

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RODRIGO FERREIRA SCASSIOTTI

**Utilização de exossomos para melhoria da viabilidade de células-tronco
derivadas da membrana amniótica canina**

Pirassununga
2021

RODRIGO FERREIRA SCASSIOTTI

**Utilização de exossomos para melhoria da viabilidade de células tronco
derivadas da membrana amniótica canina**

(Versão Corrigida)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Pirassununga
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R287u Rodrigo Ferreira, Scassiotti
UTILIZAÇÃO DE EXOSSOMOS PARA MELHORIA DA
VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA MEMBRANA
AMNIÓTICA CANINA / Scassiotti Rodrigo Ferreira ;
orientador Ambrósio Carlos Eduardo. -- Pirassununga,
2021.
50 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Exossomos. 2. Microvesículas. 3. Mesenquimais.
4. Membranas Fetais. I. Carlos Eduardo, Ambrósio,
orient. II. Título.

Certificado da Comissão de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "UTILIZAÇÃO DE EXOSSOMOS PARA MELHORIA DA VIABILIDADE DE CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA", protocolada sob o CEUA nº 6409121219 (ID 001383), sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Ambrósio e equipe; Rodrigo Ferreira Scassiotti** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 18/12/2019.

We certify that the proposal "Use of exosomes as an enhancer for dog amniotic stem cells viability.", utilizing 10 Dogs (10 females), protocol number CEUA 6409121219 (ID 001383), under the responsibility of **Carlos Eduardo Ambrósio and team; Rodrigo Ferreira Scassiotti** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 12/18/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2020** a **01/2021** Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de campanha**
Espécie: **Cães** sexo: **Fêmeas** idade: **1 a 5 anos** N: **10**
Linhagem: **SRD** Peso: **5 a 30 kg**

Local do experimento: O experimento será realizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA - USP, no Laboratório GDTI (Grupo de Desenvolvimento de Terapias Inovadoras).

Pirassununga, 18 de dezembro de 2019

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Autor: SCASSIOTTI, Rodrigo Ferreira

Título: Utilização de exossomos para melhoria da viabilidade de células tronco derivadas da membrana amniótica canina.

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a toda minha família pelo incentivo e confiança em mim depositados. Por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as decisões da minha vida. Por todos os conselhos, por todo o convívio e por fazerem parte do que sou hoje. Por meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço por fazerem parte da minha vida.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio por essa oportunidade, sempre me apoiando, incentivando e direcionando. Pelas considerações, pela paciência e pelas portas abertas. Muito obrigado.

A todos os colegas de laboratório, Priscila, Sarah, Rafael, Matheus, Thiago, Mel, Clésio, Vanessa, Jéssica, Atanásio e Luciana, que sempre me incentivaram e apoiaram durante todo nosso tempo de convívio.

A todos os amigos do CCZ: Edna, Jaque, Sil, Cláudio, Agnaldo e Tânia pelo suporte e convívio diário, por toda a dedicação e por todo o carinho.

Ao Dr. Júlio Galdino por todos os ensinamentos, pela parceria profissional e pela amizade. Muito obrigado por todas as portas que me foram abertas.

Por fim, a todos que não tiveram seus nomes aqui citados, mas que também foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Muito Obrigado.

RESUMO

SCASSIOTTI, Rodrigo Ferreira. **Utilização de exossomos para melhoria da viabilidade de células tronco derivadas da membrana amniótica canina**. 52 f. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

Estudar o processo de comunicação e diferenciação celular é fundamental para o melhor entendimento do organismo como um todo. Para tanto, se faz necessário entender a interação entre células que ocorre por meio da comunicação e transporte de proteínas, lipídeos e materiais genéticos, realizada através da secreção de vesículas extracelulares, como os exossomos. Assim, este trabalho tem por principal objetivo avaliar o efeito da suplementação basal de exossomos em culturas celulares com células-tronco mesenquimais (CTM) amnióticas canina. Foi realizado o isolamento de células derivadas do tecido amniótico de cães, cultura e cultivo das mesmas com meio DMEM suplementado por soro fetal bovino, antibiótico, antifúngico e aminoácidos essenciais, até que atingissem de 80 a 90% de confluência, quando então era realizada nova passagem celular. Também foi realizada a determinação de curva de crescimento. Posteriormente, as células foram caracterizadas e diferenciadas em linhagem adipogênica, condrogênica e osteogênica. Realizou-se o isolamento de vesículas extracelulares através de protocolo de ultracentrifugação e caracterização das mesmas por Nanosight. Exossomos foram suplementados a culturas basais de CTM, padronizadas em placas de 12 poços com concentração de 3×10^4 células por poço, em triplicata técnica e biológica, para avaliação de alterações em padrões de curva de crescimento, determinando-se assim sua capacidade de melhoria em viabilidade celular em passagens naturalmente ineficientes. Os resultados demonstraram um aumento de 15 a 20% na taxa de expansão dos cultivos suplementados com vesículas extraídas em passagens P1 e P2, quando comparadas ao grupo controle, bem como uma maior resistência ao processo de apoptose celular. Tal resultado foi corroborado por análise estatística através de Teste de Dunnett, com $p \leq 0.5$, comprovando a correlação positiva entre a suplementação e taxa de expansão, indicando, desta forma, não só a importância dos exossomos no processo de

comunicação celular, mas também a viabilidade de um protocolo de suplementação de cultivos para fins terapêuticos.

Palavras-chave: Mesenquimais. Membranas fetais. Microvesículas.

ABSTRACT

SCASSIOTTI, Rodrigo Ferreira. **Use of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes to improve the viability of canine amniotic stem cells** 52 f. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

Studying the cellular intercommunication and differentiation process is crucial for a better understanding of the organism as a whole. Therefore, it is necessary to understand the interaction between cells that occurs through the communication and transport of proteins, lipids and genetic materials, carried out through the secretion of extracellular vesicles, such as exosomes. This study aims to evaluate the effect of basal supplementation of exosomes in cell cultures with canine amniotic mesenchymal stem cells (MSC). Mesenchymal Stem Cells derived from amniotic tissue of dogs were isolated and cultivated in cultures supplemented with DMEM medium, fetal bovine serum, antibiotics, antifungal and essential amino acids, until performing cellular passage at 80-90% confluence. The growth curve was determined, presenting peak cell growth in second passage followed by decline until the fifth passage. The cells were then characterized and differentiated into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. Extracellular vesicles were isolated using an ultracentrifugation protocol and characterized by Nanosight. Exosomes were supplemented to MSC cultures medium, standardized in 12-well plates with a concentration of 3×10^4 cells per well, in technical and biological triplicate, to evaluate changes in growth curve patterns, thus determining their ability to improve cellular viability in naturally inefficient passages. The results showed a 15 to 20% increase in the expansion rate of cultures supplemented with vesicles extracted in P1 and P2 passages, when compared to the control group, as well as a greater resistance to the cellular apoptosis process. This result was corroborated by statistical analysis using the Dunnett Test, with $p \leq 0.5$, proving the positive correlation between supplementation and expansion rate, thus indicating not only the importance of exosomes in the cell communication process, but also the feasibility of a culture supplementation protocol for therapeutic purposes.

Keywords: Mesenchymal. Fetal membranes. Microvesicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Útero gravídico coletado por procedimento de ovariossalpingo-histerectomia (OSH) e determinação da idade fetal	30
Figura 2 - Diferenciação de Células tronco mesenquimais em diferentes linhagens germinativas.....	31
Figura 3 - Protocolo de isolamento do tecido amniótico, coleta e cultivo de células tronco mesenquimais	32
Figura 4 - Gráfico da Curva de Crescimento Padrão e “Doubling Time”	33
Figura 5 - Fotomicrografia da morfologia do cultivo celular usado para extração de exossomos	34
Figura 6 - UFC-F de células amnióticas caninas	34
Figura 7 - Protocolo de extração de microvesículas	35
Figura 8 - Gráfico de análise de tamanho de partículas por Nanosight	36
Figura 9 - Cultivo celular com meio suplementado	37
Figura 10 - Gráfico da Suplementação Celular em terceira, quarta e quinta passagem	38
Figura 11 - Cultivo celular em processo de apoptose	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Modelo Crown-Rump utilizado para determinação na idade gestacional dos fetos	22
Quadro 2 - Composição do meio de cultivo utilizado no experimento	23
Quadro 3 - Composição do meio de criopreservação	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Células-tronco mesenquimais	15
2.2	Vesículas extracelulares	17
3	HIPÓTESE	19
4	OBJETIVOS GERAIS	20
4.1	Objetivos específicos	21
5	MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1	Animais	21
5.2	Coleta de embriões	21
5.3	Caracterização de idade gestacional	21
5.4	Coleta e cultivo	22
5.5	Repique e viabilidade celular	23
5.6	Criopreservação celular	24
5.7	Caracterização celular, padronização de dosagens e metodologia de aplicação de exossomos	24
5.7.1	Curva de crescimento	24
5.7.2	Caracterização celular	25
5.7.2.1	Diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica	26
5.7.3	Isolamento, caracterização e cultivo de vesículas extracelulares	27
5.7.4	Análise estatística	28
6	RESULTADOS	29
6.1	Cultivo celular	29
6.1.1	Aquisição e caracterização dos embriões	29
6.1.2	Preparação e cultivo de células de tecido amniótico	31
6.1.3	Criopreservação e curva de crescimento	32
6.2	Isolamento e caracterização dos exossomos	35
6.3	Suplementação com exossomos	37
6.4	Análise estatística dos resultados	39
7	DISCUSSÃO	40
8	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Terapias celulares com células-tronco vem, ao longo dos anos, ganhando grande destaque ao redor do mundo em função de seu grande potencial terapêutico e, acompanhando o avanço tecnológico, têm se mostrado importantes ferramentas no desenvolvimento de novas e inovadoras linhas de pesquisa e como opção viável de tratamento a doenças crônicas. Entretanto, em grande parte devido à natureza de sua obtenção, este tipo de pesquisa está sempre cercado de debates e controvérsias (RIEDEL *et al.*, 2021).

Embora apresentem um potencial de diferenciação tecidual quase ilimitado e grande capacidade de regeneração tecidual, em especial células embrionárias, a sua obtenção muitas vezes requer a manipulação e destruição de embriões, o que gera grande desconforto e conflito ético na medicina humana (PETERS, 2021). Tais linhas de pesquisa já se encontram em estágio mais avançado na medicina veterinária, onde tratamentos comerciais são amplamente utilizados. Salienta-se, entretanto, que pesquisas com este tipo celular carecem de normativas claras de pesquisa e avaliação rígida de resultados, ressaltando assim a importância de novos e aprofundados estudos sobre o tema (MISHRA, 2021).

Frente a este cenário, estudos veterinários utilizando células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas de anexos embrionários vêm ganhando cada vez mais destaque, devido a sua capacidade elevada de diferenciação, baixa tumorigenicidade e características imunomediadoras, apresentando, portanto, diversas vantagens quando comparadas a outros tipos celulares (AMBRÓSIO *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2016; VIDANE *et al.*, 2014; ZOMER *et al.*, 2015).

