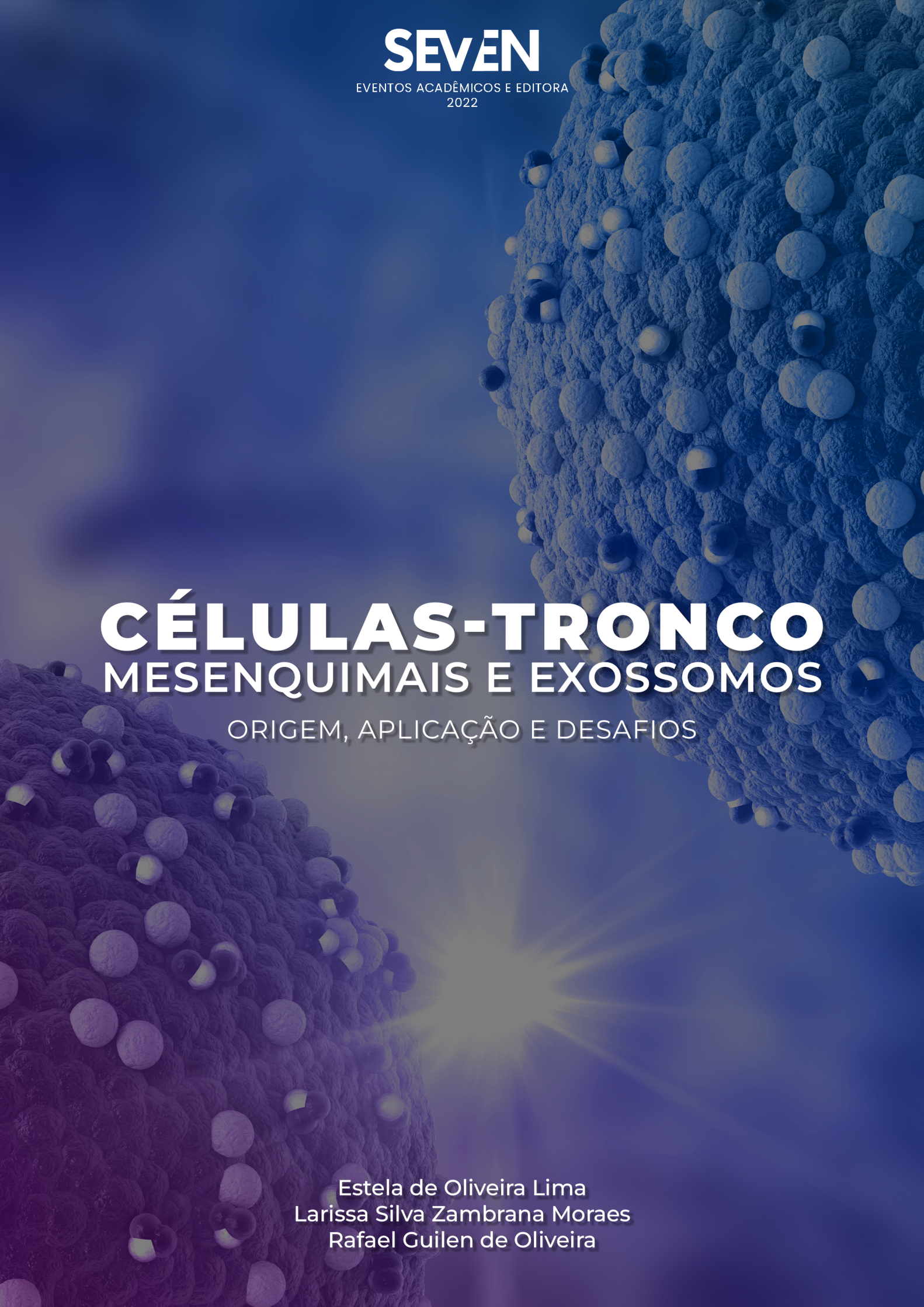




SEVEN

EVENTOS ACADÊMICOS E EDITORA
2022

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E EXOSSOMOS

ORIGEM, APLICAÇÃO E DESAFIOS

Estela de Oliveira Lima
Larissa Silva Zambrana Moraes
Rafael Guilen de Oliveira

A grayscale microscopic image of a cell surface, densely covered with numerous small, spherical vesicles or exosomes. The background is a soft, out-of-focus gradient of gray.

SEVEN

EVENTOS ACADÊMICOS E EDITORA
2022

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E EXOSSOMOS

ORIGEM, APLICAÇÃO E DESAFIOS

Estela de Oliveira Lima
Larissa Silva Zambrana Moraes
Rafael Guilen de Oliveira

EDITORES CHEFE

Prof.º Me. João Victor Lucas

Prof.º Dr. Wanderson Farias

EDITOR EXECUTIVO

Nathan Albano Valente

AUTORES

Estela de Oliveira Lima

Larissa Silva Zambrana Moraes

Rafael Guilen de Oliveira

COLABORADORES

Flávia Luísa Dias-Audibert

PRODUÇÃO EDITORIAL

Seven Eventos Acadêmicos e Editora

Edição de arte

Alan Ferreira de Moraes

Bibliotecária

Eliete Marques da Silva

IMAGENS DE CAPA

AdobeStok

ÁREA DO CONHECIMENTO

Ciências da saúde

2022 by Seven Editora

Copyright © Seven Editora

Copyright do Texto © 2022 Os Autores

Copyright da Edição © 2022 Seven Editora

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva da autora, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Seven Eventos Acadêmicos e Editora. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos a autora, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Seven Eventos Acadêmicos e Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.



O conteúdo deste Livro foi enviado pela autora para publicação de acesso aberto, sob os termos e condições da Licença de Atribuição Creative Commons 4.0 Internacional

CORPO EDITORIAL

Editores Chefe

Profº Me. João Victor Lucas
Prof.º Dr. Wanderson Farias

Conselho Editorial

Prof. Dr. Pedro Henrique Ferreira Marçal. Universidade Vale do Rio Doce
Prof. Msc. Adriana Barni Truccolo- Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
Prof. Msc. Marcos Garcia Costa Moraes- Universidade Estadual da Paraíba
Prof. Dra. Mônica Maria de Almeida Brainer - Instituto Federal Goiano Campus Ceres
Prof. Me. Caio Vinicius Efigenio Formiga - Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Prof. Me. Egas José Armando - Universidade Eduardo Mondlane de Moçambique.
Profª Drª. Ariane Fernandes da Conceição- Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Prof. Dr. Wanderson Santos de Farias - Universidad de Desarrollo Sustentable
Profª Drª. Maria Gorete Valus -Universidade de Campinas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Lima, Estela de Oliveira

Células-tronco mesenquimais e exossomos [livro eletrônico]:
origem, aplicação & desafios / Estelade Oliveira Lima, Larissa
Silva Zambrana Moraes, Rafael Guilen de Oliveira. -- Curitiba,
PR: Seven Events, 2022.

Formato: PDF

Bibliografia.

ISBN 978-65-997403-3-6

1. Biotecnologia 2. Células-tronco 3. Células-tronco -
Pesquisas 4. Células-troncoMesenquimais

5. Engenharia genética 6. Medicina regenerativa

I. Moraes, Larissa Silva Zambrana. II. Oliveira,Rafael Guilen de.
III. Título.

22-114362

CDD-660.6

Eliete Marques da Silva - Bibliotecária - CRB-8/9380

Seven Evetos Academicos e Editora
CNPJ: 43.789.355/0001-14
editora@sevenevents.com.br
São José dos Pinhais/PR
+55 (41) 9 9823-6892

SEVEN

EVENTOS ACADÊMICOS E EDITORA

DECLARAÇÃO DO (A) AUTOR(A)

A autora desta obra **DECLARA** para os seguintes fins que:

1. Não possui qualquer interesse comercial que enseje um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado;
2. Declara que participou ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente nas seguintes condições: "a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão; "
3. Certifica que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos e vícios de autoria;
4. Confirma a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas;
5. Reconhece ter informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa;
6. Autoriza a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Seven Eventos Acadêmicos e Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Seven Eventos Acadêmicos e Editora **DECLARA**, para fins de direitos deveres e eventuais aceções metodológicas ou jurídicas, que:

1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, constituindo direito sobre a publicação e reprodução dos materiais. Não se responsabilizando solidariamente na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; Sendo única e exclusivamente responsabilidade do (s) autor (es) a verificação de tais questões autorais e outras, se eximindo portando a Editora de eventuais danos civis, administrativos e penais que surjam.
2. Autoriza **A DIVULGAÇÃO DA OBRA**, pelo (s) autor (es) em palestras, cursos eventos, shows, meios midiáticos e televisivos, desde que com o **devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial**, com a **apresentação dos devidos CRÉDITOS a SEVEN EVENTOS ACADÊMICOS**, podendo ser responsabilizado o autor (es) e divulgadores pela omissão/apagamento de tais informações;
3. Todos os e-book são open access, desta forma não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de e-commerce, ou qualquer outro meio virtual ou físico. Sendo, portanto, isenta de repasses de direitos autorais aos autores, vez que o formato não enseja demais direitos que não os fins didáticos e publicitários da obra que podem ser consultados a todo momento.
4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro;
5. A Seven Eventos Acadêmicos, não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra, em conformidade ao Marco Civil da Internet, a Lei Geral de Proteção de Dados e a Constituição da República Federativa.

SUMÁRIO

RESUMO

.....	1
-------	---

CAPÍTULO - 1 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

1 CÉLULAS-TRONCO

.....	2
-------	---

2 CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS-TRONCO/ESTROMAIS MESENQUIMAIS

.....	5
-------	---

2.1 PRINCIPAIS TECIDOS USADOS PARA COLETA DE MSC

.....	7
-------	---

2.1.1 Medula óssea

.....	7
-------	---

2.1.2 Tecido adiposo

.....	8
-------	---

2.1.3 Cordão umbilical

.....	9
-------	---

2.1.4 Sangue Periférico

.....	9
-------	---

3 PROPRIEDADES

.....	12
-------	----

3.1 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO

.....	12
-------	----

3.2 PROPRIEDADE IMUNOMODULATÓRIA

.....	14
-------	----

3.3 PROPRIEDADE PARÁCRIN

.....	15
-------	----

CAPÍTULO - 2 EXOSSOMOS

1 ORIGEM DOS EXOSSOMOS

.....	17
-------	----

1.1 EXOSSOMOS DERIVADOS DE MSCS

.....	19
-------	----

1.2 MEIO CONDICIONADO DERIVADO DAS MSCS (MSC-CM)

.....	19
-------	----

2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS VS EXOSSOMOS/MEIO CONDICIONADO

.....	20
-------	----

3 DESAFIOS DA UTILIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS NA CLÍNICA	22
CAPÍTULO 3 - APLICABILIDADE DAS MSCS E EXOSSOMOS NA SAÚDE	
1 POTENCIAL DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA SAÚDE	24
1.1 APLICAÇÃO CLÍNICA	24
1.1.1 Uso de MSCs para engenharia tecidual de osso alveolar em pacientes com fissura labiopalatina	26
1.1.2 Efeito da transfusão de MSCs em pacientes com neuropatia periférica diabética	26
1.1.3 Transferência intracoronária de MSCs derivadas de geleia de Wharton (WJ-MSCs) em pacientes com infarto agudo do miocárdio	27
1.1.4 MSCs derivadas do tecido do cordão umbilical (UC) versus placebo para tratar a inflamação pulmonar aguda devido à COVID-19	28
1.1.5 Avaliação da segurança e eficácia de MSCs alogênicas (AC607) para o tratamento de lesão renal em pacientes de cirurgia cardíaca	29
2 POTENCIAL DOS EXOSSOMOS NA SAÚDE	30
2.1 APLICAÇÃO CLÍNICA	31
2.1.1 iExossomos no tratamento de pacientes com câncer de pâncreas metastático com mutação KrasG12D	31
2.1.2 Papel de microRNAs no diagnóstico de pré-eclâmpsia	31
2.1.3 Estudo clínico piloto sobre inalação de exossomos de MSCs no tratamento de pneumonia grave por corona vírus	31
2.1.4 Avaliação de Segurança e Eficácia de MSC-Exos de Tecido Adiposo Alogênico em Pacientes com Doença de Alzheimer	32
3 ESTUDOS CLÍNICOS E CONSIDERAÇÕES	33

