharmacol**, v. 44, p. 234-241, Mar 2017. ISSN 1878-1705. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28129605> >.

CHEN, K. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. **Clin Immunol**, v. 135, n. 3, p. 448-58, Jun 2010. ISSN 1521-7035. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207200> >.

CHEN, R. et al. CD147 deficiency in T cells prevents thymic involution by inhibiting the EMT process in TECs in the presence of TGF β . **Cell Mol Immunol**, v. 18, n. 1, p. 171-181, 01 2021. ISSN 2042-0226. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31900457> >.

CHEN, W. et al. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. **J Immunol**, v. 181, n. 8, p. 5396-404, Oct 15 2008. ISSN 1550-6606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832696> >.

CHENG, N. C. et al. Short-term spheroid formation enhances the regenerative capacity of adipose-derived stem cells by promoting stemness, angiogenesis, and chemotaxis. **Stem Cells Transl Med**, v. 2, n. 8, p. 584-94, Aug 2013. ISSN 2157-6564 (Print) 2157-6564.

CHEUNG, T. S. et al. Apoptotic mesenchymal stromal cells induce prostaglandin E2 in monocytes: implications for the monitoring of mesenchymal stromal cell activity. **Haematologica**, v. 104, n. 10, p. e438-e441, 10 2019. ISSN 1592-8721. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30846505> >.

CHINNADURAI, R. et al. Mesenchymal Stromal Cells Derived From Crohn's Patients Deploy Indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated Immune Suppression, Independent of Autophagy. **Mol Ther**, v. 23, n. 7, p. 1248-1261, Jul 2015. ISSN 1525-0024. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25899824> >.

CHINNADURAI, R. et al. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN-gamma-licensed human mesenchymal stromal cells. **J Immunol**, v. 192, n. 4, p. 1491-501, Feb 15 2014. ISSN 0022-1767.

CHINNADURAI, R. et al. Immune dysfunctionality of replicative senescent mesenchymal stromal cells is corrected by IFN γ priming. **Blood Adv**, v. 1, n. 11, p. 628-643, Apr 25 2017. ISSN 2473-9529 (Print) 2473-9529.

CHINNADURAI, R. et al. Potency Analysis of Mesenchymal Stromal Cells Using a Combinatorial Assay Matrix Approach. **Cell Rep**, v. 22, n. 9, p. 2504-2517, Feb 27 2018.

CHUNG, D. J. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. **Blood**, v. 114, n. 3, p. 555-63, Jul 16 2009. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19465693> >.

COLLINO, F. et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Under Hypoxia: Changes in Extracellular Vesicles Secretion and Improvement of Renal Recovery after Ischemic Injury. **Cell Physiol Biochem**, v. 52, n. 6, p. 1463-1483, 2019. ISSN 1421-9778. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31099507> >.

CUNHA, B. et al. Filtration methodologies for the clarification and concentration of human mesenchymal stem cells. **Journal of Membrane Science**, v. 478, p. 117-129, 2015/03/15/ 2015. ISSN 0376-7388. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738814009442> >.

DAI, L. et al. KSHV activation of VEGF secretion and invasion for endothelial cells is mediated through viral upregulation of emmprin-induced signal transduction. **Int J Cancer**, v. 131, n. 4, p. 834-43, Aug 15 2012. ISSN 1097-0215. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918972> >.

DANG, S. et al. Autophagy regulates the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Autophagy**, v. 10, n. 7, p. 1301-15, Jul 2014. ISSN 1554-8635. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905997> >.

DAVIES, L. C. et al. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. **Stem Cells**, v. 35, n. 3, p. 766-776, Mar 2017. ISSN 1066-5099.

DE SOUSA PINTO, D. et al. Scalable Manufacturing of Human Mesenchymal Stromal Cells in the Vertical-Wheel Bioreactor System: An Experimental and Economic Approach. **Biotechnol J**, v. 14, n. 8, p. e1800716, Aug 2019. ISSN 1860-7314. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30945467> >.