Acredita-se que muito do potencial de diferenciação destas células esteja relacionado à comunicação e troca de material genético entre células, através da liberação de vesículas extracelulares, em especial os exossomos. Classificadas por tamanho, essas vesículas realizam o transporte de proteínas, lipídeos, DNA e mRNA, sendo, portanto, fundamentais para o processo de multiplicação, desenvolvimento e diferenciação celular (PAOLICELLI; BERGAMINI; RAJENDRAN, 2018; STAHL; RAPOSO, 2018).

Desta forma, entender o mecanismo de funcionamento destas vesículas e a forma como estas influenciam o meio ao seu redor é fundamental para o

completo entendimento do processo de diferenciação celular e etapa chave para o avanço desta linha inovadora de pesquisa, possibilitando não só uma manipulação precisa do processo de diferenciação tecidual, mas também possibilitando o surgimento e aperfeiçoamento de formas terapêuticas, de criação tecidual *in vitro*, de transplantes alógenos, da elucidação de mecanismos de organização celular e da expansão do conhecimento do organismo como um todo (DOYLE *et al.*, 2019; STAHL *et al.*, 2018; WORTZEL *et al.*, 2019).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células-tronco mesenquimais

Descritas pela primeira vez por Friedenstein, Gorskajak e Kalajina (1974), as células tronco mesenquimais (CTM) vêm sendo desde então objetivo de muitas pesquisas e especulações, em função de sua alta capacidade de replicação e diferenciação em outros tipos celulares e pelo potencial que tal característica representa no combate e cura de doenças degenerativas e traumáticas, já sendo amplamente utilizadas na medicina veterinária em modelos experimentais e clínicos em diversas espécies, buscando-se obter informações à respeito da eficácia deste tipo de tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2017; RIEDEL *et al.*, 2021; VENKATRAMAN *et al.*, 2016).

Definidas por suas propriedades funcionais, em especial pelo grande potencial de auto-renovação, proliferação e capacidade de responder a estímulos externos, as células tronco mesenquimais apresentam a habilidade única de diferenciação em linhagens celulares com funções distintas (UMEZAWAA *et al.*, 2019).

Células tronco embrionárias são consideradas totipotentes quando coletadas durante as divisões iniciais de desenvolvimento do zigoto, embrião com até 32 células, apresentando a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular de um organismo totalmente funcional, incluindo células do sistema nervoso e tecidos de suporte ao embrião (LIU *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2021), ou pluripotentes quando coletadas da massa celular interna do blastócito, apresentando a capacidade de diferenciação celular completa com exceção de tecidos de apoio ao embrião (AMBRÓSIO *et al.*, 2019).

Já as células tronco mesenquimais (MSC) são consideradas células multipotentes, apresentando um potencial mais limitado de diferenciação, geralmente designadas de acordo com o tipo tecidual do qual derivam, podendo ser isoladas em diversos tecidos adultos como pele e gordura, mas comumente obtidas através de coletas em medula óssea (LIU *et al.*, 2016; ZOMER *et al.*, 2015).

Porém, a utilização de MSCs derivadas de anexos embrionários e tecidos de suporte ao embrião vem ganhando destaque em pesquisas, uma vez que células derivadas de tais tecidos apresentam uma capacidade de diferenciação

elevada e não estão sujeitas a implicações éticas relacionadas a coleta de material, visto que todo este material é geralmente descartado como lixo biológico. Acredita-se ainda que por se tratar de anexos placentários, tais células apresentam baixa tumorigenicidade e características imunomediadoras, diminuindo, potencialmente, o risco imunológico de rejeição durante transplantes alogênicos (CARDOSO *et al.*, 2016; VIDANE *et al.*, 2014; ZOMER *et al.*, 2015).

As MSCs derivadas do âmnion são de particular interesse uma vez que a camada epitelial do âmnion é originada diretamente da trofoderme, o que leva alguns pesquisadores a acreditarem que tais células possam reter algumas características de células epiblasticas, notavelmente a pluripotencialidade (RUTIGLIANO *et al.*, 2013). Apesar de serem consideradas multipotentes, algumas MSCs expressam alta quantidade de marcadores de superfície característicos de ESCs pluripotentes, como OCT4, atuante no desenvolvimento inicial de mamíferos e fundamental no desenvolvimento do embrioblasto, SOX2, atuante na regulação da expressão de OCT4 e o NANOG, marcador necessário para a auto-renovação de células-tronco. Tais fatores de transcrição, expressos durante as fases iniciais do desenvolvimento do embrião, são fundamentais para a manutenção da pluripotencialidade celular. (CARDOSO *et al.*, 2017; DOMINICI *et al.*, 2006; GONÇALVES; AMBRÓSIO; PIEDRAHITA, 2014; ZOMER *et al.*, 2015).

Fatores como tempo e idade possuem um efeito direto na viabilidade de células cultivadas em laboratório, afetando de modo negativo a taxa de expansão celular e a capacidade de sobrevivência das células *in vitro*, em especial após as três primeiras passagens. Para se obter um crescimento celular adequado se faz necessário a suplementação do meio basal com produtos de origem animal, normalmente utilizando-se soro de cultura para suplementação hormonal e fatores de crescimento e proliferação, suprimindo assim as necessidades nutricionais e favorecendo o transporte de proteínas, proporcionando um meio de cultura favorável ao crescimento celular. O soro fetal bovino (FBS) é o meio de suplementação mais utilizado atualmente para cultura celular devido ao seu baixo nível de anticorpos e alta concentração de fatores de crescimento (FANG *et al.*, 2017).

Durante seu processo natural de desenvolvimento, as células metabolicamente ativas produzem, secretam e recebem diversos componentes em relação ao meio externo, como lipídeos, proteínas e vesículas extracelulares, alterando o meio a sua volta através de processos físicos e químicos que possibilitam seu desenvolvimento e diferenciação. Entre estes componentes, destaca-se as vesículas extracelulares (DINH; LEWIS, 2019; NEWTON *et al.*, 2017).

2.2 Vesículas extracelulares

Segundo Schneider e Simons (2013), as vesículas extracelulares (VEs), atuam na comunicação intercelular, e são subdivididas de acordo com seu tamanho ou processo de formação, incluindo corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos. Corpos apoptóticos apresentam dimensão superior a 1000 nm, microvesículas possuem de 150 – 1000 nm, enquanto exossomos apresentam 30 – 150 nm de diâmetro (DOYLE; WANG, 2019; PANDA *et al.*, 2021; SANGANI *et al.*, 2021).

Os exossomos, liberados através da exocitose de vesículas intraluminal, vêm ganhando notoriedade por sua capacidade de transferência de RNA funcional entre células, apresentando importante função na expressão gênica. Estudos demonstram que este material genético auxilia em processos de reparação e proteção de tecidos lesionados, o que têm levantado grande interesse dentro da terapia regenerativa (PAOLICELLI; BERGAMINI; RAJENDRAN, 2018; REN *et al.*, 2020; STAHL; RAPOSO, 2019; WORTZEL *et al.*, 2019).

Exossomos podem ser identificados através de marcadores como Rab GTPases, Annexins and ESCRT 0, I, II and III, associados a fusão e transporte de membranas (ZHANG *et al.*, 2015) e refletem condições de suas células parentais, mudando de acordo com padrões de patogenicidade, o que os torna partículas de interesse como potenciais marcadores de doenças degenerativas (PAOLICELLI; BERGAMINI; RAJENDRAN, 2018).

Os exossomos funcionam como transportadores de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e microRNAs entre as células, interagindo com células alvo através de receptores de membrana, modificando, assim, o fenótipo das células

receptoras e o micro-ambiente que as envolve, através da estimulação de receptores de fatores de crescimento e transcrição de proteínas regulatórias, de modo a influenciar a expressão genética de células vizinhas (STAHL; RAPOSO, 2019; ROBALLO; AMBRÓSIO; SILVEIRA, 2021).

Segundo Hadley *et al.* (2018), existe grande interesse científico na utilização terapêutica das células tronco devido ao seu potencial de regeneração tecidual. Mas estudos recentes demonstram que este efeito é, na verdade, mediado pelos exossomos liberados por estas células. Exossomos derivados de células tronco, assim como suas células parentais, demonstraram apresentar características que auxiliam na estimulação da angiogênese e regeneração celular, na supressão em vias de apoptose e na modulação de imunidade em lesões teciduais crônicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DERKUS; EMREGUL; EMREGUL, 2017). Porém, diferentemente de células tronco, exossomos não apresentam características imunorreativas, conseguem atravessar barreiras biológicas e não apresentam risco de diferenciação indesejada, sendo considerados, portanto, como potenciais alternativas para a utilização de células tronco na medicina regenerativa (HADLEY *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2020).

Desta forma, exossomos derivados de MSC's já vem sendo utilizados no tratamento terapêutico de diversas doenças na medicina regenerativa humanas, incluindo doenças pulmonares, fibrose hepática, osteoartrite, lesão em cordão espinhal, miocardites, entre outras, em função de sua baixa tomogênicidade, resposta imune e efeito citotóxico quando comparado a outros métodos de terapia celular (GHAFOURI-FARD *et al.*, 2021).

3 HIPÓTESE

Exossomos derivados de células tronco mesenquimais de membrana amniótica canina apresentam potencial de melhorar a viabilidade e desenvolvimento de culturas de células-tronco em terceira, quarta e quinta passagem, período naturalmente ineficiente.

4 OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo realizar uma avaliação comparativa de cultivos celulares com células-tronco mesenquimais derivadas do âmnion de cães, em diferentes passagens, suplementados por vesículas extracelulares de origem mesenquimal, quando comparados aos grupos controle não suplementados, buscando-se determinar melhorias de viabilidade celular em passagens naturalmente ineficientes, terceira, quarta e quinta passagens, a fim de contribuir na crescente busca por novas e inovadoras fontes de células tronco, contribuindo, assim, para o avanço de pesquisas com terapia celulares e no desenvolvimento de biotecnologias na medicina veterinária e humana.

4.1 Objetivos específicos

- Estabelecer um banco de células-tronco derivadas de membrana amniótica canina, através de processo de isolamento, cultivo e cultura;
- Padronizar um protocolo de suplementação com exossomos à cultivos celulares;
- Aplicar exossomos extraídos de células tronco mesenquimais de âmnion canino em culturas celulares de mesma linhagem em passagens naturalmente ineficientes;
- Determinar a viabilidade celular em culturas suplementadas com exossomos;
- Analisar viabilidade de utilização de exossomos na suplementação de cultivos celulares.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA Nº 6419121209) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, FZEA/USP, do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

5.1 Animais

Para a realização deste experimento foram coletados úteros gestantes de 10 cadelas sem raça definida (SRD), submetidas a procedimento de histerectomia ovariana (OSH) através de programas de controle populacional municipal de cães na região de Pirassununga-SP em período gestacional médio de 30-50 dias. Este material seria usualmente descartado como lixo biológico.