CAPÍTULO 4 BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE EXOSSOMOS DERIVADOS DE MSCS

1 BIOPROCESSOS	34
1.1 PROCESSOS UPSTREAM	34
1.1.1 Estratégias para aumentar a produção de exossomos	35
1.1.2 Estratégias de produção em larga escala de exossomos	37
1.1.3 Processos Downstream	40
1.1.4 Processos de purificação de exossomos	41
1.1.5 Processos de caracterização de exossomos	42
2 DESAFIOS DO ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE EXOSSOMOS	43
3 PRODUÇÃO DE EXOSSOMOS NO MERCADO INTERNACIONAL E NACIONAL	44
CAPÍTULO 5 CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	46-53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD-MSC - Células-tronco Mesenquimais derivadas do Tecido Adiposo

ASC - Células-tronco Adultas

BM-MSC - Células-tronco Mesenquimais derivadas da Medula Óssea

BPF - Boas Práticas de Fabricação

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ESC - Células-tronco Embrionárias

EV - Vesícula Extracelular

FBS - Soro Fetal Bovino

HSC - Células-Tronco Hematopoiéticas

IAC - Captura por Imunoafinidade

iPSC - Células-tronco Pluripotentes Induzidas

ISCT - Sociedade Internacional de Terapia Celular

MSC - Células-Tronco Mesenquimais

MSC-CM - Meio Condicionado derivado de Células-tronco Mesenquimais

MWCO - Peso Molecular de Corte da Membrana

PE - Pré-eclâmpsia

PSC - Células-tronco Pluripotentes

siRNA - RNA de interferência

TGF – Filtração de Fluxo Tangencial

TSC - Células-tronco Totipotentes

UC-MSC - Células-tronco Mesenquimais derivadas do Cordão Umbilical

WJ-MSC - Células-tronco Mesenquimais derivadas da Geleia de Wharton

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

1 CÉLULAS-TRONCO

O termo “células-tronco” (do inglês, *stem cells*) é usado para denominar células indiferenciadas capazes de autorrenovação e diferenciação. Suas principais atuações podem envolver desde o desenvolvimento do embrião (embriogênese) até a regeneração tecidual (renovação e reparação de lesões teciduais) no organismo adulto. Essas células podem ser classificadas quanto a sua origem, sendo elas: células-tronco embrionárias (ESCs – do inglês, *embryonic stem cells*) e células-tronco adultas (ASCs – do inglês, *adult stem cells*); ou quanto a sua plasticidade, sendo elas: células-tronco totipotentes, pluripotentes ou multipotentes (BOHELER et al., 2002; WOBUS; BOHELER, 2005). O termo plasticidade indica a capacidade que a célula-tronco apresenta de se diferenciar em células de diferentes tecidos. Por exemplo, a célula-tronco totipotente é capaz de formar os anexos extraembrionários (placenta, âmnio e vesícula vitelina); enquanto as células-tronco pluripotentes não possuem essa capacidade, embora ambas possam se diferenciar nos demais tecidos do organismo. Logo as células-tronco totipotentes são mais “plásticas” que as células-tronco pluripotentes (ŁOS; SKUBIS; GHAVAMI, 2019), como é ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Plasticidade das Células-tronco.

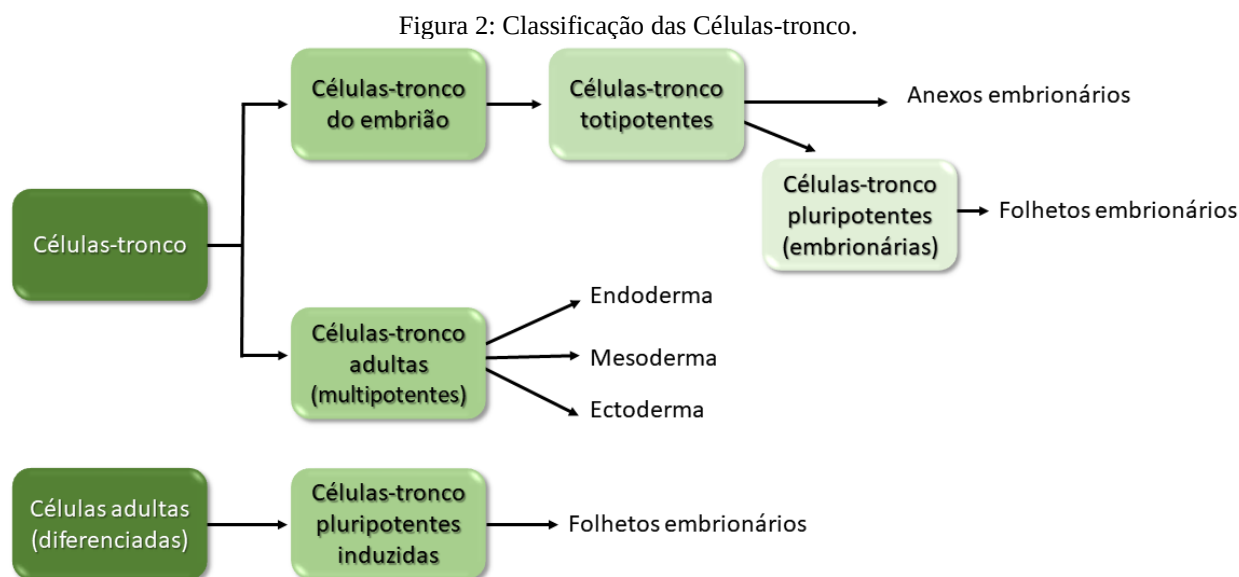


Fonte: Próprio autor. Ilustração: Flávia Luísa Dias-Audibert.

As células-tronco provenientes do embrião são responsáveis pela formação do organismo como um todo. Dentre elas, é possível observar células-tronco totipotentes e pluripotentes (Figura 2). As células-tronco totipotentes (TSCs – do inglês, *totipotent stem cells*) estão presentes no primeiro estágio de

desenvolvimento do embrião, mais especificamente nos estágios de 2 a 8 células após a formação do zigoto (BAKER; PERA, 2018; WOBUS, 2001), e são responsáveis por dar origem a todas as células da estrutura primária do embrião, incluindo os folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) e os anexos extraembrionários (BAKER; PERA, 2018; ŁOS; SKUBIS; GHAVAMI, 2019). Já as células-tronco pluripotentes (PSCs - do inglês, *pluripotent stem cells*), também conhecidas como células-tronco embrionárias, originam-se das TSC; são encontradas originalmente na massa celular interna do blastocisto e são capazes de se diferenciar nos três folhetos embrionários, os quais vão originar todos os demais tipos celulares do organismo (ŁOS; SKUBIS; GHAVAMI, 2019; OH; CHOO, 2011). Diferentemente das células totipotentes, as pluripotentes não são capazes de gerar um ser vivo completo, já que não são capazes de gerar os anexos extraembrionários, porém apresentam alta plasticidade e elevado potencial de diferenciação em todas as células especializadas do indivíduo adulto, quando em condições pré-definidas (BLANPAIN; FUCHS, 2014).

Dentre as células pluripotentes, existem as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs – do inglês, *induced pluripotent stem cells*), que são fruto dos avanços no conhecimento da engenharia genética. Essas células são obtidas a partir da reprogramação de uma célula especializada para que esta retorne ao seu estado indiferenciado, ou seja, estado em que apresenta expressão de genes próprios das células-tronco embrionárias, como também características e propriedades morfológicas (ANDRADE, 2015). Através dessa abordagem é possível obter células-tronco com características pluripotentes, típicas de células-tronco embrionárias sem haver a necessidade de manipular um embrião (Figura 2).



Fonte: Próprio autor. Ilustração: Flávia Luísa Dias-Audibert.

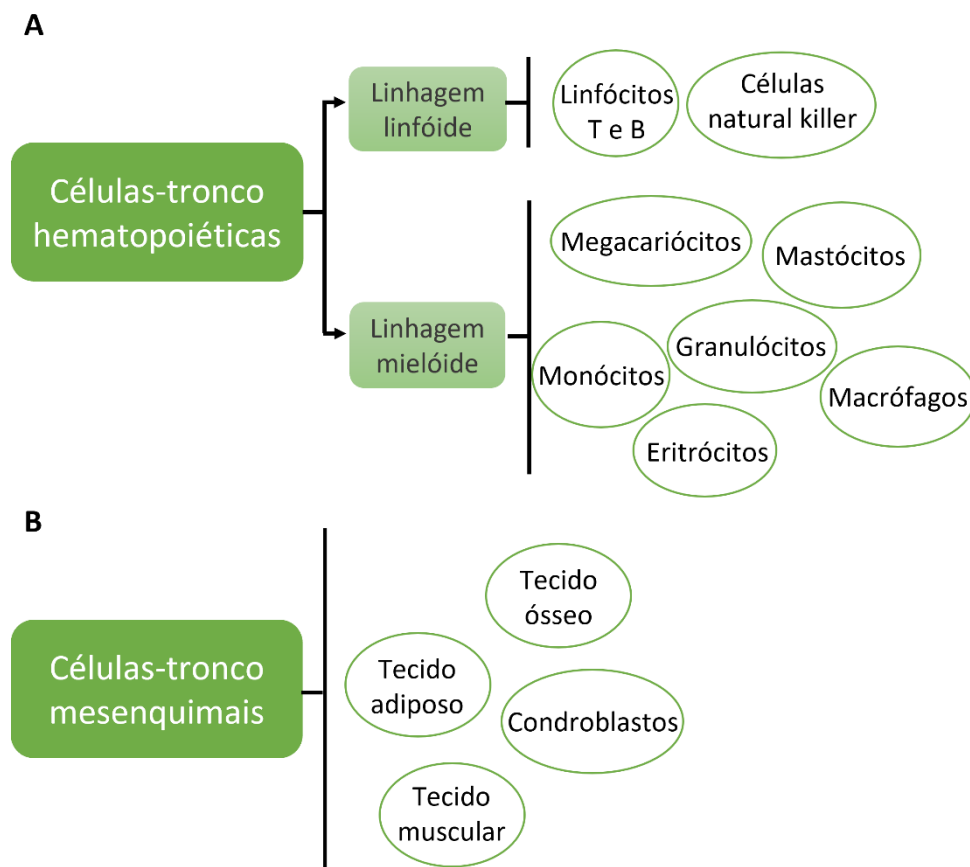
Quanto à origem das células-tronco, elas também podem ser classificadas como células-tronco adultas (Figura 2), as quais são encontradas em órgãos e tecidos completamente formados e funcionais, podendo ser observadas em qualquer fase da vida após o nascimento (pós-natal). Funcionam como uma reserva de células precursoras, envolvidas na manutenção e reparo tecidual ao longo da vida. Quanto à

manutenção tecidual, atuam principalmente em locais de constante reposição celular, como o epitélio intestinal, o qual demanda alta taxa de renovação celular. Podem ainda atuar na regeneração/reparo celular, como por exemplo no tecido epitelial no qual, ao haver uma lesão local, as células-tronco são utilizadas para reparo (BLANPAIN; FUCHS, 2014). Nesses dois processos, as células-tronco adultas se mantêm em uma quantidade basal no tecido (por meio da autorrenovação) até que fatores do meio (sinalização interna em resposta à demanda tecidual) induzam a sua diferenciação (BLANPAIN; FUCHS, 2014).