DE WITTE, S. F. H. et al. Toward Development of iMesenchymal Stem Cells for Immunomodulatory Therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 648, 01/06. ISSN 1664-3224. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4701910/> >.

DE WITTE, S. F. H. et al. Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. **Stem Cells**, v. 36, n. 4, p. 602-615, 04 2018. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29341339> >.

DERAKHTI, S. et al. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 103, p. 109782, Oct 2019. ISSN 1873-0191. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31349523> >.

DING, D. C. et al. Characterization of HLA-G and Related Immunosuppressive Effects in Human Umbilical Cord Stroma-Derived Stem Cells. **Cell Transplant**, v. 25, n. 2, p. 217-28, 2016. ISSN 1555-3892. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26044082> >.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606> >.

DOS SANTOS, F. et al. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. **J Cell Physiol**, v. 223, n. 1, p. 27-35, Apr 2010. ISSN 1097-4652. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020504> >.

DOS SANTOS, F. et al. A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. **Biotechnol Bioeng**, v. 111, n. 6, p. 1116-27, Jun 2014. ISSN 0006-3592.

DOS SANTOS, V. T. et al. Characterization of Human AB Serum for Mesenchymal Stromal Cell Expansion. **Transfus Med Hemother**, v. 44, n. 1, p. 11-21, Jan 2017. ISSN 1660-3796 (Print)

1660-3796.

DU-ROCHER, B. et al. IL-17 Triggers Invasive and Migratory Properties in Human MSCs, while IFN γ Favors their Immunosuppressive Capabilities: Implications for the "Licensing" Process. **Stem Cell Rev Rep**, v. 16, n. 6, p. 1266-1279, 12 2020. ISSN 2629-3277. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33067729> >.

EBRAHIM, N. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorated Diabetic Nephropathy by Autophagy Induction through the mTOR Signaling Pathway. **Cells**, v. 7, n. 12, Nov 22 2018. ISSN 2073-4409. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30467302> >.

EGGER, D. et al. Hypoxic Three-Dimensional Scaffold-Free Aggregate Cultivation of Mesenchymal Stem Cells in a Stirred Tank Reactor. **Bioengineering**, v. 4, n. 2, 2017. ISSN 2306-5354.

EL OMAR, R. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? **Tissue Eng Part B Rev**, v. 20, n. 5, p. 523-44, Oct 2014. ISSN 1937-3368.

ESTRADA, J. C. et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 5, p. 743-55, May 2012. ISSN 1350-9047.

FALLARINO, F. et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. **J Immunol**, v. 176, n. 11, p. 6752-61, Jun 01 2006. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709834> >.

FEHRER, C. et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. **Aging Cell**, v. 6, n. 6, p. 745-57, Dec 2007. ISSN 1474-9718.

FENIZIA, C. et al. SARS-CoV-2 Entry: At the Crossroads of CD147 and ACE2. **Cells**, v. 10, n. 6, 06 08 2021. ISSN 2073-4409. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34201214> >.

FRANCOIS, M. et al. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. **Mol Ther**, v. 20, n. 1, p. 187-95, Jan 2012. ISSN 1525-0016.

FRENETTE, P. S. et al. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 285-316, 2013. ISSN 0732-0582.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**, v. 3, n. 4, p. 393-403, Oct 1970. ISSN 0008-8730. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5523063> >.

GAFFEN, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 8, p. 556-67, Aug 2009. ISSN 1474-1733.

GALIPEAU, J. et al. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. **Cytotherapy**, v. 18, n. 2, p. 151-9, Feb 2016. ISSN 1465-3249.

GALIPEAU, J. et al. Mesenchymal stromal cell variables influencing clinical potency: the impact of viability, fitness, route of administration and host predisposition. **Cytotherapy**, v. 23, n. 5, p. 368-372, 05 2021. ISSN 1477-2566. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33714704> >.

GALLEU, A. et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. **Sci Transl Med**, v. 9, n. 416, Nov 15 2017. ISSN 1946-6242. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29141887> >.