5.2 Coleta de embriões

Os úteros gravídicos foram transportados até o Laboratório de Células-tronco e Terapia Gênica (GDTI) do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – FZEA/USP, em caixas de isopor contendo gelo reciclado e controle de temperatura, devidamente embalados e identificados.

Os úteros e cornos uterinos foram lavados com solução PBS (Phosphate Buffer Solution) contendo penicilina/estreptomicina a 5%, para a retirada de sujidades. Após este procedimento, foram incisados e dissecados os cornos uterinos até a exposição e posterior retirada dos fetos.

5.3 Caracterização da idade gestacional

Em fluxo laminar e sobre condições estéreis seguiu-se o isolamento do feto e cultivo das células germinativas embrionárias. O tempo gestacional de cada feto foi definido de acordo com protocolo adaptado de Evans e Sack (1973) e Pieri *et al.* (2015), através de técnica de Crown-Rump e avaliação macroscópica de fatores como formação de pálpebras e dígitos, presença de

pelos e coxins, glândulas mamárias e diferenciação de genitália externa (Quadro 1).

Quadro 1 - Modelo Crown-Rump utilizado para determinação na idade gestacional dos fetos baseado em protocolo adaptado de Pieri *et al.* (2015).

Idade Gestacional - Modelo de Crown-Rump		
Desenvolvimento Embrionário	Cães	Crown-rump (MM)
Desenvolvimento completo de cabeça e cauda	26-27	20
Desenvolvimento das cavidades nasais	28-32	22-30
Retina pigmentada Corpo totalmente formado Diferenciação das genitálias	35	30-35

Fonte: Própria autoria.

5.4 Coleta e cultivo celular

O âmnion foi removido mecanicamente e submetido a lavagem com solução salina sob condições estéreis, utilizando PBS (Phosphate Buffer Solution) com 2% de antibióticos (penicilina e estreptomicina). Iniciou-se então um processo de maceração com o auxílio de lâminas de bisturi até a obtenção de uma amostra homogênea em torno de 2 mm de diâmetro. Posteriormente, a amostra foi submetida a um processo de digestão enzimática através da adição de colagenase tipo I (1-2 mg/ml; C2674-100MG, Sigma-Aldrich) e permaneceu em estufa à temperatura de 37°C por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Subsequentemente, as amostras de tecido foram inativadas com 1 ml de meio de cultura DMEM (Dubeccos Modifield Eagles Medium - Sigma) e centrifugadas por 5 minutos em 1600g (Quadro 2).

Quadro 2 - Composição do meio de cultivo utilizado no experimento

Componentes	Porcentagem	50 mL
Meio DMEM	81%	40,5 mL
SFB	15%	7.5 mL
Pen./Strepto.	1%	500 µL
L-glutamina	1%	500 µL
Aminoácidos Não Essenciais	1%	500 µL
Anfotericina	1%	500 µL

Fonte: Própria autoria.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1mL de meio DMEM, suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 1% de solução antibiótica - penicilina G 10.000 U/ml, 25 mg/ml estreptomicina 10.000 mg/ml, 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma), 1% de L-glutamina (Invitrogen) e então transferido para uma garrafa de cultivo de 75cm² (Corning REF 430720U) e incubado com meio DMEM à temperatura de 38,5°C, segundo a metodologia de Cardoso *et al.* (2016) por 48 horas.

5.5 Repique e viabilidade celular

A cada 48 horas de cultivo as células não aderentes foram removidas e o meio substituído até que atingissem 80 a 90% de confluência. Após atingir a confluência estabelecida, as células foram colhidas, descartando-se o sobrenadante e adicionado solução de tripsina (Tryple Express, Invitrogen, cat. No 12604) a 0.25%, que foram posteriormente incubadas em estufa a 38,5°C por 15 minutos até que as células, em visualização ao microscópio (Labomed Modelo TCM400), não se apresentassem mais aderidas à garrafa de cultivo. O conteúdo, então, foi transferido para um tubo Falcon (15 ml) para posterior centrifugação por 5 minutos a 1600g. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1 ml de meio de cultivo, realizando então a contagem celular e o replaqueamento, retornando ao cultivo sob as mesmas condições. A contagem e viabilidade celular foi realizada antes e após o congelamento em câmara de Neubauer (ERCOLIN *et al.*, 2016).

5.6 Criopreservação celular

As células a serem criopreservadas foram distribuídas em densidade de 2×10^6 em criotubos com capacidade de 2 ml, adicionando-se proporcionalmente: 45% de DMEM, 45% de soro fetal bovino e 10% DMSO (Dimetil-Sulfóxido) (ERCOLIN *et al.*, 2016) (Quadro 3). Os criotubos foram alocados em container de congelamento (Mr. Frosty), permitindo a diminuição gradual da temperatura e armazenados a -80°C overnight. Após este período, os criotubos foram transferidos para um tanque contendo nitrogênio líquido para armazenamento, formação de banco celular e posterior utilização.

Quadro 3 - Composição do meio de criopreservação baseado em protocolo adaptado de Ercolin *et al* (2016).

Componente	Porcentagem	1mL
Meio DMEM	45%	450 μL
SFB	45%	450 μL
Dimetil-Sulfóxido	10%	150 μL

Fonte: Própria Autoria.

5.7 Caracterização celular, padronização de dosagens e metodologia de aplicação de exossomos

A fim de se verificar potenciais alterações em taxa de crescimento, tempo de vida celular, mudanças morfológicas e outros parâmetros de viabilidade celular, foi realizada curva de crescimento padrão em triplicata técnica e biológica. Posteriormente o mesmo processo foi realizado com cultivos em terceira, quarta e quinta passagem, suplementados com meio enriquecido por exossomos, de modo a avaliar, de forma individual e controlada, alterações significativas nos parâmetros descritos. Os resultados foram analisados em caráter individual e comparativo, por análise estatística, buscando protocolos que aumentem a viabilidade celular.

5.7.1 Curva de crescimento

Para a determinação de curvas de crescimento, utilizou-se protocolo semelhante ao protocolo adaptado por Vidane *et al.* (2014), através da tripsinização celular e posterior contagem em Câmara de Neubauer em cada passagem celular, a fim de se obter informações e determinar protocolos de aplicação de exossomos em células cujo crescimento celular se mostre reduzido.

Células em primeira passagem (P1) foram plaqueadas em densidade de 3×10^4 em triplicatas. Para contagem em Câmara de Neubauer, foram adicionados 10 μ L de meio de cultivo contendo células resuspendidas e realizada a contagem dos quatro grandes quadrantes da extremidade da câmara, multiplicando-se o valor pelo fator de diluição e pelo fator de correção. O valor resultado foi dividido pelo número de quadrantes contados. O processo foi repetido em todas as passagens, em densidade de 3×10^4 , a cada 72h, até que o número celular contado não atingisse o limiar celular mínimo de 30 mil células.

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ Total de Células Contadas} \times \text{Fator de Diluição} \times 10^4}{\text{N}^\circ \text{ de Quadrantes Contados}}$$

Foram realizadas, ainda, avaliação do tempo de duplicação (Doubling time) através da divisão do tempo de cultivo pelo número de células duplicadas, e avaliação da capacidade de formação de colônias (UFC), através do plaqueamento células em densidade de 3×10^3 , 3×10^4 e 3×10^5 em placa de 100mm, encubadas em estufa a 37°C por 14 dias, quando então era lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% por 30min e posteriormente coradas com Giemsa 0,1% por 15 min em temperatura ambiente, de acordo com protocolo de Vidane *et al.* (2014)

5.7.2 Caracterização celular

A caracterização das células tronco mesenquimais foi realizada através de avaliação de diferenciação celular *in vitro*, avaliando-se a sua capacidade de

diferenciação em diferentes linhagens: osteogênica, adipogênica e condrogênica, através da utilização de kit de diferenciação comercial StemX Vivo™ da R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EUA, CCM007). Foram utilizadas células em terceira passagem (P3), de acordo com protocolo adaptado por Vidane *et al.* (2014).

5.7.2.1 Diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica

Para processo de diferenciação adipogênica, as células obtidas foram plaqueadas em placas de oito poços (K12-008, KASVI), em concentração de 1×10^4 células por poço, em meio DMEM e cultivadas até atingirem confluência de 90%. Foi adicionado meio base osteogênico/adipogênico (Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic CCM007), realizando a substituição do meio a cada 4 dias. Após 15 dias o meio foi descartado e os poços lavados em duas etapas com PBS x1 por 5 minutos e as células então fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos. Realizou-se nova lavagem, em três etapas, com PBS x1 por 5 minutos. Foi corada com Sudan Black por 15 minutos em ambiente escuro e por fim uma nova lavagem, em três etapas, com PBS x1 por 5 minutos.

Para diferenciação condrogênica, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços (K12-024, KASVI), em concentração de 8×10^4 células por poço, em quatro poços. Foram adicionados à três poços 300µL de meio diferenciador condrogênico (5,67mL de Osteocyte/Chondrocyte StemPro differentiation basal médium + 630µL de Chondrogenesis supplement + 50µL de gentamicina) e no quarto poço foi adicionado meio DMEM como grupo controle, realizando cultivo por 15 dias e troca do meio a cada 48 horas. O meio foi removido, a placa lavada em solução PBS X1 e as células fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 30 minutos. Após nova lavagem, aos poços foram adicionados Alcian Blue por 30 minutos. Realizou-se então uma nova lavagem com água destilada.

Para diferenciação osteogênica, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços, em concentração de 3×10^5 células por poço, em quatro poços. Foram cultivadas com meio DMEM até alcançarem 80% de confluência e então adicionado meio diferenciador osteogênico (6,75mL de Osteocyte/Chondrocyte StemPro differentiation basal médium + 750µL de osteogenesis supplement + 50µL de gentamicina) em três poços, sendo o último cultivado com meio DMEM

como grupo controle. Foi realizado cultivo por 21 dias com troca de meio a cada 4 dias. Os poços foram lavados com solução PBS X1 e as células fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos. Após lavagem com água destilada, em duas etapas, foi adicionado aos poços Alizarin Red por três minutos. Finalizado com nova lavagem com água destilada em três etapas.

5.7.3 Isolamento, caracterização e cultivo de vesículas extracelulares

Para o isolamento e caracterização de vesículas extracelulares foi utilizado protocolo de extração adaptado de Roballo, Ambrósio e Silveira (2017), realizando a substituição do meio de cultivo em células P1 e P2 com 80% de confluência, por um meio livre de VE's por um período de 48h. Em 3 placas de 12 poços referentes a 3 animais distintos, foram distribuídas células em P1 e P2, em concentração de 30.000 células por poço. A cada poço foi adicionado 1ml de Meio livre de VE's. Após 72 horas o meio foi removido e submetido a processos consecutivos de centrifugação diferencial à 300g durante 10 min, 2.000 g durante 10 minutos e 16.500 g durante 30 min, sendo o pellet descartado e o sobrenadante centrifugado respectivamente. Posteriormente as vesículas foram armazenadas em temperatura de -80°C. Após descongelamento as amostras foram submetidas a filtração a 0,22µm em filtro de seringa (KASVI K18-230), pesadas e submetidas ao processo de ultracentrifugação (Optima XE-90 Ultracentrifuge), a 119700g por 70min a 4°C. O sobrenadante foi removido e ressuspensionado em 2 ml de PBS, e então foi realizada nova centrifugação em mesmas condições.