Quanto à plasticidade, as células-tronco adultas são caracterizadas como multipotentes (Figuras 1 e 2), ou seja, são capazes de gerar um grupo limitado de tipos celulares (isto é, células derivadas do endoderma, ou do mesoderma ou do ectoderma). Por exemplo, os tipos celulares do ectoderma são os tecidos epidérmico e nervoso; em relação ao mesoderma, este dá origem a tecidos como músculos, ossos e os componentes do sangue; já o endoderma pode levar à formação de tecidos como fígado, pâncreas, trato gastrointestinal e pulmões (ŁOS; SKUBIS; GHAVAMI, 2019; OH; CHOO, 2011).

Dentre as células-tronco multipotentes, as mais estudadas são as hematopoiéticas e mesenquimais (Figura 3). As células-tronco hematopoiéticas (HSCs – do inglês, *hematopoietic stem cells*) dão origem às células do sangue e apresentam duas classes de linhagem: a linfoide e mieloide (Figura 3a). A linhagem linfoide dá origem às células *natural killer* (NT), linfócitos T e B; enquanto a linhagem mieloide origina os granulócitos, monócitos, eritrócitos, megacariócitos e mastócitos (IWASAKI; AKASHI, 2007). Já as células-tronco mesenquimais (MSCs - do inglês, *mesenchymal stem cells*) dão origem a diferentes tecidos, dentre eles o tecido ósseo, o tecido adiposo, os condroblastos (células responsáveis pela formação da matriz de cartilagem), tecido muscular e vascular (Figura 3b) (OH; CHOO, 2011). Ambas as células-tronco são encontradas na medula óssea, no sangue periférico e cordão umbilical, porém as mesenquimais também podem ser encontradas no tecido adiposo (ZUK et al., 2002), disco intervertebral (MIZRAHI et al., 2013), tecido conjuntivo do músculo esquelético (JANKOWSKI; DEASY; HUARD, 2002), periósteo (NAKAHARA et al., 1990), entre outros.

Figura 3: Classificação das Células-tronco Mesenquimais e Hematopoiéticas e suas respectivas linhagens celulares de diferenciação.



Fonte: Próprio autor. Ilustração: Flávia Luísa Dias-Audibert.

Estudos recentes investigam a hipótese de que as células-tronco mesenquimais estejam presentes em diversos órgãos e tecidos sob a forma de pericitos (células que revestem os vasos sanguíneos), os quais atuam como fonte de MSCs em resposta a lesão ou atuando na homeostase (YIANNI; SHARPE, 2019). Essa hipótese surgiu com um experimento comparativo entre as MSCs e os pericitos, avaliando seus sítios de origem (estudos *in vivo*) e seus respectivos marcadores celulares (CAPLAN, 2008). Observou-se que células com os respectivos marcadores das MSCs também expressavam marcadores de pericitos. O autor do experimento sugere que todas as MSCs sejam pericitos, mas que nem todos os pericitos sejam MSCs (CAPLAN, 2008). Supõe-se que, em resposta a uma lesão ou manutenção da homeostase, os pericitos se desprendam da parede do vaso sanguíneos e ajam como as células-tronco mesenquimais genuínas, podendo se proliferar e mover-se para a área da lesão, onde se diferenciem em células específicas do tecido para facilitar o reparo local (YIANNI; SHARPE, 2019). Essa é uma hipótese ainda em estudo, sendo que atualmente não há consenso na comunidade científica.

2 CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS-TRONCO/ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Nas últimas décadas, células isoladas da medula óssea e de outros tecidos que apresentavam aderência ao plástico foram denominadas como células-tronco mesenquimais, porém observou-se que

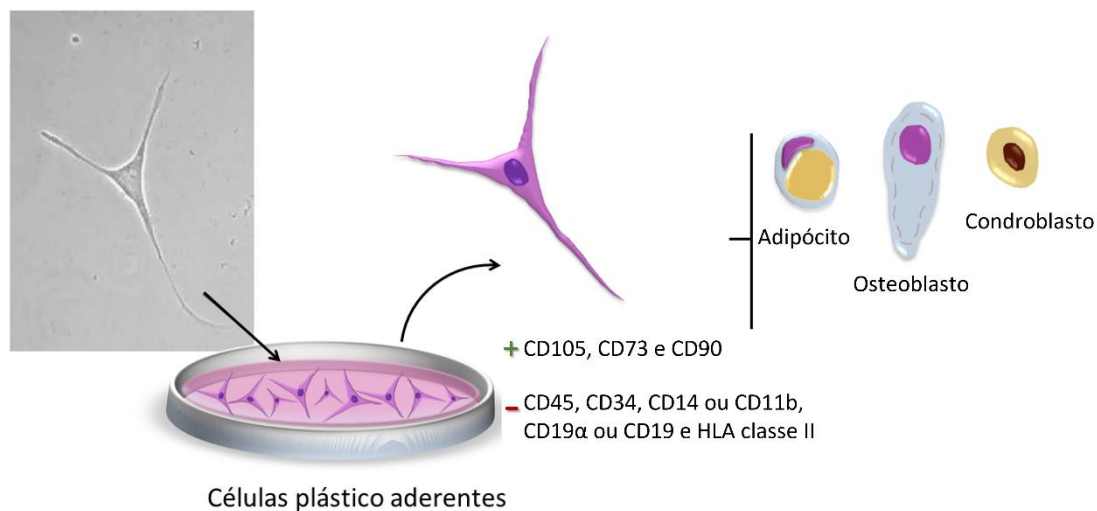
diversos estudos pré-clínicos e clínicos não abordavam as propriedades correspondentes a célula-tronco dessa população celular não fracionada (HORWITZ et al., 2005). Ou seja, as propriedades biológicas dessa população não fracionada de células plástico-aderentes não atendiam aos critérios geralmente aceitos para a classificação como células-tronco, tornando o nome cientificamente impreciso (HORWITZ et al., 2005). A partir de então, O Comitê de Células-tronco Teciduais e Mesenquimais (“Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee”) da Sociedade Internacional de Terapia Celular – ISCT (“International Society for Cellular Therapy”) determinou que as células plástico-aderentes seriam denominadas como células estromais mesenquimais multipotentes (do inglês, *multipotent mesenchymal stromal cells*), enquanto o termo “células-tronco mesenquimais” deveria ser utilizado para aquelas células que apresentassem atividade de autorrenovação de longa duração e diferenciação em tipos celulares específicos *in vivo* (DOMINICI et al., 2006; HORWITZ et al., 2005).

Essa é uma discussão em aberto e que não há consenso na comunidade científica. Devido a isso o acrônimo MSC vem sendo utilizado para referir-se aos termos: célula-tronco mesenquimal, célula estromal mesenquimal e célula estromal multipotente, dependendo da terminologia adotada pelo autor. Neste trabalho o acrônimo MSC referenciará ao termo Célula-Tronco Mesenquimal, visando facilitar o entendimento do leitor quanto aos tópicos abordados neste trabalho, e englobar as células com características referentes a células-tronco e com aquelas definidas pelo Comitê de Células-tronco Teciduais e Mesenquimais, descritas a seguir.

O Comitê de Células-tronco Teciduais e Mesenquimais da ISCT determinou alguns parâmetros básicos para definir as MSCs humanas multipotentes, cujas características básicas incluem autorrenovação e diferenciação durante investigações laboratoriais e estudos pré-clínicos (DOMINICI et al., 2006), sendo eles (Figura 4):

- Plástico-aderente em condições de cultura padrão;
- $\geq 95\%$ da população de MSCs deve expressar os marcadores: CD105, CD73 e CD90;
- Marcadores silenciados (expressão positiva $\leq 2\%$): CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 α ou CD19, e HLA classe II;
- Diferenciação em osteoblastos, adipócitos ou condroblastos em condições de diferenciação *in vitro* padrão.

Figura 4: Características das Células-tronco Mesenquimais



Em condições tradicionais de cultivo celular (*in vitro*), as MSCs aderem à superfície plástica e emitem prolongamentos citoplasmáticos, conferindo-as formato fusiforme e/ou “estrelado”, característico deste tipo celular. (+) marcadores moleculares presentes; (-) marcadores moleculares silenciados. **Fonte:** Próprio autor. **Ilustração:** Flávia Luísa Dias-Audibert.

2.1 PRINCIPAIS TECIDOS USADOS PARA COLETA DE MSC

As MSCs originárias de diferentes tecidos divergem devido ao distinto microambiente de cada tecido onde se alojam. Cada uma destas células está condicionada ao microambiente de origem, o que as torna diferentes umas das outras quanto à capacidade própria de diferenciação (CAPLAN, 2019). Diante dessas diferenças, serão abordadas as principais fontes de MSCs e particularidades dos principais tecidos estudados.

2.1.1 Medula óssea

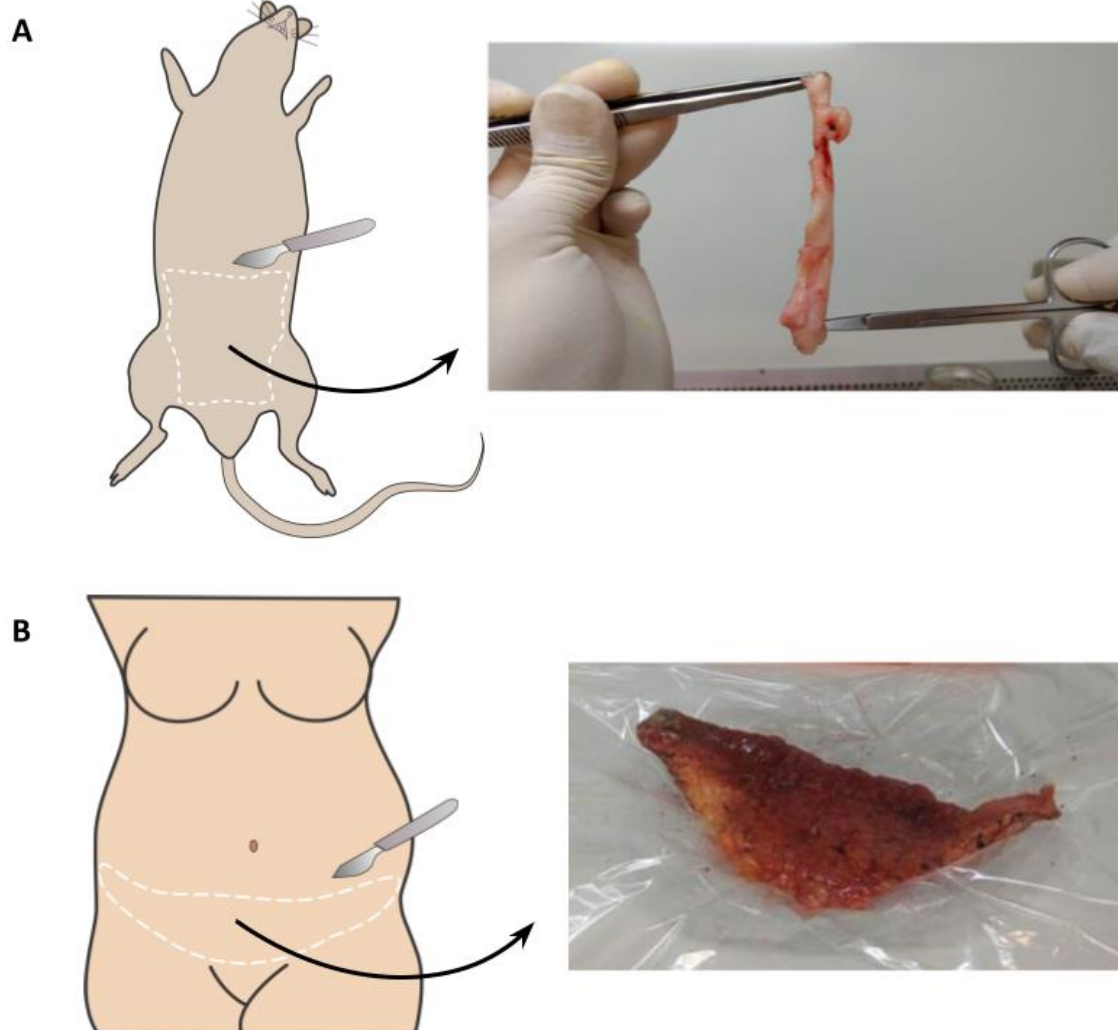
A primeira fonte descrita de células-tronco mesenquimais é a medula óssea, composta por células hematopoiéticas e estromais, dentre as quais uma pequena porção (~0.001%-0.01%) é representada pelas MSCs - denominadas BM-MSCs (do inglês, *bone marrow derived mesenchymal stem cells*) (GARA et al., 2017; MCDANIEL et al., 2017).