GAO, L. et al. Autophagy Improves the Immunosuppression of CD4+ T Cells by Mesenchymal Stem Cells Through Transforming Growth Factor- β 1. **Stem Cells Transl Med**, v. 5, n. 11, p. 1496-1505, Nov 2016. ISSN 2157-6564. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27400793> >.

GENG, J. et al. CD147 antibody specifically and effectively inhibits infection and cytokine storm of SARS-CoV-2 and its variants delta, alpha, beta, and gamma. **Signal Transduct Target Ther**, v. 6, n. 1, p. 347, 09 25 2021. ISSN 2059-3635. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34564690> >.

GORNOSTAEVA, A. N. et al. Adipose-derived stromal cell immunosuppression of T cells is enhanced under "physiological" hypoxia. **Tissue Cell**, v. 63, p. 101320, Apr 2020. ISSN 1532-3072. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32223948> >.

GUO, H. et al. Ratio of CD147^{high}/CD147^{low} in CD4⁺CD25⁺ T cells: A potential biomarker for early diagnosis and prediction of response to therapy for autoimmune diseases. **Med Hypotheses**, v. 115, p. 1-4, Jun 2018. ISSN 1532-2777. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29685186> >.

HAN, X. et al. Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 11, p. 1758-68, Nov 2014. ISSN 1350-9047.

HAN, Y. et al. Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 109, p. 59-68, 04 2019. ISSN 1878-5875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30710751> >.

HAQUE, N. et al. Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 632972, 08/27. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771429/> >.

HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 12, May 14 2011. ISSN 1478-811x.

HEATHMAN, T. R. J. et al. Development of a process control strategy for the serum-free microcarrier expansion of human mesenchymal stem cells towards cost-effective and commercially viable manufacturing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, p. 200-209, 2019. ISSN 1369-703X.

HELGELAND, E. et al. Angiostatin-functionalized collagen scaffolds suppress angiogenesis but do not induce chondrogenesis by mesenchymal stromal cells in vivo. **J Oral Sci**, v. 62, n. 4, p. 371-376, Sep 26 2020. ISSN 1880-4926. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32684573> >.

HOFFMANN, A. et al. Comparison of in vitro-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 11, n. 9, p. 2565-2581, Sep 2017. ISSN 1932-6254.

HU, C. et al. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 120, 04 17 2019. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30995935> >.

HUANG, H. et al. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 10, p. 1332-43, Oct 2009. ISSN 1350-9047.

HUANG, W. et al. Interleukin-17A: a T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 6, p. 1512-8, Jun 2006. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099.

KANG, I. et al. Donor-dependent variation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in response to hypoxic preconditioning and amelioration of limb ischemia. **Exp Mol Med**, v. 50, n. 4, p. 35, 04 2018. ISSN 2092-6413. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29674661> >.

KAWABATA, T.; YOSHIMORI, T. Autophagosome biogenesis and human health. **Cell Discov**, v. 6, n. 1, p. 33, 2020. ISSN 2056-5968. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32528724> >.

KE, X. et al. Hypoxia upregulates CD147 through a combined effect of HIF-1 α and Sp1 to promote glycolysis and tumor progression in epithelial solid tumors. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 8, p. 1598-607, Aug 2012. ISSN 1460-2180. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22678117> >.

KEHL, D. et al. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. **NPJ Regen Med**, v. 4, p. 8, 2019. ISSN 2057-3995. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31016031> >.

KHANDIA, R. et al. A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. **Cells**, v. 8, n. 7, 07 03 2019. ISSN 2073-4409. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31277291> >.

KLIMCZAK, A.; KOZLOWSKA, U. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. **Stem Cells Int**, v. 2016, p. 4285215, 2016. ISSN 1687-966X (Print).

KONALA, V. B. et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. **Cytotherapy**, v. 18, n. 1, p. 13-24, Jan 2016. ISSN 1465-3249.

KONDO, M. et al. IL-17 inhibits chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79463, 2013. ISSN 1932-6203.