A caracterização da amostra foi realizada através de Nanosight (NS300, NTA 3.1 Build 3.1.45; Malvern), avaliando-se tamanho e concentração das nanopartículas através do meio de cultivo extraído em culturas P0, P1 e P2.

5.7.4 Suplementação com exossomos

Para a suplementação com exossomos, foram utilizadas placas de 12 poços contendo células em P3, em concentração de 3×10^4 células por poço, que foram suplementadas na proporção de 1:1 com meio enriquecido com vesículas extraídas respectivamente quando em P1 e P2. A suplementação foi realizada em triplicata técnica e biológica, correspondendo a 3 amostras distintas de

cultivos celulares de amnio de 3 diferentes animais, tanto em P1 quanto em P2. Paralelamente foram plaqueadas, na mesma proporção, um grupo controle em triplicada que não recebeu suplementação, somente meio de cultivo DMEM.

A cada 72 horas foi realizado processo de repique celular, onde as células eram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e posteriormente replaqueadas na proporção de 3×10^4 células por poço. Esta etapa foi repetida em cada passagem, realizando-se uma nova suplementação, até que as células entrassem em processo de senescência. Todos estes cultivos foram realizados sem a adição de fatores de crescimento adicionais e utilizando-se Soro Fetal Bovino livre de microvesículas.

5.7.5 Análise estatística

Para verificação estatística, as amostras suplementadas foram comparadas a amostras de controle, a fim de verificar mudanças significativas em taxa de expansão e tempo crescimento em passagens P3, P4 e P5, passagens naturalmente ineficientes.

Os resultados compilados foram analisados por teste paramétrico de comparação das variâncias (ANOVA), e por Teste de Dunnett, com nível de significância de $p \leq 0,5$.

6 RESULTADOS

6.1 Cultivo celular

O processo de cultivo celular, embora com algumas intercorrências, se mostrou eficiente e os protocolos utilizados replicaram os resultados esperados no processo.

6.1.1 Aquisição e caracterização dos embriões

O procedimento de ovário salpingo histerectomia (OSH) foi realizado de forma adequada e sem intercorrências, respeitando os protocolos anestésicos e cirúrgicos. Em protocolo pré-anestésico utilizou-se associação de Cloridrato de Tramadol (1-4mg/kg/IM) e Acepromazina (0,05mg/kg/IM); indução e manutenção anestésica por Propofol (5mg/kg/EV) e Isoflurano (1,5-2,5%/Inalatória) e medicação pós-cirúrgica com Cefalexina (20-30mg/kg/Oral/BID), Meloxicam (0,1-0,2mg/kg/Oral/SID) e Cloridrato de Tramadol (1-4mg/kg/Oral/SID). Os úteros gravídicos foram isolados, embalados e identificados de forma estéril e o rápido transporte, em temperatura ideal e tempo inferior a 2hs, garantiu a viabilidade do tecido embrionário (Figura 1).

A utilização de antibióticos em solução salina (PBS) garantiu a limpeza da amostra permitiu que o isolamento do tecido amniótico ocorresse sem contaminações.

Figura 1 – Útero gravídico coletado por procedimento de ovariossalpingo-histerectomia (OSH) e determinação da idade fetal



Fonte: Própria autoria.

Legenda: A) Úteros gravídicos em terço final, 40-50 dias, coletado por procedimento de OSH. B) Anexos ambrionários envolvendo o embrião anteriormente a remoção do mesmo para coleta do tecido amniótico. C) Membrana amniótica, envolta ao feto, anterior a remoção. D) Determinação da idade fetal por técnica de Crown-Rump.

Em fluxo laminar, o embrião foi cuidadosamente exposto e a membrana amniótica isolada e retida, dando-se preferência a região dorsal do feto e evitando-se assim a presença excessiva de células hematopoiéticas.

Já com o tecido amniótico isolado, realizou-se a verificação dos fetos quanto a idade gestacional, utilizando-se técnica de Crown-Rump e análise macroscópica segundo protocolos de Evans e Sack (1973) e Pieri *et al.* (2015) conforme demonstrado na figura anterior. Foi possível, desta forma, em conjunto com a avaliação do histórico dos animais, determinar com precisão a idade gestacional dos embriões.

6.1.2 Preparação e cultivo de células de tecido amniótico

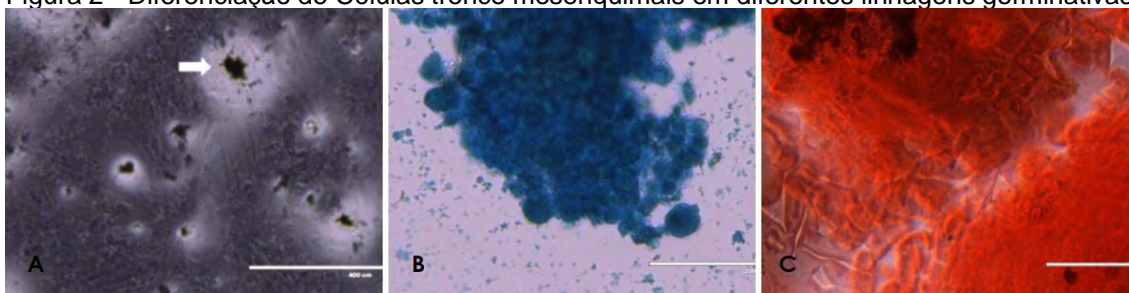
Notou-se que a associação de antimicrobianos à solução salina durante as recorrentes etapas de lavagem do tecido diminuiram consideravelmente o risco de contaminação.

Inicialmente notou-se grande quantidade de células de formato arredondado no sobrenadante, porém, após as primeiras 48 horas de cultivo, as células já se apresentavam, em sua maioria, aderidas ao plástico e com formato fibroblastoide.

Notou-se também que o tempo sob ação de solução de collagenase tipo I em estufa até digestão enzimática ideal da amostra variou de uma a três horas, sendo necessário a homogeneização em intervalos de tempo de 30 min para melhorar a eficiência do processo. Já em cultivo, sob mesmas condições de temperatura e taxa de CO₂ (38°C, 5% de CO₂ e 80% umidade relativa), notou-se que algumas amostras apresentavam tempo de desenvolvimento mais lento, levando maior número de dias para que determinados cultivos alcançassem 80 a 90% de confluência.

Para caracterização celular foram realizadas diferenciação de MSC em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, de acordo com protocolo anteriormente descrito. Notou-se, da diferenciação adipogênica, a presença de vacúolos intracitoplasmáticos, não apresentando, nas placas controle, coloração de vacúolos. Durante diferenciação osteogênica, notou-se deposição de mineral extracelular e na diferenciação condrogenica, a presença de microfibras colagenosas. (Figura 2).

Figura 2 - Diferenciação de Células tronco mesenquimais em diferentes linhagens germinativas

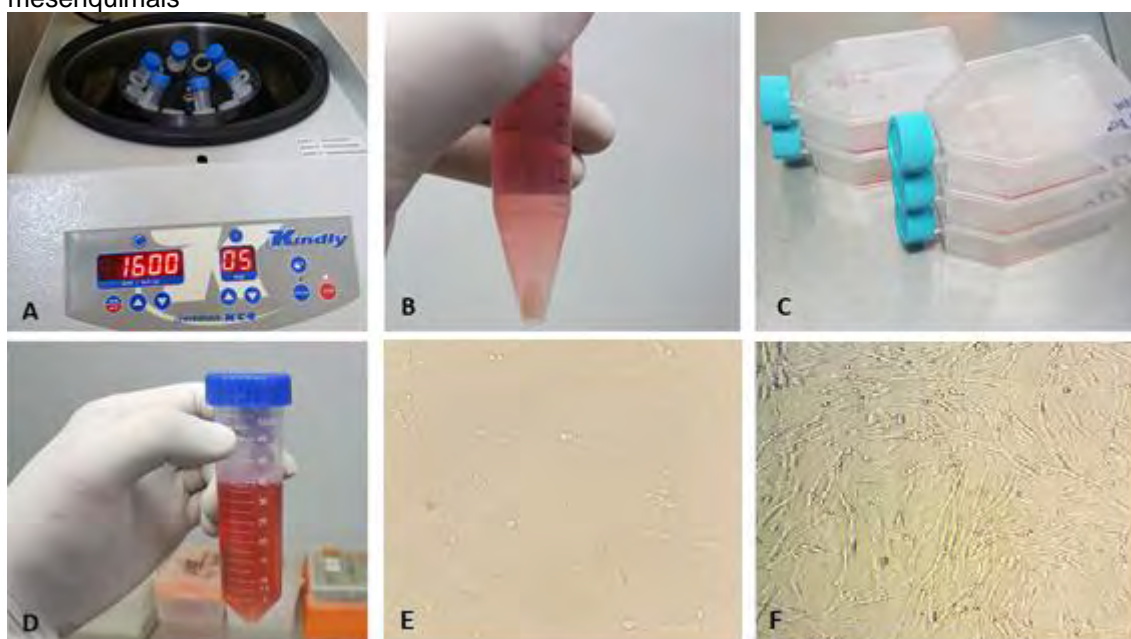


Fonte: Acervo GDTI

Legenda: Diferenciação de células tronco mesenquimais em linhagens A) Adipogênica, coradas com Sudan Black. B) Condrogênica, coradas com Alcian Blue. C) Osteogênica, corada com Alizarim Red.

Os cultivos foram monitorados, verificando-se crescimento celular, apoptose, contaminações e ausência de fungos (Figura 3). Em passagens iniciais, P0 e P1 e P2 observou-se alta taxa de expansão e crescimento celular, atingindo 70-80% de confluência nas primeiras 96 horas. Notou-se, entretanto, um aumento gradativo em tempo de cultivo até que fossem atingidos 80% de confluência em passagens, P3, P4 e P5.

Figura 3 – Protocolo de isolamento do tecido amniótico, coleta e cultivo de células tronco mesenquimais



Fonte: Própria autoria.

Legenda: A) Amostra resuspendida em meio de cultivo para inativação da Colagenase tipo I, passando por centrifugação para formação do pellet celular. B) Pellet celular após centrifugação. C) Amostra encubadas em garrafa de cultivo para expansão celular. D) Meio de cultivo substituído a cada 48hs. E) Células amnióticas em cultivo apresentando pouca confluência. F) Células amnióticas em cultivo apresentando confluência elevada.