Dependendo da finalidade do uso das BM-MSCs, elas podem ser coletadas da crista ilíaca ou do osso trabecular. Para fins terapêuticos, as BM-MSCs são coletadas principalmente a partir da crista ilíaca conforme protocolo padronizado (LENNON; CAPLAN, 2006). Podem ainda ser coletadas a partir do osso trabecular (tecido esponjoso mais leve, revestido por uma camada exterior rígida conhecida como osso compacto), o que acontece principalmente durante procedimentos ortopédicos cirúrgicos, como substituição do quadril por prótese (OREFFO et al., 1999).

2.1.2 Tecido adiposo

As MSCs podem ainda ser obtidas a partir do tecido adiposo, quando são também denominadas células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (AD-MSCs). Nesse caso, podem ser coletadas a partir de biópsia de um fragmento de tecido adiposo adulto (60–70 g de tecido) (Figura 5) ou extraídas pelo procedimento de lipoaspiração (200 mL gordura extraída) (KERN et al., 2006; KOCAOEMER et al., 2007). As AD-MSCs são similares morfológica e imunofenotipicamente às MSCs derivadas de medula óssea, porém apresentam maior capacidade de formar unidades formadoras de colônias do tipo fibroblastos (do inglês, *Colony Forming Unit Fibroblast-like - CFU-Fs*) (KERN et al., 2006). Sendo assim, o tecido adiposo é uma fonte atraente de MSCs para medicina regenerativa quando comparado à medula óssea, pois as AD-MSCs são relativamente fáceis de obter, possuem baixo risco para os doadores e apresentam maior rendimento, com maior número de MSCs por mL, sendo que a taxa de sucesso de isolamento é 40 vezes mais elevada (CCB, 2021; MIZUNO; HYAKUSOKU, 2003).

Figura 5: Ilustração da coleta de amostras de tecido adiposo para isolamento de MSCs



As AD-MSCs podem ser isoladas a partir de amostras do tecido adiposo tanto de roedores (A), localizado na região abdominal e inguinal (delimitada pela linha pontilhada), como também de humanos (B) submetidos à abdominoplastia para remoção do excesso de pele e gordura do abdômen. **Fonte:** Próprio autor. **Ilustração:** Flávia Luísa Dias-Audibert.

2.1.3 Cordão umbilical

Além da medula óssea e tecido adiposo, outra fonte de MSCs é o cordão umbilical, seja o sangue do cordão ou a Geleia de Wharton. O método de coleta a partir do sangue já está bem estabelecido, o que contribui para a criação de bancos de estocagem, facilitando a obtenção de MSCs para fins terapêuticos (GARA et al., 2017). A obtenção das MSCs e eficácia de coleta depende do método aplicado, da qualidade dos insumos utilizados e das características do paciente. Para que esse procedimento seja bem-sucedido (eficiência superior a 60%), é necessário, por exemplo, que a coleta de MSCs seja realizada em até 15 horas após o parto e com um volume de pelo menos 33 mL do sangue do cordão. O rendimento mínimo para uma coleta de sucesso deve apresentar pelo menos 1×10^8 células e sem sinais de coagulação ou hemólise das amostras (BIEBACK, 2004). Esses parâmetros são necessários, já que a eficácia do isolamento das MSCs pode variar também de acordo com a idade materna, consumo de álcool e cigarro, método de parto (natural ou cesárea), tempo de gestação, tamanho da placenta e do cordão umbilical.

O método de coleta a partir da Geleia de Wharton (matriz do cordão umbilical) é uma alternativa à coleta a partir do sangue, devido aos diversos fatores descritos acima que podem influenciar na obtenção das MSCs (WANG et al., 2004). Esse método envolve a obtenção do cordão e o seu transporte até o laboratório em condições assépticas. Em laboratório, o material é processado para que o isolamento e proliferação das células aderentes seja realizado e as células obtidas sigam para o armazenamento (criopreservação a -196°C) e utilização futura (WANG et al., 2004). Vale ressaltar que o processo de armazenamento de MSC é o mesmo utilizado, quando as células-tronco mesenquimais são obtidas da medula óssea e do tecido adiposo.

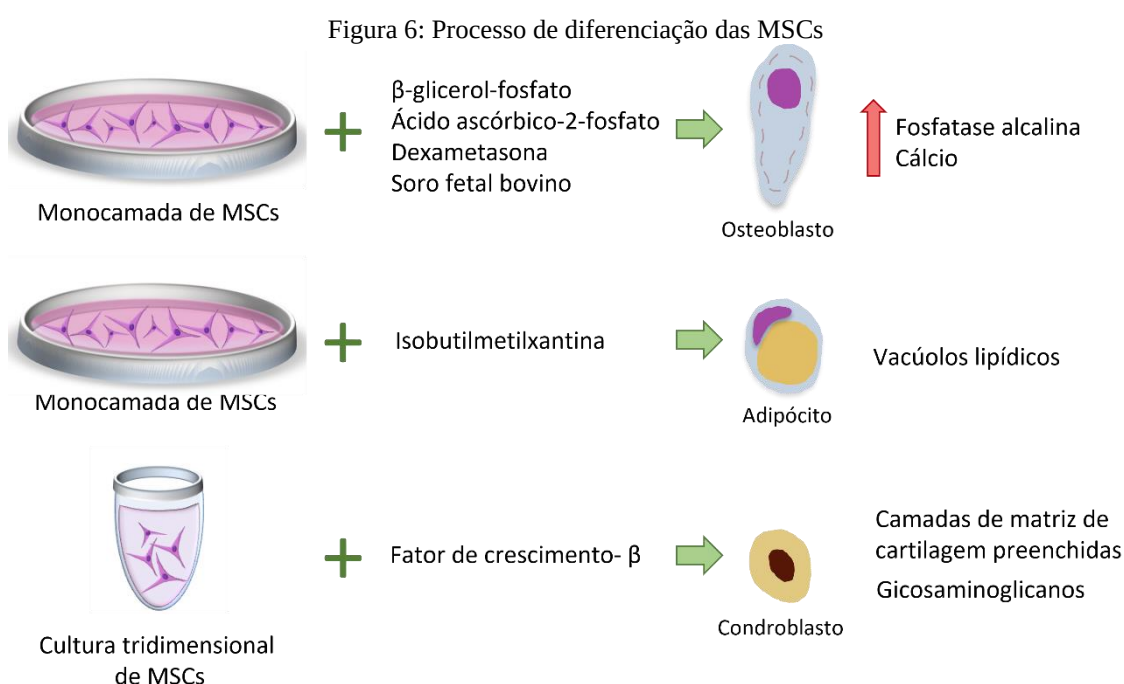
2.1.4 Sangue Periférico

Ainda é possível encontrar MSCs no sangue periférico, embora em baixas quantidades (menos de 0.5% das células presentes no sangue). Essa quantidade aumenta sob o estímulo de fatores de crescimento, fazendo com que as MSCs presentes na medula óssea e nas reservas de pericitos sejam liberadas (INSTITUTO HOC, 2021). Para aumentar o rendimento da coleta a partir do sangue periférico, realiza-se o procedimento de mobilização, em que essas células-tronco migram para o sangue periférico. Nesse procedimento são usadas citocinas recombinantes, sendo elas Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (do inglês, *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* - *G-CSF*) ou Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos / Macrófagos (do inglês, *Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor* - *GM-CSF*), associadas ou não a quimioterápicos (INSTITUTO HOC, 2021; KASSIS et al., 2006). A mobilização leva ao aumento de aproximadamente 4 vezes na quantidade de MSCs disponíveis para coleta, o que pode contribuir com a escolha do método a depender das condições do paciente (RIPA et al., 2007).

3 PROPRIEDADES

3.1 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO

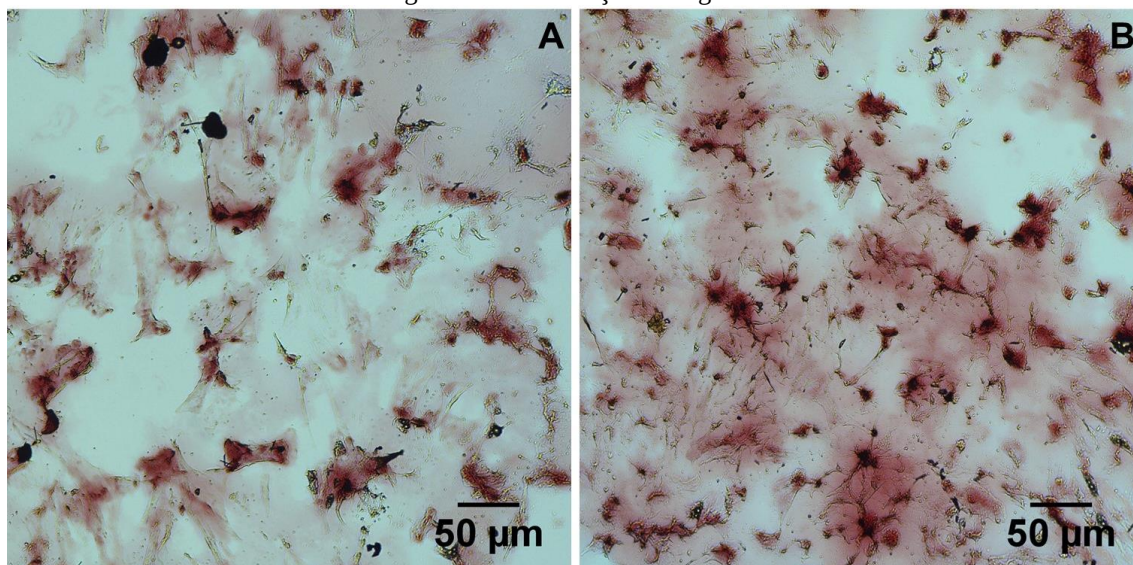
Como proposto pelo Comitê de Células-tronco Teciduais e Mesenquimais do ISCT, as células-tronco mesenquimais devem ser capazes de se diferenciar pelo menos em adipócitos, osteoblastos e condroblastos em condições padrão *in vitro* (DOMINICI et al., 2006). Atualmente existem diversos protocolos que podem ser aplicados, dependendo da fonte de coleta das MSCs e do tipo celular diferenciado desejado. A seguir serão brevemente descritas as condições necessárias do protocolo mais estudado, para que cada diferenciação ocorra. Essas informações estão resumidas na Figura 6.