KOTA, D. J. et al. Prostaglandin E2 Indicates Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cells in Experimental Traumatic Brain Injury. **Stem Cells**, v. 35, n. 5, p. 1416-1430, 05 2017. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28233425> >.

KRSTIĆ, J. et al. Urokinase type plasminogen activator mediates Interleukin-17-induced peripheral blood mesenchymal stem cell motility and transendothelial migration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1853, n. 2, p. 431-44, Feb 2015. ISSN 0006-3002. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25433194> >.

LAN, Y. W. et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Stem Cell Res Ther**, v. 6, p. 97, May 20 2015. ISSN 1757-6512.

LANDSKRON, J.; TASKÉN, K. CD147 in regulatory T cells. **Cell Immunol**, v. 282, n. 1, p. 17-20, Mar 2013. ISSN 1090-2163. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665204> >.

LAVINI-RAMOS, C. et al. MMP9 integrates multiple immunoregulatory pathways that discriminate high suppressive activity of human mesenchymal stem cells. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 874, Apr 13 2017. ISSN 2045-2322.

LAVRENTIEVA, A. et al. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. **Cell Commun Signal**, v. 8, p. 18, Jul 16 2010. ISSN 1478-811x.

LAWSON, T. et al. Process development for expansion of human mesenchymal stromal cells in a 50L single-use stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p. 49-62, 2017. ISSN 1369-703X.

LE BLANC, K.; DAVIES, L. C. MSCs-cells with many sides. **Cytotherapy**, Feb 9 2018. ISSN 1465-3249.

LE BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 383-96, Apr 25 2012. ISSN 1474-1733.

LE FLOCH, R. et al. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 40, p. 16663-8, Oct 04 2011. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930917> >.

LEE, J. H.; YOON, Y. M.; LEE, S. H. Hypoxic Preconditioning Promotes the Bioactivities of Mesenchymal Stem Cells via the HIF-1 α -GRP78-Akt Axis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 6, Jun 21 2017. ISSN 1422-0067.

LEE, S.-G.; JOE, Y. A. Autophagy mediates enhancement of proangiogenic activity by hypoxia in mesenchymal stromal/stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 501, n. 4, p. 941-947, 2018/07/02/ 2018. ISSN 0006-291X. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X18311434> >.

LEROUX, L. et al. Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. **Mol Ther**, v. 18, n. 8, p. 1545-52, Aug 2010. ISSN 1525-0016.

LI, D. et al. Overexpression of COX-2 but not indoleamine 2,3-dioxygenase-1 enhances the immunosuppressive ability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **Int J Mol Med**, v. 35, n. 5, p. 1309-16, May 2015. ISSN 1791-244X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25777747> >.

LI, X. et al. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. **Int J Mol Med**, v. 34, n. 3, p. 695-704, Sep 2014. ISSN 1791-244X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970492> >.

LI, X. et al. Enhanced glucose metabolism mediated by CD147 contributes to immunosuppression in hepatocellular carcinoma. **Cancer Immunol Immunother**, v. 69, n. 4, p. 535-548, Apr 2020. ISSN 1432-0851. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31965268> >.

LIU, Y. et al. Prostaglandin E2 secreted by mesenchymal stem cells protects against acute liver failure via enhancing hepatocyte proliferation. **FASEB J**, v. 33, n. 2, p. 2514-2525, 02 2019. ISSN 1530-6860. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30260707> >.

MAO, Y. X. et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Pulmonary Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa* via Inhibiting Overproduction of Prostaglandin E2. **Stem Cells**, v. 33, n. 7, p. 2331-42, Jul 2015. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25788456> >.

MARKOV, A. et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. **Stem Cell Res Ther**, v. 12, n. 1, p. 192, 03 18 2021. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33736695> >.

MAROTE, A. et al. MSCs-Derived Exosomes: Cell-Secreted Nanovesicles with Regenerative Potential. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 231, 08/03. ISSN 1663-9812. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4971062/> >.