6.1.3 Criopreservação e curva de crescimento

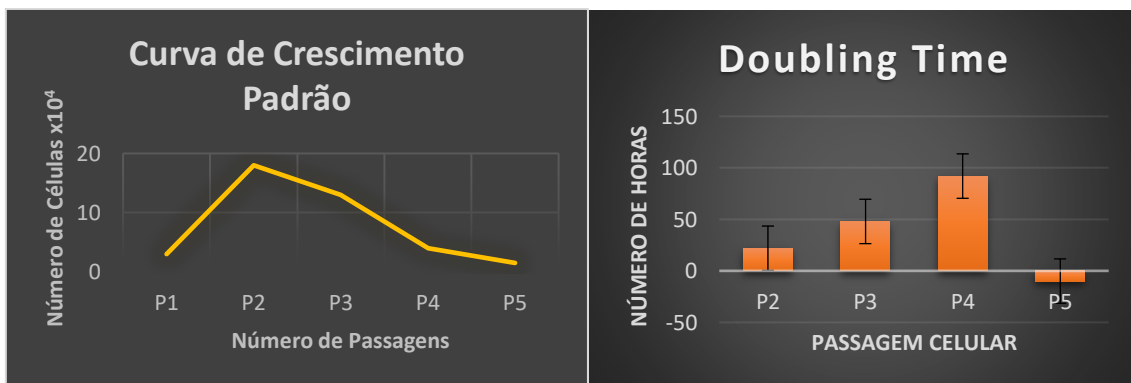
Células amnióticas em cada uma das passagens foram criopreservadas para estoque amostral e formação de banco celular. A contagem em câmara de

Neubauer foi realizada antes e após o processo de criopreservação com uma margem de inviabilização pós-criopreservação estimada em 15%.

Durante a curva de crescimento padrão, foi observado um pico de crescimento em P2, com declínio acentuado até P5, onde já não atingiam o limiar necessário para novas passagens, atingindo assim processo de senescência.

Por “Doubling Time” notou-se uma latência na taxa de expansão, necessitando maior número de dias para duplicação a cada passagem. (Figura 4).

Figura 4 - Gráfico da curva de crescimento padrão e “Doubling Time”

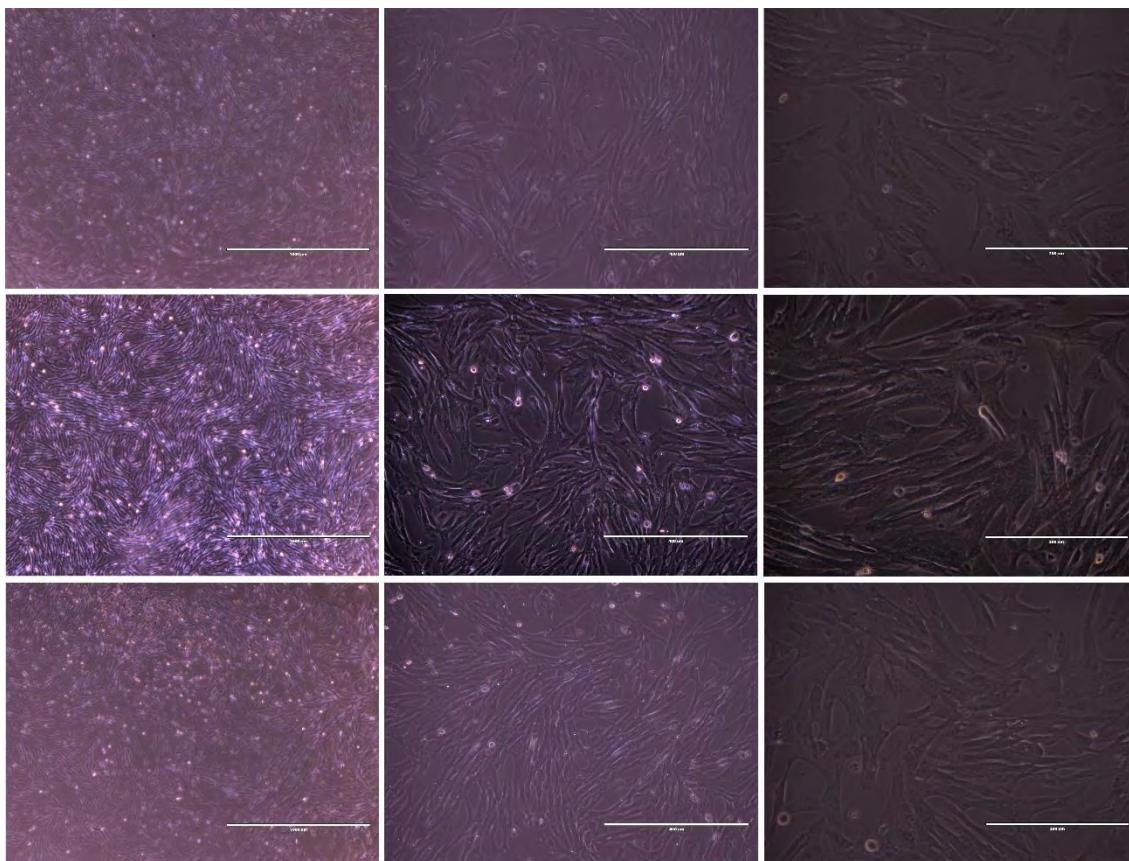


Fonte: Própria autoria.

Legenda: Curva de crescimento de células tronco amniótica canina, mostrando pico de atividade metabólica celular em P2, com posterior declive em P3, P4 e P5, entrando em processo de senescência. Doubling Time determinando o tempo em que população celular leva para duplicar o número de células.

Verificou-se que, após o processo de criopreservação, houve uma baixa expansividade em células nas primeiras 48h, e uma taxa de morte celular de 15%. As células tronco amnióticas possuíam morfologia típica fibroblastoide (Figura 5), capacidade de aderência ao plástico e capacidade de formação de colônias (UFC-F) (Figura 6).

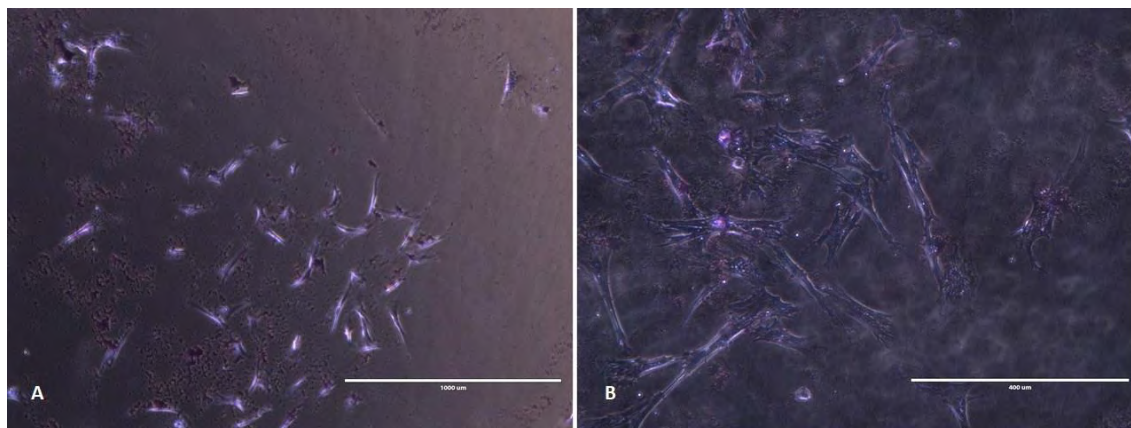
Figura 5 – Fotomicrografia da morfologia do cultivo celular usado para extração de exossomos, em primeira passagem.



Fonte: Própria autoria.

Legenda: A), B) e C) Animal 1; fotomicrografia em 1000um, 400um e 200um respectivamente. D), E) e F) Animal 2; fotomicrografia em 1000um, 400um e 200um respectivamente. G), H) e I) Animal 3; fotomicrografia em 1000um, 400um e 200um respectivamente.

Figura 6 - UFC-F de células amnióticas caninas



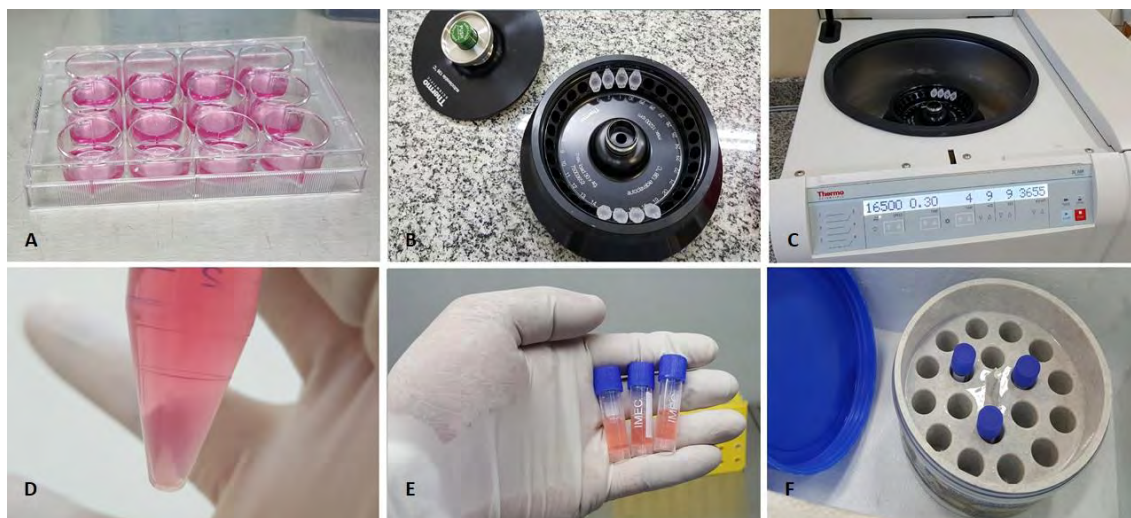
Fonte: Própria autoria.

Legenda: Fotomicrografia de células em teste de Unidade Formadora de Colônia, corado com Giemsa, apresentando formação de colônias e formato fibroblastoide. A) 1000um. B) 400um.

6.2 Isolamento e caracterização dos exossomos

Para a extração das vesículas, todas as amostras foram submetidas a protocolo de centrifugação diferencial e ultracentrifugação (Figura 7), e a caracterização se deu através de análises por Nanosight para mensuração e análise de tamanho e concentração. Verificou-se que todas as amostras possuíam vesículas com tamanho inferior a 150nm de diâmetro (Figura 8), sendo, portanto, classificadas como exossomos de acordo com os critérios adotados pela literatura atual e, desta forma, aptas a serem adicionadas como suplementação à cultivos celulares.