Fonte: Próprio autor. Ilustração: Flávia Luísa Dias-Audibert.

A diferenciação osteogênica ocorre a partir da incubação de uma cultura em monocamada de MSCs com os componentes: β-glicerol-fosfato, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona e soro fetal bovino. Após diferenciação, as células devem apresentar morfologia característica de osteoblastos e altos níveis de fosfatase alcalina e cálcio (Figura 7). Um dos métodos de validação a ser usado é a coloração de Von Kossa, em que a cultura é submetida a uma solução de nitrato de prata e luz para quantificar a deposição de cálcio da cultura (BARRY; MURPHY, 2004).

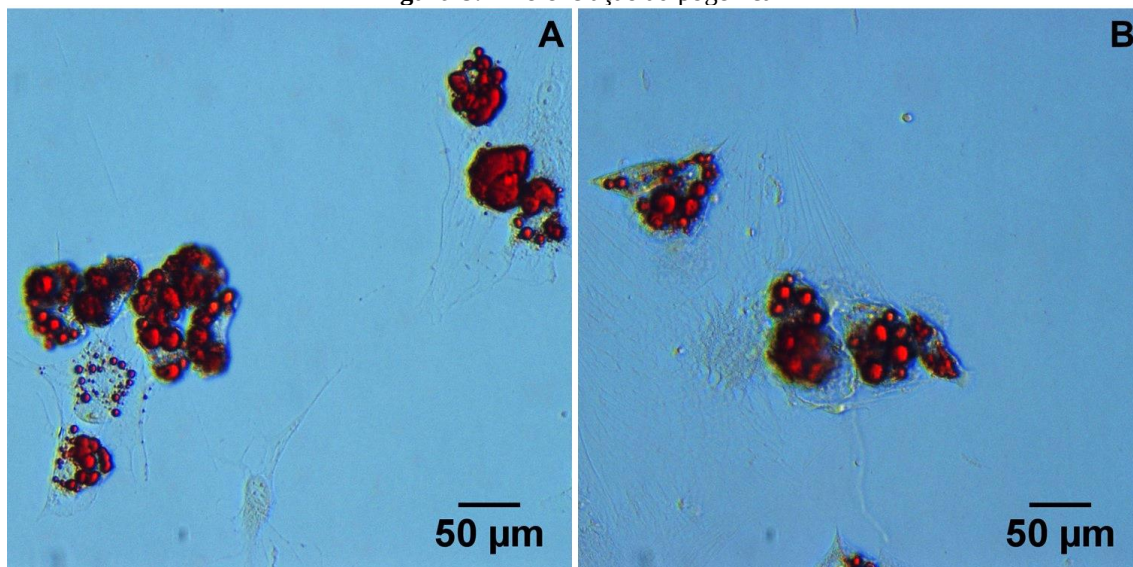
Figura 7: Diferenciação osteogênica



Diferenciação osteogênica in vitro de células-tronco/estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano, isoladas por meio de técnicas de digestão enzimática (A) e dissociação mecânica (B), com matriz óssea corada com *Alizarin Red S*. **Fonte:** Adaptado de Fuoco et al., 2020.

Já para diferenciação adipogênica, a monocamada de MSCs é incubada com isobutilmetilxantina para formar adipócitos com vacúolos lipídicos. O método de validação a ser usado é a visualização dos vacúolos lipídicos dentro dos adipócitos (Figura 8), que pode ser viabilizada através da coloração com *Oil red*, uma técnica que usa óleo solúvel em gordura para corar lipídios e gordura em secções congeladas (BARRY; MURPHY, 2004).

Figura 8: Diferenciação adipogênica

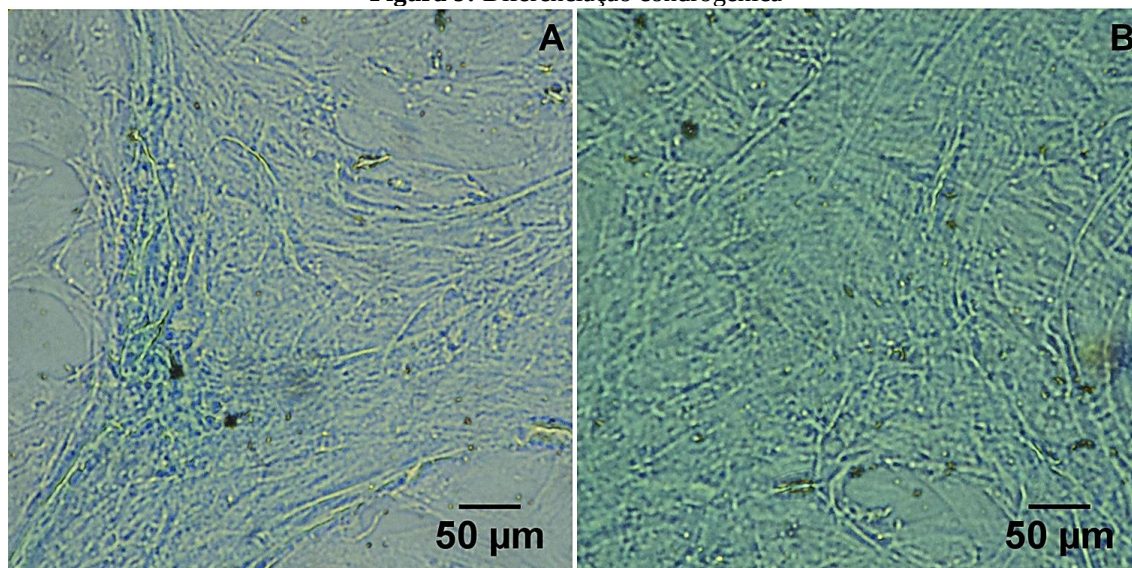


Diferenciação adipogênica in vitro de células-tronco/estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano, isoladas por meio de técnicas de digestão enzimática (A) e dissociação mecânica (B), com vacúolos lipídicos no interior citoplasmático corados com *Oil red O*. **Fonte:** Adaptado de Fuoco et al., 2020.

Por fim, a diferenciação condrogênica é estimulada inicialmente com uma cultura tridimensional no meio livre de soro e suplementado com fator de crescimento- β (BARRY; MURPHY, 2004). Durante esse processo, as MSCs começam a produzir camadas de matriz de cartilagem preenchidas com

glicosaminoglicanos (Figura 9). O método de validação usado consiste na visualização desse componente da matriz de cartilagem através de um corante policromático, que pode ser o indicador azul de toluidina, responsável por identificar os glicosaminoglicanos (BARRY; MURPHY, 2004).

Figura 9: Diferenciação condrogênica

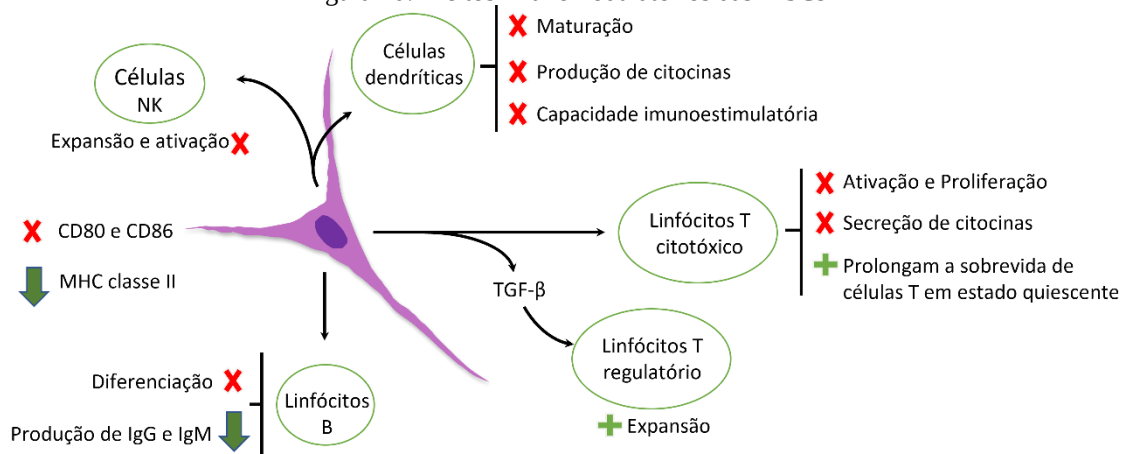


Diferenciação condrogênica in vitro de células-tronco/estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano, isoladas por meio de técnicas de digestão enzimática (A) e dissociação mecânica (B), com a síntese de proteoglicanos corada com *Alcian Blue*. **Fonte:** Adaptado de Fuoco et al., 2020.

3.2 PROPRIEDADE IMUNOMODULATÓRIA

As MSCs são caracterizadas pela baixa expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II e pela ausência de moléculas CD80 e CD86 (moléculas coestimuladoras que auxiliam na sinalização de apresentação de antígeno pelo MHC II). Tais características conferem “invisibilidade” imunológica, pois o sistema imunológico é incapaz de detectar essas células como não-próprias, o que as torna imunoprivilegiadas (GHANNAM et al., 2010; KEAN et al., 2013).

Figura 10: Efeitos imunomodulatórios das MSCs



Fonte: Próprio autor. Ilustração: Flávia Luísa Dias-Audibert.

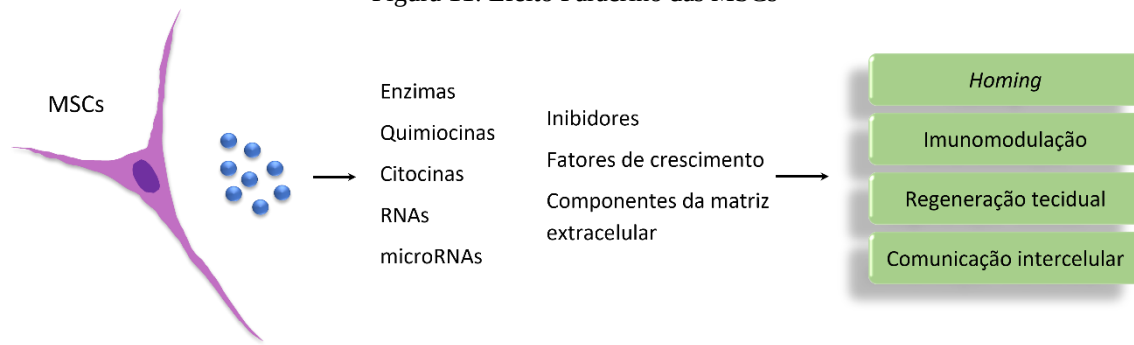
Além de serem imunoprivilegiadas, as MSCs apresentam a capacidade de imunomodulação por meio de diferentes processos, como: (i) inibição da maturação e proliferação linfocítica; (ii) redução da produção de citocinas; (iii) imunorregulação das células dendríticas, e (iv) inibição da ativação dos linfócitos T citotóxicos (Figura 10) (GHANNAM et al., 2010; KEAN et al., 2013). Além disso, as células-tronco mesenquimais dificultam a proliferação de células T ativadas, prolongam a sobrevivência de células T em estado quiescente, e induzem expansão das células T regulatórias. Tal modulação dos linfócitos T é mediada via fatores parácrinos, como a produção de TGF- β , bem como também através do contato célula-célula (GHANNAM et al., 2010; KEAN et al., 2013).