MATHEW, S. A.; CHANDRAVANSI, B.; BHONDE, R. Hypoxia primed placental mesenchymal stem cells for wound healing. **Life Sci**, v. 182, p. 85-92, Aug 01 2017. ISSN 0024-3205.

MEISEL, R. et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4619-21, Jun 15 2004. ISSN 0006-4971. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001472> >.

MENDEZ-FERRER, S. et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 829-834, 08/12/print 2010. ISSN 0028-0836. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature09262> >.

MIZUKAMI, A. et al. Technologies for large-scale umbilical cord-derived MSC expansion: Experimental performance and cost of goods analysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 135, p. 36-48, 2018. ISSN 1369-703X.

MIZUKAMI, A. et al. Stirred tank bioreactor culture combined with serum-/xenogeneic-free culture medium enables an efficient expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells. **Biotechnol J**, v. 11, n. 8, p. 1048-59, Aug 2016. ISSN 1860-6768.

MOJSILOVIC, S. et al. Interleukin-17 and its implication in the regulation of differentiation and function of hematopoietic and mesenchymal stem cells. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 470458, 2015. ISSN 0962-9351.

MOJSILOVIC, S. et al. IL-17 and FGF signaling involved in mouse mesenchymal stem cell proliferation. **Cell Tissue Res**, v. 346, n. 3, p. 305-16, Dec 2011. ISSN 0302-766x.

MOLOUDI, R. et al. Inertial-Based Filtration Method for Removal of Microcarriers from Mesenchymal Stem Cell Suspensions. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 12481, 08 2018. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30127526> >.

MOREIRA, F. et al. Successful Use of Human AB Serum to Support the Expansion of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cell in a Microcarrier-Based Platform. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 8, p. 307, 2020. ISSN 2296-4185. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32373600> >.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends Immunol**, v. 34, n. 3, p. 137-43, Mar 2013. ISSN 1471-4981. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103127> >.

MUNN, D. H. et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 633-42, May 2005. ISSN 1074-7613. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894280> >.

NAJAR, M. et al. Insights into inflammatory priming of mesenchymal stromal cells: functional biological impacts. **Inflamm Res**, Jan 23 2018. ISSN 1023-3830.

NAJAR, M. et al. Mesenchymal Stromal Cells and Toll-Like Receptor Priming: A Critical Review. **Immune Network**, v. 17, n. 2, p. 89-102, 04/20. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5407987/> >.

NAJAR, M. et al. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. **Cytotherapy**, v. 18, n. 2, p. 160-71, Feb 2016. ISSN 1465-3249.

NAKATOGAWA, H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 21, n. 8, p. 439-458, 08 2020. ISSN 1471-0080. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32372019> >.

NIENOW, A. W. et al. Agitation conditions for the culture and detachment of hMSCs from microcarriers in multiple bioreactor platforms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 108, p. 24-29, 2016/04/15/ 2016. ISSN 1369-703X. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X15300309> >.

NIENOW, A. W. et al. A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 85, p. 79-88, 2014/04/15/ 2014. ISSN 1369-703X. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X14000278> >.

NOH, M. Interleukin-17A increases leptin production in human bone marrow mesenchymal stem cells. **Biochem Pharmacol**, v. 83, n. 5, p. 661-70, Mar 01 2012. ISSN 0006-2952.

NORONHA, N. C. et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 131, 05 2019. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31046833> >.

NÉMETH, K. et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nat Med**, v. 15, n. 1, p. 42-9, Jan 2009. ISSN 1546-170X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098906> >.

O'CONNOR, K. C. Molecular Profiles of Cell-to-Cell Variation in the Regenerative Potential of Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cells Int**, v. 2019, p. 5924878, 2019. ISSN 1687-966X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31636675> >.

ONO, T. et al. IL-17-producing gammadelta T cells enhance bone regeneration. **Nat Commun**, v. 7, p. 10928, Mar 11 2016. ISSN 2041-1723.

OSTA, B. et al. Effects of Interleukin-17A on Osteogenic Differentiation of Isolated Human Mesenchymal Stem Cells. **Front Immunol**, v. 5, p. 425, 2014. ISSN 1664-3224 (Print) 1664-3224.

OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Found Symp**, v. 136, p. 42-60, 1988. ISSN 0300-5208. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3068016> >.

PAREKKADAN, B.; MILWID, J. M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 12, p. 87-117, Aug 15 2010. ISSN 1523-9829.

PETIBONE, D. M.; MAJEED, W.; CASCIANO, D. A. Autophagy function and its relationship to pathology, clinical applications, drug metabolism and toxicity. **J Appl Toxicol**, v. 37, n. 1, p. 23-37, 01 2017. ISSN 1099-1263. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27682190> >.

PINTO, D. S. et al. Modulation of the in vitro angiogenic potential of human mesenchymal stromal cells from different tissue sources. **J Cell Physiol**, Feb 2020. ISSN 1097-4652. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32037550> >.

PRASANNA, S. J. et al. Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9016, Feb 2 2010. ISSN 1932-6203.

PREDA, M. B. et al. Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice. **Cell Death Dis**, v. 12, n. 6, p. 566, 06 02 2021. ISSN 2041-4889. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34075029> >.

QIAN, X. et al. Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes. **Stem Cell Rev Rep**, v. 17, n. 2, p. 411-427, Apr 2021. ISSN 2629-3277. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32935222> >.

RADZIKOWSKA, U. et al. Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. **Allergy**, v. 75, n. 11, p. 2829-2845, 11 2020. ISSN 1398-9995. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32496587> >.

RAFIQ, Q. A. et al. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. **Biotechnol Lett**, v. 35, n. 8, p. 1233-45, Aug 2013. ISSN 0141-5492.

RAGOTTE, R. J. et al. Human Basigin (CD147) Does Not Directly Interact with SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **mSphere**, v. 6, n. 4, p. e0064721, 08 25 2021. ISSN 2379-5042. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34378982> >.

REGMI, S. et al. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. **Eur J Cell Biol**, v. 98, n. 5-8, p. 151041, Dec 2019. ISSN 1618-1298. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31023504> >.

REGMI, S. et al. Enhanced viability and function of mesenchymal stromal cell spheroids is mediated via autophagy induction. **Autophagy**, 17:10, 2991-3010, Nov 2020.

REN, G. et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 2, p. 141-50, Feb 07 2008. ISSN 1875-9777.

RIFFELMACHER, T.; RICHTER, F. C.; SIMON, A. K. Autophagy dictates metabolism and differentiation of inflammatory immune cells. **Autophagy**, v. 14, n. 2, p. 199-206, 2018. ISSN 1554-8635. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28806133> >.

ROCHA, J. L. M. et al. Mesenchymal Stromal Cells in Viral Infections: Implications for COVID-19. **Stem Cell Rev Rep**, Sep 2020. ISSN 2629-3277. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32895900> >.

ROSOVA, I. et al. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 8, p. 2173-82, Aug 2008. ISSN 1066-5099.

ROVIRA GONZALEZ, Y. I. et al. In vitro cytokine licensing induces persistent permissive chromatin at the Indoleamine 2,3-dioxygenase promoter. **Cytotherapy**, v. 18, n. 9, p. 1114-28, Sep 2016. ISSN 1465-3249.

RUBINSZTEIN, D. C.; SHPILKA, T.; ELAZAR, Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. **Curr Biol**, v. 22, n. 1, p. R29-34, Jan 10 2012. ISSN 1879-0445. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240478> >.

SALAZAR-NORATTO, G. E. et al. Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine applications. **Stem Cells**, v. 38, n. 1, p. 22-33, Jan 2020. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31408238> >.

SALDANHA-ARAUJO, F. et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. **Stem Cell Res**, v. 7, n. 1, p. 66-74, Jul 2011. ISSN 1873-5061.

SANGIORGI, B. et al. DSP30 enhances the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells and protects their suppressive potential from lipopolysaccharide effects: A potential role of adenosine. **Cytotherapy**, v. 18, n. 7, p. 846-59, Jul 2016. ISSN 1465-3249.