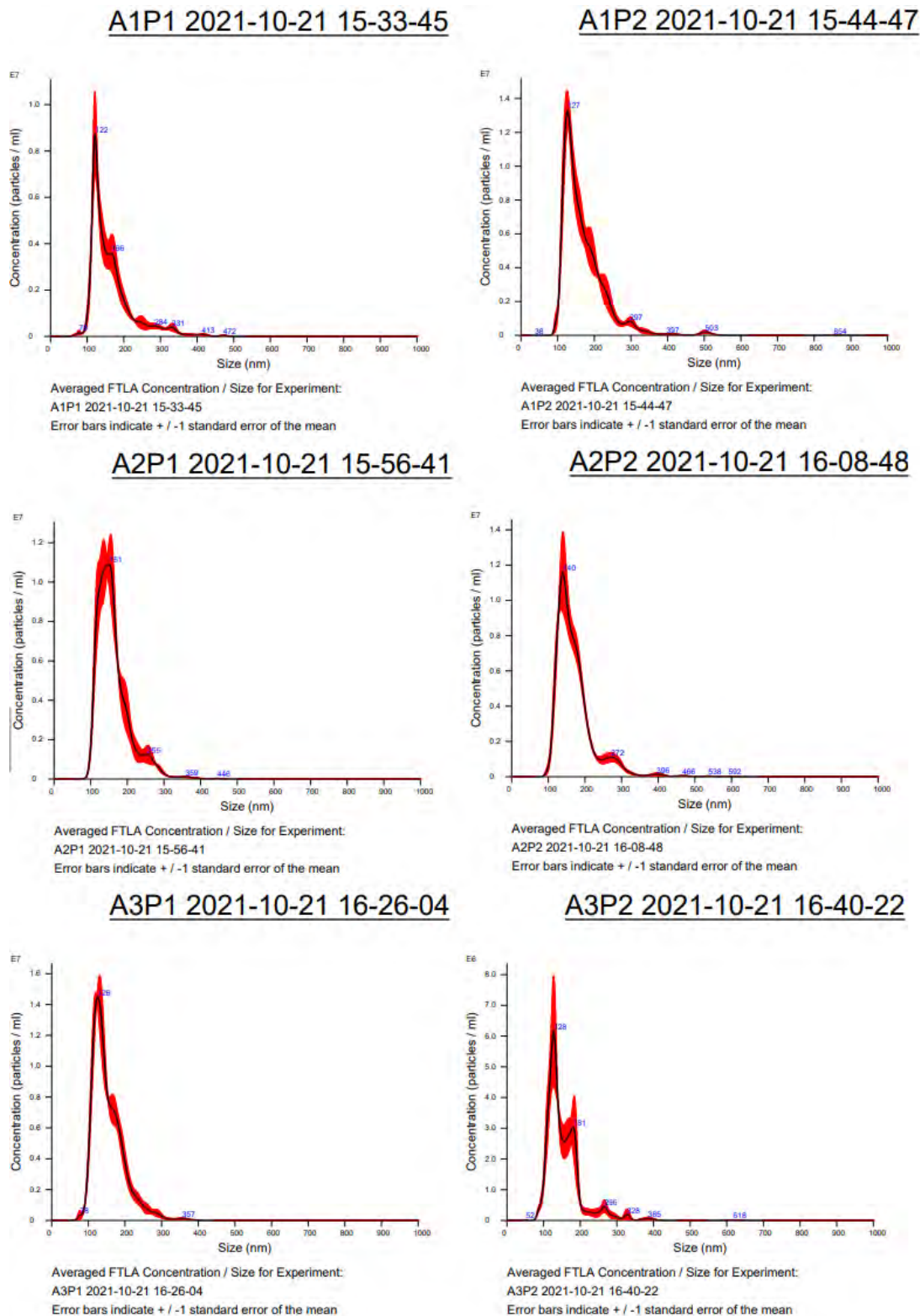
Figura 7 - Protocolo de extração de microvesículas



Fonte: Própria autoria.

Legenda: A) Células em cultivo em placa de 12 poços com meio livre de V.E.'s, a serem utilizadas para extração de microvesículas. B) Meio de cultivo coletado em eppendorf, em processo de centrifugação diferencial em três etapas. C) Centrifugação diferencial em velocidade 16500 g, a 4°C, por 30 minutos. D) Formação e descarte do pellet; coleta do meio de cultivo para criopreservação. E) Meio de cultivo pós centrifugação diferencial, em contêiner de congelamento a -80°C. F) Meio de cultivo pós centrifugação diferencial, a ser armazenado a temperatura de -80°C.

Figura 8 – Gráfico de análise de tamanho de partículas por Nanosight



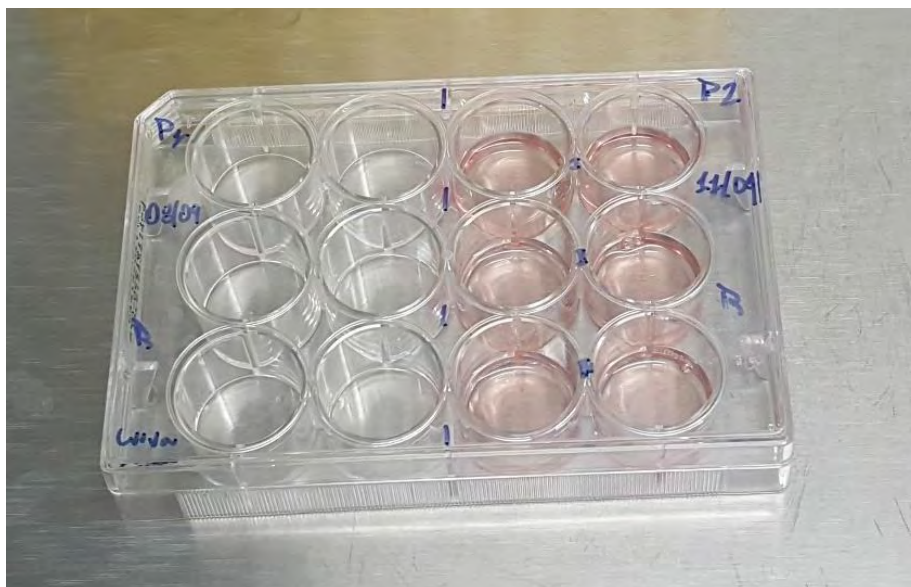
Fonte: Própria autoria.

Legenda: Realização de análise de partículas por Nanosight para caracterização por tamanho anteriormente a suplementação dos meios de cultivo. Verifica-se que as amostras apresentavam tamanho (inferior a 150nm) e concentração média adequada ao esperado de células em primeira e segunda passagem.

6.3 Suplementação com exossomos

A suplementação com exossomos foi realizada com sucesso (Figura 9) através do protocolo anteriormente descrito, utilizando-se paralelamente meio suplementado por exossomos em meio de cultivo livre de VE's em amostras de mesma linhagem. O meio foi substituído a cada 72h, e notou-se que o crescimento celular se deu de forma adequada, observando-se aderência ao plástico e mudança morfológica celular, para formato fibroblastoide. Notou-se ainda um aumento no número de células em apoptose em passagens P4 e P5.

Figura 9 – Cultivo celular em P2, com meio suplementado com exossomos.

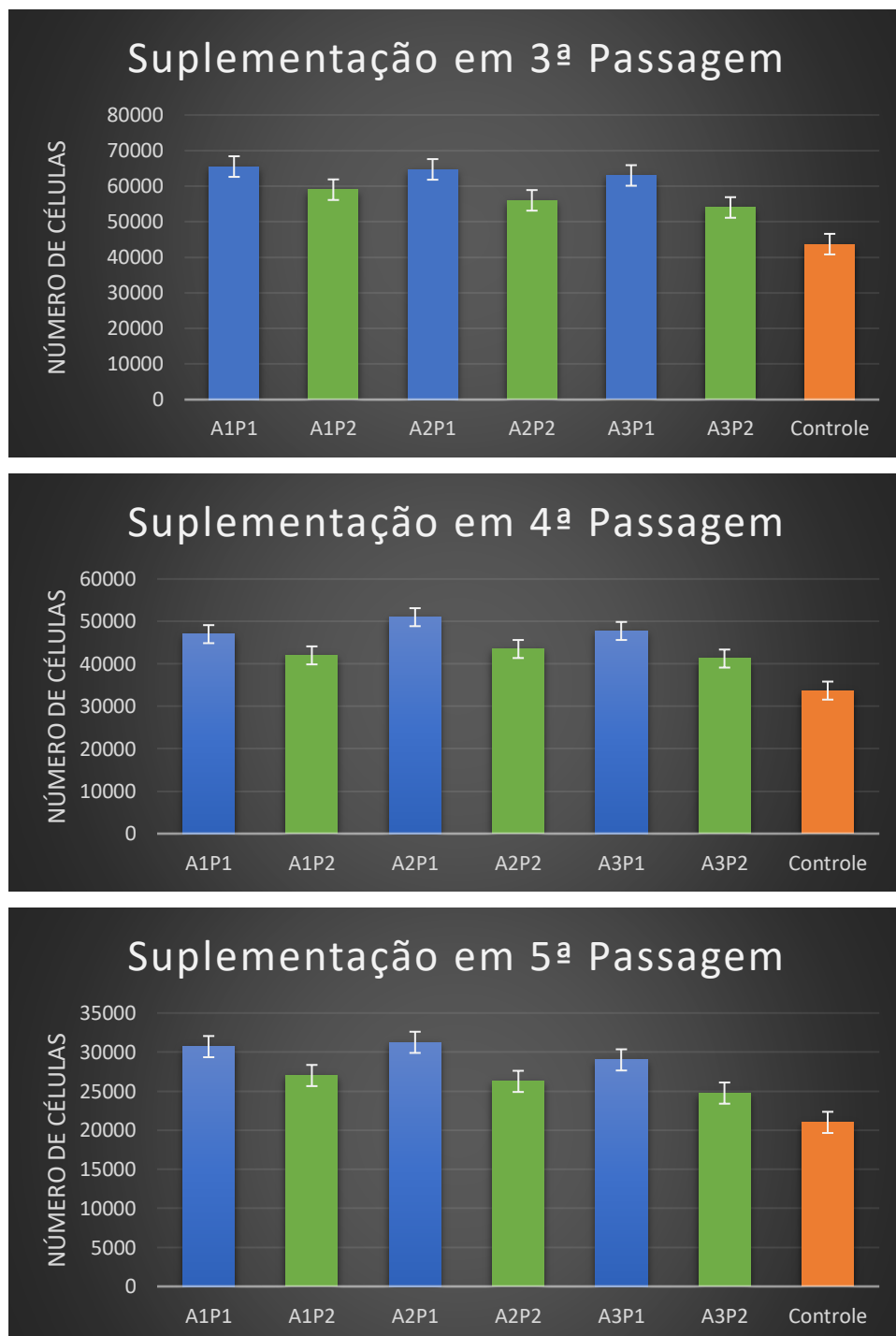


Fonte: Própria autoria.

Legenda: Realização de cultivos celulares utilizando meios de cultivos suplementados com micro-vesículas e grupo controle para análise comparativa.

Após suplementação, notou-se que o cultivo controle apresentou desenvolvimento mais lento e menor número de células quando submetido a contagem em Câmara de Neubauer, apresentando os cultivos suplementados, 15-20% maior número de células (Figura 10).

Figura 10 - Gráfico de Suplementação em terceira, quarta e quinta passagem



Fonte: Própria autoria.

Legenda: Verificou-se que a suplementação resultou em melhora na taxa de expansão e número de células após um período de 72hs em relação ao grupo controle. Tal resultado foi observado em todas as passagens suplementadas. Após quinta passagem, os cultivos entraram em processo de senescência.