Os plasmócitos também são afetados pelas MSCs, as quais suprimem a diferenciação terminal de células B em células produtoras de anticorpos, interferindo negativamente na capacidade de produzi-los, sejam IgM ou IgG (Figura 10). Além dos linfócitos T e B, as MSCs também inibem a expansão e ativação de células NK, reduzindo sua atividade citolítica, porém os mecanismos exatos que levam a esse efeito ainda são pouco conhecidos (GHANNAM et al., 2010; KEAN et al., 2013). Portanto, observa-se que as células-tronco mesenquimais suprimem a ativação do sistema imunológico a partir da regulação das células linfocíticas e também do sistema imune inato (SCHEPERS; FIBBE, 2016). A partir dessa observação, conclui-se que a imunomodulação pode ser uma característica vantajosa para a aplicação terapêutica das MSCs, principalmente quando estas são de origem alogênica, o que reduz as chances de rejeição e intensifica o potencial terapêutico (PATEL; BARTLETT; ICHIM, 2015). Embora a imunomodulação possa ser estabelecida pelo contato célula-célula, a via parácrina é a mais descrita e será abordada em mais detalhes a seguir.

3.3 PROPRIEDADE PARÁCRINA

Pesquisas recentes têm mostrado que a capacidade de imunomodulação e também de regeneração do tecido pelas MSCs está ligada à liberação de diversos fatores, através de sua ação parácrina (PHINNEY; SENSEBÉ, 2013). Esses fatores são transportados ao local de dano através de vesículas extracelulares, sejam elas microvesículas ou exossomos (HELDLING et al., 2015; MENDT; REZVANI; SHPALL, 2019). Dentre os fatores secretados, podem ser citados: componentes da matriz extracelular, proteínas, enzimas, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, entre outros (KUPCOVA SKALNIKOVA, 2013). Tais moléculas sinalizadoras são responsáveis pela inibição da apoptose, indução de proliferação, prevenção de fibrose excessiva dos tecidos, estimulação do processo de angiogênese e imunomodulação (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; CANTINIEAUX et al., 2013; DJOUAD et al., 2007; MAGGINI et al., 2010; PATEL et al., 2010; TANG et al., 2005; ZANOTTI et al., 2016). A ação parácrina das vesículas produzidas pelas MSCs promove estímulos direcionados às células do microambiente tecidual e, caso haja alguma lesão tecidual, esses estímulos auxiliam também na recuperação do tecido (Figura 11).

Figura 11: Efeito Parácrino das MSCs



Fonte: Próprio autor. Ilustração: Flávia Luísa Dias-Audibert.

Particularmente, os exossomos representam as vesículas extracelulares que participam de forma mais significativa na comunicação intercelular das MSCs, transportando diversas moléculas como proteínas, mRNAs e microRNAs até as células alvo (BAGNO et al., 2018; BÖRGER et al., 2017; HELDRING et al., 2015; WANG et al., 2017; YANG et al., 2018). Sendo assim, os exossomos derivados das MSCs representam uma alternativa para aplicação clínica de fatores terapêuticos livre de células, o que corresponde a uma das principais vantagens do seu uso como potencial ferramenta terapêutica. Uma descrição detalhada de sua origem, características e funcionalidade será abordada no próximo capítulo, juntamente com os principais pontos positivos de sua utilização para aplicação terapêutica.

Capítulo 2

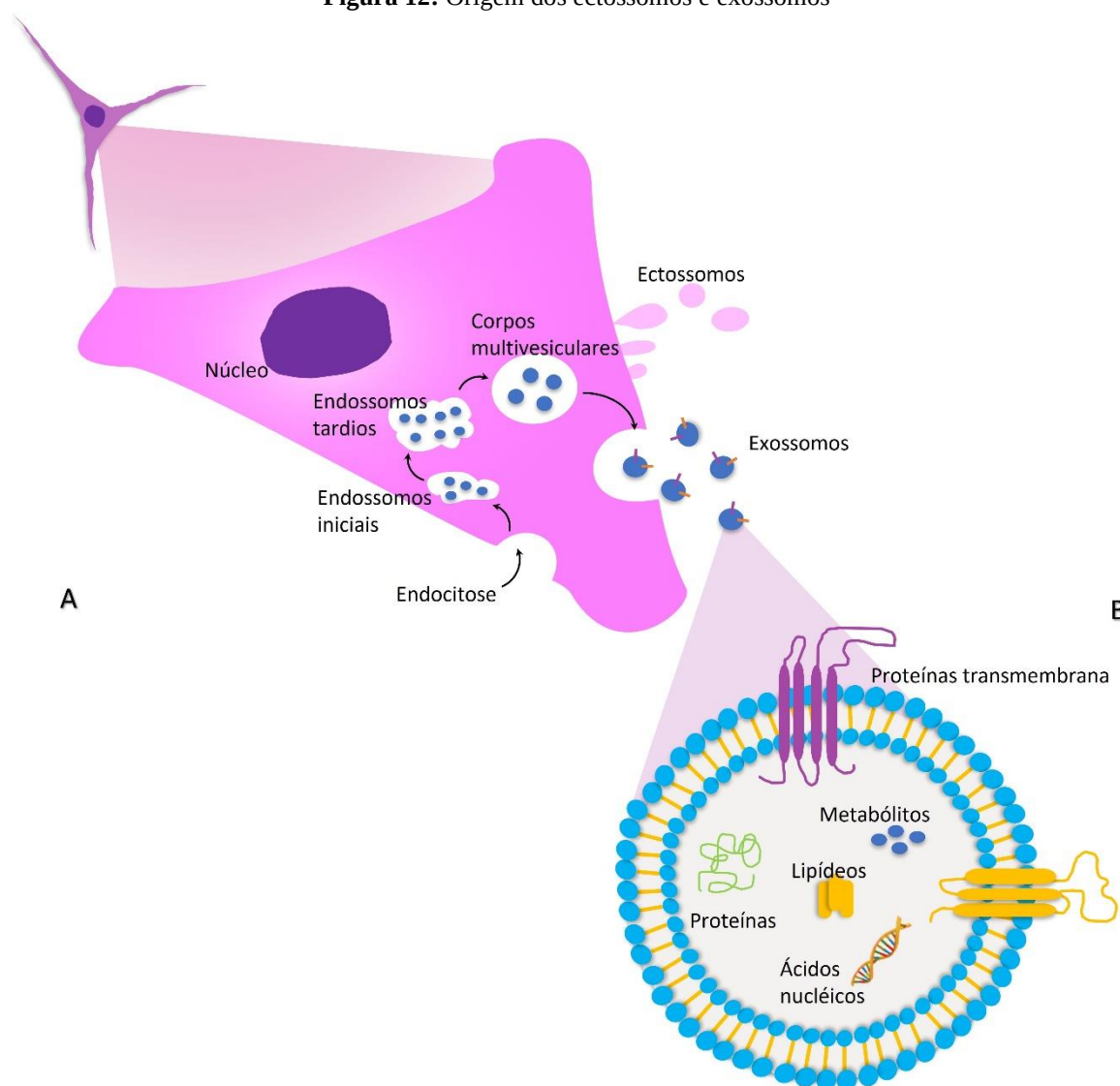
EXOSSOMOS

1 ORIGEM DOS EXOSSOMOS

As vesículas extracelulares (EVs – do inglês, “*extracellular vesicles*”) (Figura 12a) consistem em vesículas revestidas por membrana que são secretadas pelas células e são responsáveis pela comunicação intercelular por meio de transferência de diferentes moléculas bioativas, sejam elas lipídios, proteínas e RNAs (Figura 12b). Elas são subdivididas em duas categorias: ectossomos e exossomos (KALLURI; LEBLEU, 2020; LÖTVALL et al., 2014).

Os ectossomos (Figura 12a) consistem em vesículas derivadas de brotamento da membrana plasmática e podem variar em diâmetro, desde ~50 nm até 1 µm (KALLURI; LEBLEU, 2020). Já os exossomos têm origem endossomal e seu diâmetro pode variar de ~40 nm até 160 nm. São formados a partir do processo de endocitose, que gera os endossomos iniciais localizados no citosol (Figura 12a). Esses endossomos amadurecem, tornam-se endossomos tardios e posteriormente apresentam-se como corpos multivesiculares, os quais são liberados da célula após a sua fusão com a membrana plasmática (HYENNE et al., 2015; KALLURI; LEBLEU, 2020). Depois da sua liberação no ambiente extracelular, eles são direcionados a células do microambiente ou são transportados para locais distantes através dos fluidos biológicos, atuando como mensageiros e participando de diversos processos fisiológicos e patológicos (YIN; WANG; ZHAO, 2019). Os exossomos são constantemente produzidos e liberados por diferentes tipos celulares, sendo que essa produção já está bem estabelecida para alguns, como: reticulócitos, linfócitos B e T, plaquetas, mastócitos, células epiteliais intestinais, células dendríticas, células neoplásicas e células imunes do sistema nervoso (microglia e neurônios) (FÉVRIER; RAPOSO, 2004; NIKFARJAM et al., 2020; POTOLICCHIO et al., 2005).

Figura 12: Origem dos ectossomos e exossomos



Fonte: Próprio autor. **Ilustração:** Flávia Luísa Dias-Audibert.

A produção de exossomos depende da biologia da célula de origem e do seu microambiente, já que a sua produção está vinculada ao estado da célula e à demanda do meio externo; sendo assim, os exossomos variam quanto ao seu tamanho, conteúdo interno, receptores de superfície celular, funcionalidade e origem celular. A heterogeneidade dos exossomos dificulta a padronização de métodos de identificação e purificação devido às variáveis citadas acima (MATHIEU et al., 2019; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). De acordo com uma declaração de posição realizada em 2014 pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (do inglês, "*International Society for Extracellular Vesicles*"), não há marcadores específicos de vesículas extracelulares que possam ser utilizados como padrões básicos, dificultando a implementação de um único método de identificação padrão (LÖTVALL et al., 2014).

Atualmente, a morfologia e o tamanho são usados para discriminar as diferentes classes de EVs, sendo que os procedimentos já estabelecidos são: ultracentrifugação, separação por gradiente de densidade, cromatografia, captura por imunoafinidade (IAC) e precipitação baseada em polímero. O método mais eficaz para isolar exossomos é a IAC, que se baseia em anticorpos imobilizados capazes de reconhecer

proteínas específicas de membrana, dependendo do tipo celular estudado. No entanto, pode haver situações em que não haja anticorpos adequados para identificação; em tais casos, o uso da separação baseada na densidade é o mais indicado para o isolamento dos exossomos (GREENING et al., 2015; LÖTVALL et al., 2014).

1.1 EXOSSOMOS DERIVADOS DE MSCS

Dentre as células que produzem exossomos, as MSCs representam um grupo celular com características peculiares e cujos exossomos têm sido intensamente avaliados quanto à potencial aplicabilidade. Exossomos derivados de MSCs atuam por meio de transferência horizontal de lipídeos funcionais, mRNAs, miRNAs e proteínas, agindo em diversos processos nas células-alvo, desde modulação de expressão gênica a diversas vias de sinalização e metabolismo (PASHOUTAN SARVAR; SHAMSASENJAN; AKBARZADEHLEH, 2016; TOMASONI et al., 2013).