SANTOS, F. et al. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 17, n. 12, p. 1201-10, Dec 2011. ISSN 1937-3384.

SAPAROV, A. et al. Preconditioning of Human Mesenchymal Stem Cells to Enhance Their Regulation of the Immune Response. **Stem Cells Int**, v. 2016, p. 3924858, 2016. ISSN 1687-966X (Print).

SELMANI, Z. et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 212-22, Jan 2008. ISSN 1549-4918. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932417> >.

SHI, Y. et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. **Trends in immunology**, v. 33, n. 3, p. 136-143, 01/07 2012. ISSN 1471-4906 1471-4981. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412175/> >.

SHI, Y. et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. **Nat Rev Nephrol**, v. 14, n. 8, p. 493-507, Aug 2018. ISSN 1759-507X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29895977> >.

SHIBUTANI, S. T. et al. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. **Nat Immunol**, v. 16, n. 10, p. 1014-24, Oct 2015. ISSN 1529-2916. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26382870> >.

SHIN, J. H.; SHIN, D. W.; NOH, M. Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 12, p. 1835-44, Jun 15 2009. ISSN 0006-2952.

SIVANATHAN, K. N. et al. Transcriptome Profiling of IL-17A Preactivated Mesenchymal Stem Cells: A Comparative Study to Unmodified and IFN-gamma Modified Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells Int**, v. 2017, p. 1025820, 2017. ISSN 1687-966X (Print).

SIVANATHAN, K. N. et al. Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function. **Stem Cells**, v. 33, n. 9, p. 2850-63, Sep 2015. ISSN 1066-5099.

SOLSTAD, T. et al. CD147 (Basigin/Emmprin) identifies FoxP3+CD45RO+CTLA4+-activated human regulatory T cells. **Blood**, v. 118, n. 19, p. 5141-51, Nov 10 2011. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937704> >.

SPAGGIARI, G. M. et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1327-33, Feb 01 2008. ISSN 0006-4971. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951526> >.

TAVASSOLI, H. et al. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products. **Biomaterials**, v. 181, p. 333-346, 10 2018. ISSN 1878-5905. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30098569> >.

TOZETTI, P. A. et al. Expansion strategies for human mesenchymal stromal cells culture under xeno-free conditions. **Biotechnol Prog**, May 09 2017. ISSN 1520-6033.

TSAI, A. C.; PACAK, C. A. Bioprocessing of Human Mesenchymal Stem Cells: From Planar Culture to Microcarrier-Based Bioreactors. **Bioengineering (Basel)**, v. 8, n. 7, Jul 07 2021. ISSN 2306-5354. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34356203> >.

TSAI, C. C. et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 459-69, Jan 2011. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952688> >.

ULRICH, H.; PILLAT, M. M. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. **Stem Cell Rev Rep**, v. 16, n. 3, p. 434-440, 06 2020. ISSN 2629-3277. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32307653> >.

WANG, H. Y. et al. Autophagy inhibition via Becn1 downregulation improves the mesenchymal stem cells antifibrotic potential in experimental liver fibrosis. **J Cell Physiol**, v. 235, n. 3, p. 2722-2737, 03 2020. ISSN 1097-4652. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31508820> >.

WANG, J. et al. Mesenchymal stem cell-secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via attenuation of cell death and regulation of macrophage polarization. **Stem Cell Res Ther**, v. 12, n. 1, p. 15, 01 07 2021. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33413632> >.

WANG, Y. et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nat Immunol**, v. 15, n. 11, p. 1009-1016, 11//print 2014. ISSN 1529-2908. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3002> >.

WOBMA, H. M. et al. Dual IFN- γ /hypoxia priming enhances immunosuppression of mesenchymal stromal cells through regulatory proteins and metabolic mechanisms. **Journal of Immunology and Regenerative Medicine**, v. 1, p. 45-56, 2018/03/01/ 2018. ISSN 2468-4988. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468498817300197> >.