Embora o processo de suplementação tenha resultado em uma melhora da taxa de expansão, não se verificou melhora com relação ao número de

passagens viáveis, de forma que tanto o grupo controle quanto os cultivos suplementados, já em processo de senescência, sofreram apoptose celular após repique para sexta passagem (Figura 11).

Figura 11 – Cultivo celular em P5, já em processo de apoptose.



Fonte: Própria autoria.

Legenda: Cultivos após entrarem em estado de senescencia, sofreram processo de apoptose celular.

6.4 Análise estatística dos resultados

Para avaliação dos dados obtidos, os resultados foram submetidos a avaliação estatística por (ANOVA) e comparados em relação a eficácia do tratamento através do Teste de Dunnett, com $p \leq 0.5$, onde verificou-se correlação positiva entre o número celular e a suplementação com microvesículas em todas as passagens suplementadas.

7 DISCUSSÃO

Com o avanço da tecnologia e o melhor entendimento dos mecanismos de comunicação celular, a utilização de células tronco mesenquimais, devido ao seu grande potencial terapêutico, se tornam cada vez mais comum na terapia regenerativa, já sendo amplamente utilizadas no tratamento de doenças degenerativas e para reparação tecidual (DOMINICI *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2016; NEWTON *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2020). Diversos estudos apontam, entretanto, que tais mecanismos não foram ainda totalmente elucidados e que tal comunicação se dá através da troca de informação promovida por microvesículas, capazes de estimular receptores específicos, trocar material genético e moldar o microambiente celular de acordo com a necessidade da lesão (DERKUS, EMREGUL; EMREGUL, 2017; DOYLE; WANG, 2019; RIEDEL *et al.*, 2021).

Desta forma, a utilização de material que seriam usualmente descartados como lixo biológico, para aquisição e estudo de células tronco mesenquimais e seus mecanismos de comunicação celular, ajuda a promover um melhor entendimento dos processos relacionados a reparação tecidual e, portanto, são de fundamental importância para o avanço das pesquisas na medicina regenerativa. Somado a forma esporádica como este material é adquirido, normalmente oriundo de campanhas de castrações municipais, com pouco ou nenhum histórico do animal e sem a presença de exames pré-cirúrgicos, salienta-se a importância da formação de bancos celulares que permitam a preservação destes materiais biológicos de pouca disponibilidade para pesquisas e utilização futuras (CARDOSO *et al.*, 2017; DERKUS; EMREGUL; EMREGUL, 2017; DINH; LEWIS, 2019).

Para a realização deste experimento, portanto, seguiu-se a aquisição de úteros gravídicos que seriam usualmente descartados como lixo biológico e o tecido amniótico foi coletado e cultivado com sucesso. Células que não foram utilizadas durante a execução do experimento, em passagens P1, P2, P3, P4 e P5, foram armazenadas, em processo de criopreservação, para formação de banco celular e posterior desenvolvimento de novos experimentos. Desta forma, destaca-se a possibilidade de aquisição de células tronco derivadas de anexos fetais através de técnicas não invasivas, corroborando os protocolos

anteriormente descritos em literatura (CARDOSO *et al.*, 2016; FADEL *et al.*, 2009; VIDANE *et al.*, 2014). Notou-se, porém, que diferenças embrionárias apresentam influência no tempo necessário em colagenase e na viabilidade e responsividade do cultivo, de forma que tecidos de diferentes espessuras ou consistências necessitem de diferentes tempos em colagenase para atingir a homogeneidade adequada. Estas diferenças podem ser derivadas de características individuais da amostra, como tempo gestacional, posição fetal em relação ao útero, número de embriões, vascularização e tempo de transporte. Desta forma, salienta-se a necessidade de grupos controle individuais para cada coleta, bem como a necessidade de estudos correlacionando fatores variáveis como origem do material, sanidade e histórico do animal, tempo de gestação, oxigenação, morte tecidual e posição uterina dos fetos (GONÇALVES *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2021).

Durante o cultivo as células apresentaram conformidade e caracterização típicas, como formato fibroblastóide, aderência ao plástico e viabilidade celular alta em primeiras passagens, bem como diferenciação positiva *in vitro* em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, corroborando perante a literatura a capacidade de diferenciação típica das células tronco mesenquimais (CONNOLLY *et al.*, 2015; DOMINICI *et al.*, 2006; RUTIGLIANO *et al.*, 2013). Durante realização de curva de crescimento padrão notou-se pico de crescimento em segunda passagem, seguida por declínio gradativo em 3ª e 4ª passagem, e posterior processo de senescência em 5ª passagem, corroborando os achados de Vidane *et al.* (2014) e Karam (2019) que encontraram resultado semelhante, demonstrando que células amnióticas apresentam taxa de sobrevida limitada após 5 passagens.

O isolamento e caracterização de vesículas pequenas também foi realizado com sucesso. O protocolo de centrifugação diferencial e ultracentrifugação adaptado de Connolly *et al.* (2015) e Roballo *et al.* (2021) provou-se eficaz no isolamento das VE's e a análise por Nanosight possibilitou a correta identificação e caracterização das mesmas. O grande número de partículas pequenas nas passagens iniciais, derivadas de maior atividade metabólica em primeira e segunda passagem, como sugerido por Connolly *et al.* (2015) e Karam (2019), corrobora a literatura com relação a alta responsividade de células-tronco amnióticas e seu papel nos mecanismos de comunicação

celular através dos quais os exossomos são capazes de promover respostas em células alvo, aumentando taxa de metabolização celular, promovendo o aparecimento de receptores específicos e modificando o meio basal ao redor do tecido lesionado (DERKUS; EMREGUL; EMREGUL, 2017; HADLEY *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2021; PAOLICELLI; BERGAMINI; RAJENDRAN, 2019).

O protocolo de suplementação do meio de cultivo por exossomos se mostrou eficiente, porém, embora o processo de suplementação tenha resultado em uma melhora da taxa de expansão, não se verificou melhora com relação ao número de passagens viáveis, de forma que tanto o grupo controle quanto os cultivos suplementados, já em processo de senescência, sofreram apoptose celular após repique para sexta passagem. Amostras suplementadas com exossomos de P1 e P2 apresentaram um efeito benéfico na taxa de expansão celular, de 15 a 20%, quando comparadas ao grupo controle, em todas as passagens. Tal resultado foi submetido a análise estatística por Teste de Dunnett, com valor de significância $p \leq 0.5$, comprovando a correlação positiva entre a suplementação e os resultados em todas as amostras. Tal resultado corrobora os achados de Fafián-Labora, Morente-Lopez e Sánchez-Dopico (2019), Sangani *et al.* (2021), e Nakano e Fujimiya (2021) que ressaltam os mecanismos de ação de microvesículas e seu fundamental papel no processo de comunicação celular, através da sinalização célula-célula, expressão de receptores, aumento da sensibilidade celular ao meio e à troca de material genético, proteínas e lipídeos. Sabe-se que microvesículas apresentam propriedades proangiogênicas, anti-fibróticas, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, proliferativas e antiapoptóticas (FOO *et al.*, 2021) mediadas majoritariamente pela transferência horizontal de seus componentes que, então, regulam e modulam o comportamento de células alvo. Diversos estudos já demonstram o potencial terapêutico de uso de exossomos na medicina regenerativa, como no tratamento de doenças cardiovasculares, diminuindo área de infarto e fibrose cardíaca e estimulando angiogênese em áreas de isquemia (NASSER *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2016) no tratamento de doenças neurodegenerativas, através de sua capacidade de ultrapassar a barreira hematocefálica e no tratamento de doenças renais e hepáticas, através de suas propriedades imunoreguladoras e reparativas (BRUNO; CHIABOTTO;

CAMUSSI, 2020; FIORE; MAZZOLINI; AQUINO, 2015; LOU; CHEN; ZHENG, 2017).

Durante o experimento, não se notou estatisticamente maior tolerância das células suplementadas ao processo de degradação e apoptose, apresentando o grupo controle, mesma taxa de sobrevivência em condições semelhantes de cultivo, embora resultados descritos por Fafián-Labora, Morente-Lopez e Sánchez-Dopico (2019), Panda *et al.* (2021) e Foo *et al.* (2021) relacionem propriedades antiapoptóticas dos exossomos ao transporte e transferência de conteúdo citoplasmático, em especial DNA telomérico, auxiliando assim na redução do processo de envelhecimento celular.

Relata-se ainda que, embora tenha-se obtido um resultado positivo em relação a taxa de expansão celular, nenhum dos cultivos suplementado, assim como o grupo controle, apresentaram-se aptos a realização de uma sexta passagem, entrando em processo de senescência, onde o número total de células pós expansão já se encontrava inferior ao número padronizado. Em processo de suplementação busca-se, idealmente, não só o aumento da expansão celular, mas também um aumento do número de passagens celulares viáveis, de forma a maximizar o cultivo celular, a fim de se obter maior viabilidade do processo perante possível utilização terapêutica. Tal fator pode estar relacionado aos achados descritos por Fafián-Labora; Morente-Lopez e Sánchez-Dopico (2019) e Das e Kale (2021) que demonstram que, apesar de auxiliarem na redução do envelhecimento celular, através de propriedades antiinflamatórias, antiapoptóticas e transporte de DNA telomérico, microvesículas secretadas ainda dependem diretamente das características de suas células parentais, e que, portanto, fatores como idade celular, lesões e exposição a microambiente inóspitos podem apresentar efeito negativo na secreção exossomal por células já em processo de senescência. De tal forma, para avaliação deste achado, se faz necessário considerar que as células senescentes a serem suplementadas, já em 5ª e 6ª passagem, produzem e excretam exossomos que contrapõem os efeitos benéficos da suplementação exógena.

Destaca-se também que, durante contagem celular, notou-se melhor taxa de desenvolvimento em células suplementadas com amostras de primeira passagem quando comparadas a amostras de segunda passagem, resultado

este que pode estar relacionado a maior atividade metabólica de células em P1 em relação a P2 (CONNOLLY *et al.*, 2015; KARAM, 2019). Tal resultado não foi, entretanto, corroborado por validação estatística, demonstrando diferença não significativa entre as amostras quando submetido ao Teste de Dunnett, com nível de significância $p \leq 0.5$. Este fator pode estar relacionado a um baixo N amostral, ressaltando-se, então, a necessidade de mais estudos, realizando-se avaliação quantitativa e qualitativa das microvesículas, a fim de melhor entender o seu processo de comunicação intracelular e, desta forma, se obter melhor desempenho em cultivos, a fim de melhor avaliar a viabilidade de suas aplicações práticas.

As amostras de exossomos utilizadas neste estudo, embora tenham sido padronizadas por animais e números de células plaqueadas, não correlacionam, de forma direta, o grau de eficiência entre o resultado e as características individuais de cada cultivo pré-extração, como tempo e taxa de expansão, de forma que uma análise detalhada, quantificando e qualificando as microvesículas e correlacionando tais fatores, poderia ajudar a especificar os mecanismos de ação do processo de suplementação.