Estudos envolvendo a administração sistêmica de exossomos derivados de MSCs, via injeção intravenosa, têm mostrado que essas EVs apresentam capacidade de *homing*, ou seja, se deslocam do local administrado até sítios de lesão (GRANGE et al., 2014). Após testes *in vivo* de administração de exossomos para fins terapêuticos, sua biodistribuição tem se mostrado um processo dinâmico com rápida fase de distribuição para fígado, baço e pulmões (aproximadamente 30 minutos após a administração), seguida por uma fase de eliminação via processamento hepático e renal (remoção de EVs) em 1-6 horas após a administração (LAI et al., 2014). Além da administração sistêmica, a administração intranasal também tem sido avaliada para, por exemplo, lesões de sistema nervoso central como isquemia cerebral. Comparando as vias intravenosa e intranasal, esta última tem apresentado melhor biodistribuição no cérebro, levando a um acúmulo de exossomos maior no local do cérebro afetado (BETZER et al., 2017).

Considerando os efeitos terapêuticos, estudos pré-clínicos com exossomos derivados de MSCs têm confirmado sua ação benéfica frente a diversas doenças e lesões, como, por exemplo: infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, lesão cerebral hipóxico-isquêmica perinatal e isquemia do membro posterior (OPHELDERS et al., 2016; TENG et al., 2015; XIN et al., 2013). Outros estudos mostraram também a indução da reepitelização em feridas cutâneas, regeneração muscular e potencial ação neuro-protetora (BONAFEDE et al., 2016; NAKAMURA et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

1.2 MEIO CONDICIONADO DERIVADO DAS MSCS (MSC-CM)

Uma das fontes de obtenção dos exossomos de células tronco mesenquimais, seja para fins terapêuticos ou de pesquisa, pode ser o meio condicionado, isto é, o meio de cultura celular em que as MSCs são cultivadas. O MSC-CM contém citocinas, fatores de crescimento, biomoléculas, exossomos e demais vesículas liberadas pela célula no meio de cultura (SAGARADZE et al., 2019). A maioria dos laboratórios isola os exossomos derivados das MSCs a partir do meio condicionado via ultracentrifugação e os caracterizam com base nas suas respectivas proteínas de membrana e conteúdo interno (PHINNEY;

PITTENGER, 2017). Atualmente, estudos estão desenvolvendo novos métodos de isolamento e identificação que sejam mais precisos e padronizados. Entretanto, os exossomos isolados não são os únicos que têm apresentado resultados promissores, sendo que o meio condicionado não fracionado também tem demonstrado efeitos benéficos quando aplicado tanto em modelos animais, quanto em estudos clínicos, como, por exemplo para terapêutica de esclerose múltipla, artrite inflamatória e lesão da medula espinal (CANTINIEAUX et al., 2013; DAHBOUR et al., 2017; KAY et al., 2017). Diante disso, é importante estabelecer parâmetros comparativos para avaliar a melhor estratégia terapêutica, seja com base em terapia celular ou em produtos biológicos derivados de cultura celular.

2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS vs EXOSSOMOS/MEIO CONDICIONADO

Nesta seção, as estratégias terapêuticas de aplicação de células-tronco mesenquimais e de aplicação de exossomos/meio condicionado serão comparadas de acordo com as variáveis descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Variáveis usadas para comparação de estratégias terapêuticas:

Variáveis	Estratégia terapêutica
Dose	Células-tronco mesenquimais vs Exossomos/Meio condicionado
Número de aplicações	
Tempo de ação	
Via de administração	
Probabilidade de mutações	
Efeitos adversos	

Fonte: Próprio autor.

Todas as variáveis associadas à estratégia terapêutica dependem do tipo de doença/lesão, estado do paciente, urgência de tratamento, entre outras. As MSCs podem ser aplicadas em menor número de doses ao paciente, devido a sua ação duradoura, já que essas células se alojam no tecido e lá produzem os exossomos ricos em fatores que vão atuar de acordo com a demanda tecidual. Entretanto, a quantidade de MSCs que atinge o tecido alvo tende a ser menor que a dose administrada, já que ao longo da rede vascular as células podem ser retidas em diferentes órgãos. Sendo assim, é possível que a administração de MSCs não atinja o tecido alvo com a concentração celular adequada e necessária para o reparo tecidual, diferentemente dos exossomos purificados, os quais podem ser utilizados em doses concentradas para potencializar sua ação. Dessa forma, a ação terapêutica dos exossomos pode apresentar maior efetividade a curto-prazo, quando comparados às MSCs (GOMZIKOVA; RIZVANOV, 2017; PHINNEY; PITTENGER, 2017).

Como observado acima, o tempo de ação pode ser influenciado pela dose do insumo terapêutico, mas também pode variar de acordo com a via de administração, ou seja, uma injeção direta no local lesionado pode levar à ação mais rápida e assertiva do que a via endovenosa. Porém, em se tratando de injeção direta, outros fatores devem ser levantados, como os procedimentos cirúrgicos para acessar o tecido lesionado, que acabam sendo muito invasivos para o paciente (HERBERTS; KWA; HERMSEN, 2011). A via endovenosa é menos invasiva que a injeção direta, mas a dose administrada é diluída pelo corpo

humano, no sentido de que a concentração de MSCs ou exossomos que alcança o tecido lesionado é menor que a dose total administrada. Outro fator importante em relação ao tempo de ação e eficácia do tratamento é o tamanho dos exossomos, já que são pequenas vesículas e circulam facilmente no organismo humano. As MSCs apresentam dimensões muito maiores comparadas aos exossomos, o que dificulta sua circulação e muitas não vão além da primeira passagem pelo leito capilar, ficando retidas geralmente nos pulmões (ÖZTÜRK et al., 2021; PHINNEY; PITTENGER, 2017).

Outro ponto importante a ser considerado é que os exossomos derivados de MSCs são passíveis de aplicação como terapia *cell-free*, alternativa à terapia celular baseada em MSCs. Os exossomos são facilmente produzidos em laboratório (comparado à produção de MSCs), apresentam mínima probabilidade de levar mutações às células receptoras e consequentemente induzir a formação de tumores. Diferentemente dos exossomos, as MSCs possuem a probabilidade de apresentar mutações a nível de DNA em decorrência das muitas passagens *in vitro*. Tais alterações podem não ser detectadas pelos protocolos de controle de qualidade e, caso as células portadoras sejam utilizadas *in vivo*, há chances de desenvolvimento de tumores, a depender da mutação (GOMZIKOVA; RIZVANOV, 2017; ÖZTÜRK et al., 2021; PHINNEY; PITTENGER, 2017).

Um dos pontos positivos na proposta de aplicação dos exossomos está na menor propensão a gerar efeitos adversos, como pode acontecer em situações de aplicação das MSCs (HERBERTS; KWA; HERMSEN, 2011). Como exemplos de efeitos adversos que podem ser evitados tem-se a embolia pulmonar e o infarto (YIN; WANG; ZHAO, 2019). Ambos os eventos adversos foram observados entre membros de uma mesma família que tomaram várias injeções via intravenosa de AD-MSCs autólogas, conforme descrito por Jung e colaboradores (2013). Os pacientes, pai e filho, receberam o mesmo tratamento para diferentes doenças, sendo elas: osteoartrite de joelho (3 tratamentos com injeções de AD-MSCs) e hérnia de disco cervical (5 tratamentos com injeções de AD-MSCs), respectivamente (JUNG et al., 2013). Diante desses fatos, a administração de células pode apresentar sérios efeitos adversos, portanto é válido estabelecer estudos comparativos entre terapias celulares e terapias *cell-free*, cujo risco teórico de causar embolia ou infarto é menor.

Mesmo diante das características mencionadas, ainda é difícil chegar a conclusões a respeito de estratégias definitivas sobre efetividade e potência quanto ao uso de MSCs ou exossomos, que apresentem a máxima eficácia com o mínimo de efeitos adversos. Fazem-se necessários mais estudos com controles apropriados, dosagem comparável, avaliação dos diferentes desfechos da doença, variações na frequência e tempo de administração de cada dose, e efeitos adversos reduzidos, o que torna a aplicação de exossomos em larga escala e seu uso como alternativa terapêutica um desafio atual, mas com potencial para aplicação futura (GOMZIKOVA; RIZVANOV, 2017; HERBERTS; KWA; HERMSEN, 2011; PHINNEY; PITTENGER, 2017).

3 DESAFIOS DA UTILIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS NA CLÍNICA

Os exossomos apresentam-se como alternativas terapêuticas promissoras, mas, apesar dos benefícios de sua aplicação na medicina regenerativa, ainda há alguns desafios que devem ser elucidados a fim de se obter uma aplicação clínica bem-sucedida (JAFARI et al., 2020; KICHENBRAND et al., 2019; TAYLOR; SHAH, 2015), sendo eles:

- a) protocolos de controle de qualidade e padronização de bioprocessos das terapias baseadas em exossomos e MSC-CM;
- b) heterogeneidade dos exossomos e fatores contidos nas MSC-CM;
- c) produção em larga escala de exossomos, obtendo a quantidade mínima necessária para aplicação clínica.

A heterogeneidade é um importante fator a ser considerado, já que os métodos de extração de vesículas extracelulares possuem taxa de recuperação e eficiência distintas, dificultando a obtenção de uma fração pura de exossomos isolados. Além disso, os exossomos de uma única célula podem variar entre si quanto à composição interna, em diferentes parâmetros de cultura e estágio de crescimento. Assim, a realização de métodos de purificação é prejudicada e, conseqüentemente, a padronização de metodologias escalonáveis também o são (KALLURI; LEBLEU, 2020; WILLIS; KOUREMBANAS; MITSIALIS, 2017).

Outro desafio quanto à aplicação terapêutica é a interação dos exossomos com o microambiente tumoral. Estudos vêm demonstrando que exossomos liberados de células leucêmicas reprogramam as MSCs do paciente para promover e reforçar o desenvolvimento do nicho tumoral (microambiente das células leucêmicas) (PHINNEY; PITTENGER, 2017). Outros estudos têm mostrado que exossomos derivados de MSCs de pacientes com mieloma múltiplo podem expressar níveis mais elevados de citocinas oncogênicas em comparação com aqueles de pacientes normais, promovendo o crescimento de células tumorais *in vivo* e a comunicação das células cancerosas com o microambiente (ROCCARO et al., 2013). Os fatos mencionados acima demonstram a dificuldade de se aplicar terapias com exossomos derivados de MSC autólogas em casos de pacientes com câncer, o que reforça a necessidade de testes prévios e comparativos entre diferentes alternativas terapêuticas.

Embora haja dados pré-clínicos que evidenciem os benefícios da terapia baseada em exossomos derivados de MSCs, ainda há grande demanda por estudos quanto às condições de cultura celular padrão e protocolos ideais de produção, purificação e armazenamento de exossomos. Além disso, também é necessário determinar a dose e a via de administração ideais, bem como o procedimento padrão de administração a fim de avaliar a eficácia desse novo tipo de terapia *cell-free* (NIKFARJAM et al., 2020; SQUILLARO; PELUSO; GALDERISI, 2016). Diante dessa demanda, no capítulo seguinte serão abordados alguns estudos clínicos completos e em desenvolvimento com aplicação de exossomos e MSC-CM como terapias *cell-free*, mas também de MSCs como terapia celular. A partir desses e de estudos

futuros, será possível estabelecer melhores estratégias terapêuticas e delinear a melhor abordagem, seja com base em células MSCs ou em exossomos/meio condicionado.