XIONG, L.; EDWARDS, C. K.; ZHOU, L. The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: a review of the current scientific literature. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 10, p. 17411-41, Sep 29 2014. ISSN 1422-0067. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25268615> >.

YU, J. et al. Hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells promote liver regeneration in a rat massive hepatectomy model. **Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 4, p. 83, Jul 2013. ISSN 1757-6512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856418> >.

ZHANG, H. et al. Immunomodulatory function of whole human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. **Molecular Immunology**, v. 87, p. 293-299, 7// 2017. ISSN 0161-5890. Available at: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589017300743> >.

ZHAO, Y. et al. The role of EMMPRIN expression in ovarian epithelial carcinomas. **Cell Cycle**, v. 12, n. 17, p. 2899-913, Sep 01 2013. ISSN 1551-4005. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23966157> >.

ZHILAI, Z. et al. Preconditioning in lowered oxygen enhances the therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells in a rat model of spinal cord injury. **Brain Res**, v. 1642, p. 426-435, Jul 01 2016. ISSN 0006-8993.

10. ANEXOS

10.1. Anexo I



COMISSÃO DE PESQUISA DO CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE DA MULHER DE RIBEIRÃO PRETO - MATER

Ref.: Projeto de Pesquisa: Condicionamento de Células Estromais Mesenquimais de Cordão Umbilical com IL-17 ou Hipóxia para Tratamento de Colite Experimental.

Nº 004/2018

Nádia de Cássia Noronha

Prezado Pesquisador (a)

Informamos que o seu projeto foi avaliado pela Comissão de Pesquisa Clínica do CRSM-Mater no dia 23/07/2018 e considerado **aprovado** para realização nessa instituição.

Lembramos que essa aprovação pressupõe o cumprimento das seguintes necessidades:

- 1- Apresentação do parecer do CEP antes do início da abordagem de potenciais sujeitos para o estudo
- 2- Apresentação de relatórios parciais (Anexo 3), semestralmente, indicando o andamento da pesquisa.
- 3- Apresentação de relatório final de pesquisa (Anexo 3) que deverá ser acompanhado de um resumo estruturado da mesma (uma lauda, contendo introdução, métodos, resultados e conclusões) para a documentação do projeto de pesquisa junto ao CRSM-Mater
- 4- Todos os procedimentos relacionados ao projeto de pesquisa que não estejam dentro da rotina do serviço deverão ser realizados pela equipe do projeto, não se utilizando de funcionários da instituição.

Atenciosamente,


PROFª. DRª. CAROLINA SALES VIERA MACEDO

Presidente da Comissão de Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher

10.2. Anexo II



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 023/2018
 kms

Ribeirão Preto, 04 de dezembro de 2018.

À pós-graduanda
Nádia de Cássia Noronha
 Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Kelen C. Ribeiro Malmegrin de Farias
 FCFRP/USP

Prezadas Pesquisadoras,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “CONDICIONAMENTO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL COM IL-17 OU HIPÓXIA PARA TRATAMENTO DE COLITE EXPERIMENTAL”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 486 - CAAE: 98062918.8.0000.5403, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 183ª reunião ordinária, realizada em 03/12/2018, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 3.056.227.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF^ª. DR^ª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
 Coordenadora do CEP/FCFRP

10.3. Anexo III



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 020/2020
 kms

Ribeirão Preto, 18 de junho de 2020.

À
Profª. Drª. Kelen Ribeiro Malmegrin de Farias
 Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
 FCFRP/USP

Prezada Senhora,

Informamos que a criação do Biorrepositório sob sua responsabilidade intitulado “BIORREPOSITÓRIO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL” foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP em sua 198ª reunião ordinária, realizada em 18/06/2020.

De acordo com a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa, e pode ser autorizado por até dez anos. Lembramos que ainda, que, de acordo com a Resolução 441/11, **toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado deverá ser submetida para aprovação deste CEP** e que a legislação brasileira veda o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano armazenado em Biorrepositórios.

Atenciosamente,

Profª. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado
 Coordenadora do CEP/FCFRP