Outro fator a ser considerado perante os resultados é que, embora os cultivos tenham sido padronizados levando-se em conta o processo de criopreservação, sabe-se que tal processo influencia na taxa metabólica celular pós-criopreservação, conforme relatado por Ercolin *et al.* (2016), e desta forma, idealmente, deveriam ser utilizadas células e vesículas que não passaram por criopreservação em nenhuma etapa anterior.

8 CONCLUSÃO

As células foram cultivadas e caracterizadas, apresentando morfologia fibroblastoide típica, aderência ao plástico, metabolismo celular elevado em passagens iniciais, curva de crescimento padrão e capacidade de diferenciação em linhagens adipogênica, condrogenica e osteogênica, confirmando, assim, a eficiência dos protocolos e a possibilidade de utilização de células tronco mesenquimais derivadas do tecido amniótico para futuras pesquisas e formação de banco celular.

Para a extração de microvesículas o meio foi colhido e tratado em protocolo de centrifugação diferencial e ultracentrifugação e o Nanosight foi utilizado para caracterização através da análise de concentração e tamanho de vesículas, verificando-se assim a possibilidade de extração de microvesículas para diferentes utilizações, bem como corroborando a literatura em relação a maior presença de microvesículas em passagens de maior atividade metabólica.

Obteve-se resposta significativa em taxa de expansão celular dos cultivos suplementados quando comparados ao grupo controle, através da contagem celular e formação de curva de crescimento padrão. Em análise estatística, por Teste de Dunnet, verificou-se um aumento de 15-20% do número celular pós cultivo, bem como uma correlação positiva entre a suplementação por exossomos e o número total de células. Desta forma, permite-se concluir que a suplementação com exossomos exerce efeito positivo sobre a taxa de replicação, expansão e viabilidade células, respondendo assim a hipótese original do experimento.

Notou-se ainda efeito positivo dos exossomos no mecanismo de intercomunicação celular, apresentando função de importância no processo de regulação do meio basal, bem como transporte de proteínas, lipídeos e material genético, estimulando, desta forma, o processo de desenvolvimento celular.

A suplementação após a quinta passagem não se mostrou eficiente, de forma que não foi capaz de prolongar o número de passagens quando comparadas a curva padrão ou tão pouco apresentou resistência ao processo de senescência, portanto sugere-se a utilização de passagens baixas até P3 para aditivo ao cultivo utilizando os exossomos.

Conclui-se assim que a suplementação por exossomos apresentou efeito positivo na taxa de desenvolvimento e expansão celular de cultivos em passagens naturalmente ineficientes, mas não foi capaz de impedir o processo de senescência a partir da 5ª passagem celular.

REFERÊNCIAS

AMBRÓSIO, C. E. *et al.* Potential application of amniotic stem cells in veterinary medicine. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2019. DOI:10.21451/1984-3143-AR2018-0124.

BRUNO, S.; CHIABOTTO, G.; CAMUSSI, G. Extracellular vesicles: a therapeutic option for liver fibrosis. **International Journal of Molecular Sciences**, Torino, v. 21, n. 12, p. 4255, 15 Jun. 2020. DOI:10.3390/ijms21124255.

CARDOSO, M. T. *et al.* Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 52, n. 2, SI, p. 58-64, 2017.

CONNOLLY, K. D. *et al.* Characterization of adipocyte-derived extracellular vesicles released pre-and post-adipogenesis. **Journal of Extracellular Vesicles**, Järfälla, v. 4, art. 29159, 2015.

DAS, M.; KALE, V. Involvement of extracellular vesicles in aging process and their beneficial effects in alleviating aging-associated symptoms. **Cell Biology International**, London, p. 1–17, 2021. Ahead of print.

DERKUS, B.; EMREGUL, K.; EMREGUL, E. A new approach in stem cell research—exosomes: their mechanism of action via cellular pathways. **Cell Biology International**, London, v. 41, p. 466–475, 2017.

DINH, T.; LEWIS, C. Amnion applications in the foot and ankle. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, Philadelphia, v. 36, n. 4, p. 563–576, 2019.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, **Cytotherapy**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DOYLE, L. M.; WANG, M. Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. **Cells**, Basel, v. 8, n. 7, art. 727. 2019. DOI:10.3390/cells8070727.

ERCOLIN, A. C. M. *et al.* Rabbit olfactory stem cells: isolation protocol and characterization. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 59–66, jan. 2016.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

FADEL, L. *et al.* Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 267-73. 2011. DOI:10.1590/s0102-86502011000400004.

- FAFIÁN-LABORA, J.; MORENTE-LOPEZ, M.; SÁNCHEZ-DOPICO, M. J. Influence of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in vitro and their role in ageing. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v.11, n. 1, art. 13, 2020. DOI:<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1534-0>.
- FANG, C. Y. *et al.* Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 6, art. e0178960, 2017.
- FIORE, E. J.; MAZZOLINI, G.; AQUINO, J. B. Mesenchymal stem/stromal cells in liver fibrosis: recent findings, old/new caveats and future perspectives. **Stem Cell Reviews and Reports**, [Totowa, N.J.], v. 11, n. 4, p. 586–597, 2015. DOI:<https://doi.org/10.1007/s12015-015-9585-9>.
- FOO, J. B. *et al.* Comparing the therapeutic potential of stem cells and their secretory products in regenerative medicine. **Stem Cells International**, London, art. 2616807, Aug. 2021.
- GHAFOURI-FARD, S. *et al.* The Emerging Role of Exosomes in the Treatment of Human Disorders With a Special Focus on Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Iran, v. 9, art. 653296, Jul 2021
- GONÇALVES, N. N.; AMBRÓSIO, C. E.; PIEDRAHITA J. A. Stem cells and regenerative medicine in domestic and companion animals: a multispecies perspective. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 49, suppl. 4, p. 2-10, 2014.
- HADE, M. D.; SUIRE, C. N.; SUO, Z. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: applications in regenerative medicine. **Cells**, Basel, v. 10, n. 8, art. 1959, 2021. <https://doi.org/103390/cells100081959>.
- HADLEY, E. E. *et al.* Amnion epithelial cell-derived exosomes induce inflammatory changes in uterine cells. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, St. Louis, v. 219, n. 5, art. 478, 2018.
- KARAM, R. G. **Avaliação do padrão de secreção e morfologia de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco da membrana amniótica canina**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.
- LOU, G.; CHEN, Z.; ZHENG, M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. **Experimental & Molecular Medicine**, Seoul, v. 49, n. 6, art. e346, 2017. DOI:<https://doi.org/10.1038/emm.2017.63>.
- LIU, Q. *et al.* Characteristics and therapeutic potential of human amnion-derived stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, art. 970, 2021. DOI:<https://doi.org/10.3390/ijms22020970>.

LIU, S. *et al.* Strategies to optimize adult stem cell therapy for tissue regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 6, art. 982, 2016.

LIU, X. *et al.* Insulin-transferrin-selenium as a novel serum-free media supplement for the culture of human amnion mesenchymal stem cells. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, Philadelphia, v. 49, n. 1, p. 63-71, 2019.

MISHRA, S. Stem cell research: efficacy, legal framework and its patentability issue. **Law Colloquy Journal of Legal Studies (LCJLS)**, Indore, v. 1, n. 2, p. 1-18, 2021.

NAKANO, M.; FUJIMIYA, M. Potential effects of mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles and exosomal miRNAs in neurological disorders. **Neural Regeneration Research**, Shenyang, v. 16, n. 12, p. 2359-2366, 2021.

NASSER, M. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosome microRNA as therapy for cardiac ischemic injury. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 143, art. 112118, 2021.

DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112118>.

NEWTON, W. C. *et al.* Stem cell-derived exosomes: a novel vector for tissue repair and diabetic therapy. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 58, n. 4, p. 155-165, 2017.

OLIVEIRA, N. A. *et al.* Bioimpressão e produção de mini-órgãos com células tronco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 37, n. 9, p. 1032-1039, 2017.

PANDA, B. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes as an emerging paradigm for regenerative therapy and nano-medicine: a comprehensive review. **Life**, Basel, v. 11, n. 8, art. 784, 2021.

DOI:<https://doi.org/10.3390/life11080784>.

PAOLICELLI, R. C.; BERGAMINI, G.; RAJENDRAN, L. Cell-to-cell communication by extracellular vesicles: focus on microglia. **Neuroscience**, Oxford, v. 405, p. 148-157, 2019.

PETERS, T. Keep the 14-day rule in stem cell research. **Theology and Science**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 177-183, 2021.

DOI:[10.1080/14746700.2021.1944484](https://doi.org/10.1080/14746700.2021.1944484).

PIERI, N. C. G. *et al.* Comparative development of embryonic age by organogenesis in domestic dogs and cats. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, p. 625–631. 2015.

REN, Y. *et al.* Human amniotic epithelial cells ameliorate kidney damage in ischemia-reperfusion mouse model of acute kidney injury. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 11, n. 1, art. 410, 2020.

RIEDEL, R. N. *et al.* Stem cells and COVID-19: are the human amniotic cells a new hope for therapies against the SARS-CoV-2 virus? **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 12, n. 1, art. 155, 2021.

ROBALLO, K. C. S.; AMBRÓSIO, C. E.; SILVEIRA, J. C. Protocol to study the role of extracellular vesicles during induced stem cell differentiation. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 2273, p. 63-73, 2021.
DOI:https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1246-0_3.

RUTIGLIANO, L. *et al.* Molecular characterization and in vitro differentiation of feline progenitor-like amniotic epithelial cells. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 4, n. 5, art. 133, 2013.

SANGANI, N. B. *et al.* The role of extracellular vesicles during CNS development. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 205, art. 102-124, 2021.

SCHNEIDER, A.; SIMONS, M. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 352, p. 33–47, 2013.

STAHL, P. D.; RAPOSO, G. Exosomes and extracellular vesicles: the path forward. **Essays in Biochemistry**, London, v. 62, p. 119–124, 2018.

UMEZAWAA, A. *et al.* Amnion-derived cells as a reliable resource for next-generation regenerative medicine. **Placenta**, London, v. 84, p. 50–56, 2019.

VIDANE, A. S. *et al.* Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. **Stem Cells Cloning**, [Auckland, N.Z.], v. 27, p. 71-78, 2014. DOI:10.2147/SCCAA.S67790.

WANG, X. *et al.* Hsp20-mediated activation of exosome biogenesis in cardiomyocytes improves cardiac function and angiogenesis in diabetic mice. **Diabetes**, [New York], v. 65, n. 10, p. 3111-28, 2016. DOI:10.2337/db15-1563.

WORTZEL, I. *et al.* Exosome-mediated metastasis: communication from a distance. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 49, n. 3, p. 349-360, 2019.

ZHANG, J. *et al.* Exosome and exosomal MicroRNA: trafficking, sorting, and function. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, Beijing, v. 13, n. 1, p. 17–24, 2015.

ZHAO, B. *et al.* Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. **Journal of Molecular Histology**, Dordrecht, v. 48, p. 121–132, 2017.

ZOMER, H. D. *et al.* Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, [Auckland, N.Z.], v. 8, p. 125-134, 2015.