APLICABILIDADE DAS MSCs E EXOSSOMOS NA SAÚDE

1 POTENCIAL DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA SAÚDE

Nos últimos anos, as propriedades das células-tronco mesenquimais (MSCs) têm mostrado um grande potencial terapêutico para diversas doenças e lesões. Tal potencial resulta de características como: i) diferenciação em várias linhagens celulares, ii) produção de fatores tróficos cruciais para a sobrevivência e proliferação celular, iii) modulação da resposta imune, e iv) migração para o local exato da lesão (*homing*) (SQUILLARO; PELUSO; GALDERISI, 2016). Existem atualmente diversos ensaios clínicos que avaliam a aplicação terapêutica de MSCs, os quais podem ser consultados no banco de dados ClinicalTrials.gov, sob a responsabilidade do *National Institute of Health* (NIH), agência norte-americana de pesquisa biomédica. Com base nesse banco de dados, a seguir serão abordados alguns estudos clínicos envolvendo células-tronco mesenquimais.

1.1 APLICAÇÃO CLÍNICA

O Quadro 2 traz as informações resumidas dos ensaios clínicos atuais envolvendo a aplicação de células-tronco mesenquimais como alternativas terapêuticas. Todos os estudos citados serão descritos em maiores detalhes em seguida.

Quadro 2 - Estudos Clínicos envolvendo células-tronco mesenquimais.

TÍTULO DO ESTUDO	DOENÇA	ESTRATÉGIA	FASE	NCT*
Uso de MSCs para engenharia tecidual de osso alveolar em pacientes com fissura labiopalatina	Fissura labial e fenda palatina	MSCs da polpa dentária decídua associadas a biomaterial de colágeno e hidroxiapatita	Finalizado	NCT01932164
Efeito da transfusão de MSCs em pacientes com neuropatia periférica diabética.	Neuropatia Periférica Diabética	MSCs autólogas da medula óssea	Finalizado	NCT02387749
Transferência intracoronária de MSCs derivadas de geléia de Wharton em pacientes com infarto agudo do miocárdio	Infarto agudo do miocárdio	Células-tronco mesenquimais derivadas de geléia de Wharton umbilical	Fase 2	NCT01291329
MSCs derivadas do tecido do cordão umbilical (UC) versus placebo para tratar a inflamação pulmonar aguda devido a COVID-19	COVID-19	Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido do cordão umbilical	Fase 1	NCT04490486
Avaliação da segurança e eficácia de MSCs alogênicas (AC607) para o tratamento de lesão renal em pacientes de cirurgia cardíaca	Lesão Renal Aguda	AC607 (MSCs alogênicas)	Finalizado	NCT01602328

*Número de Identificação do ensaio clínico no banco de dados ClinicalTrials.gov.

Fonte: Adaptado de ClinicalTrials.gov. Acesso em: 24 abr. 2021.

1.1.1 Uso de MSCs para engenharia tecidual de osso alveolar em pacientes com fissura labiopalatina

Atualmente, a reconstrução do esqueleto craniofacial em pacientes com fissura labiopalatina é realizada através de três cirurgias ao longo dos primeiros anos do paciente (até os 8-12 anos). A cirurgia final corresponde à implementação de autoenxerto ósseo, que consiste em retirar um fragmento ósseo do próprio paciente de uma localização específica (por exemplo, crista ilíaca, costelas, crânio) para inseri-lo no local lesionado. Como consequência do processo cirúrgico, a região doadora de tecido ósseo pode apresentar deformidade e incapacidade física, o que se torna um grande desafio para a cirurgia plástica reconstrutiva. Com o advento da bioengenharia tecidual, entretanto, a osteogênese induzida pelo uso de células-tronco mesenquimais associadas a biomateriais tornou-se uma solução potencial para eliminar a morbidade na região doadora, a escassez de osso doador e consequentemente reduzir os custos de permanência do paciente em centro cirúrgico (TANIKAWA et al., 2020; TRIAL.GOV, 2016).

O objetivo deste estudo foi realizar a engenharia do tecido ósseo para reconstruir o defeito ósseo alveolar em pacientes com fissura labiopalatina. Para tal, utilizaram-se MSCs autólogas de polpa dentária decídua associadas a biomaterial de colágeno e hidroxiapatita (Geistlich Bio-Oss®) por meio de métodos prospectivos qualitativos e análise quantitativa da neoformação óssea. O Bio-Oss collagen® (Geistlich Biomaterials AG, Wolhusen, Alemanha) é um osso esponjoso bovino (xenoenxerto) desproteinizado, que se assemelha ao osso humano com propriedades osteocondutoras e osteoindutivas inerentes. Sua estrutura é formada por hidroxiapatita, a qual é composta de um sistema de poros interconectados que facilitam a aderência celular e o crescimento vascular. Este xenoexerto contém 10% de colágeno, tornando o biomaterial mais moldável e com maior facilidade de manuseio (TANIKAWA et al., 2020; WONG; RABIE, 2010). As MSCs autólogas foram depositadas sobre o biomaterial, e a estrutura combinada foi aplicada em pacientes com fissura labiopalatina.

O estudo teve início em maio de 2013 e término em dezembro de 2015. Neste estudo, o resultado dos pacientes tratados com células-tronco foi comparado com resultados prévios de pacientes que foram tratados com rhBMP-2 (grupo 1) e autoenxerto (grupo 2). O rhBMP-2 é um fator de crescimento administrado em pacientes com lesão óssea, como tratamento alternativo ao autoenxerto. Todos os pacientes tratados com células-tronco apresentaram mineralização óssea >75% e pequenas quantidades de hidroxiapatita ainda presentes ao longo dos 12 meses de acompanhamento. Quanto a morbidade, pacientes tratados com MSCs não tiveram complicações cirúrgicas, enquanto 37,5% dos pacientes do grupo 1 apresentaram complicações pós-operatórias e 87,5% do grupo 2 apresentam reclamações de dor na segunda semana. Durante 5 anos, os pacientes tratados com MSCs foram monitorados e, até o momento, não detectaram complicações ou riscos associados a esta nova terapia (TANIKAWA et al., 2020).

1.1.2 Efeito da transfusão de MSCs em pacientes com neuropatia periférica diabética

Em se tratando de diabetes mellitus, uma consequência debilitante da doença é a neuropatia diabética, a qual representa a complicação mais comum. A hiperglicemia induz a redução na produção de

fatores de crescimento angiogênicos e neurotróficos, que são necessários para a função normal dos neurônios, células gliais e manutenção da estrutura vascular. O tratamento atual se concentra em um controle glicêmico rígido, o que pode reduzir os fatores de risco de dano neuronal e controle da dor associada à neuropatia diabética, porém, até o momento, não há nenhum tratamento definitivo para reverter a mesma (RIAD, 2015).

As MSCs são agentes terapêuticos particularmente atraentes devido a sua capacidade de autorrenovar, diferenciação e secreção de fatores capazes de estimular a neovascularização e regeneração neural. A natureza aderente das MSCs as torna fáceis de expandir em cultura, tornando-se candidatas atraentes para uso em terapia celular. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da transfusão de MSCs em pacientes diabéticos com neuropatia periférica diabética (RIAD, 2015). O estudo teve início em maio de 2014 e término em dezembro de 2016.

De acordo com os resultados apresentados na plataforma, observou-se que, após 90 dias da administração intravenosa das MSCs, houve aumento da concentração dos fatores FGF- β e VEGF, que apresentam ação angiogênica e neurotrófica. Esse aumento sugere que as MSCs estão liberando esses fatores através de sua ação parácrina. Além disso, observou-se melhoria da condição diabética, como redução do nível de glicose e de hemácias glicadas no sangue, diminuição em necessidades de insulina e melhoria do estado geral, sem efeitos adversos graves ao longo dos 3 meses de estudo.

1.1.3 Transferência intracoronária de MSCs derivadas de geleia de Wharton (WJ-MSCs) em pacientes com infarto agudo do miocárdio

O infarto agudo do miocárdio caracteriza-se pela oclusão de uma artéria coronária epicárdica que leva a uma situação clínica de extrema gravidade e com risco de vida. As WJ-MSCs do cordão umbilical humano originam-se do mesoderma no 13º dia do desenvolvimento do embrião e apresentam uma combinação da maioria dos marcadores de células-tronco MSCs e ESCs durante o cultivo celular nas primeiras passagens, mas mantêm a característica de multipotência (GAO et al., 2015). Tal característica contribuiu para a observação do potencial de diferenciação em cardiomiócitos que as WJ-MSCs apresentam, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, essas células não levantam questões éticas, apresentam plasticidade multipotente, e são imunoprivilegiadas (GAO et al., 2015). Diante de todas essas características, o objetivo deste estudo foi investigar a segurança e eficácia da transferência de WJ-MSCs humanas via intracoronariana em pacientes com infarto agudo do miocárdio (NAVY GENERAL HOSPITAL, 2011).

O estudo teve início em fevereiro de 2011 e término em julho de 2012, e os resultados foram publicados na revista *BMC Medicine Medical Journal*. Durante o acompanhamento de 18 meses, dois grupos foram avaliados. O primeiro recebeu tratamento com as WJ-MSCs e o segundo recebeu placebo. As taxas de efeitos adversos e testes laboratoriais, incluindo índices tumorais, imunológicos e hematológicos, não foram diferentes entre os dois grupos, mostrando segurança do método empregado com

WJ-MSCs. Além disso, a infusão intracoronariana de WJ-MSCs apresentou-se eficaz em pacientes com infarto agudo do miocárdio, fornecendo terapia clinicamente relevante dentro de uma janela de tempo favorável (GAO et al., 2015). Os resultados apresentados mostram que a infusão de WJ-MSCs é relativamente segura por pelo menos até 18 meses. Este estudo, portanto, incentiva ensaios clínicos adicionais para determinar se WJ-MSCs podem servir como uma nova alternativa para terapia baseada em células-tronco voltada para doenças cardíacas (GAO et al., 2015).

1.1.4 MSCs derivadas do tecido do cordão umbilical (UC) versus placebo para tratar a inflamação pulmonar aguda devido à COVID-19

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19) é uma doença altamente transmissível na comunidade. A principal causa clínica que leva à morte é a tempestade de citocinas no pulmão que leva à inflamação exacerbada e à síndrome respiratória aguda grave. De acordo com estudos experimentais, as MSCs podem reduzir significativamente a inflamação pulmonar e o comprometimento patológico de diferentes tipos de lesão pulmonar. O objetivo deste estudo é demonstrar a segurança e potencial eficácia de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido do cordão umbilical (UC-MSCs) administradas por via intravenosa em pacientes com inflamação pulmonar aguda causada pela COVID-19 com sintomas moderadamente graves. O estudo foi cadastrado na plataforma ClinicalTrials.gov, porém ainda não se iniciou o recrutamento. Estima-se que o estudo inicie em setembro de 2021 e termine em junho de 2024 (HARE, 2020).

1.1.5 Avaliação da segurança e eficácia de MSCs alogênicas (AC607) para o tratamento de lesão renal em pacientes de cirurgia cardíaca

A lesão renal aguda é uma das principais complicações da cirurgia cardíaca, por isso alguns estudos pré-clínicos testaram a aplicação de BM-MSCs em pacientes com esse tipo de lesão e observaram efeitos benéficos (SWAMINATHAN et al., 2018). Diante desses dados, o presente estudo teve como objetivo avaliar a segurança e eficácia da aplicação de MSCs alogênicas (AC607) em paciente de cirurgia cardíaca com lesão renal aguda pós-operatória precoce (INC., 2014). O estudo teve início em maio de 2012 e término em agosto de 2014. Esperava-se que os pacientes que receberam esse tratamento tivessem um aumento na recuperação funcional renal após cirurgia cardíaca, porém não houve diferença no tempo de recuperação renal, na taxa de diálise, na mortalidade em 30 dias ou nos eventos adversos (SWAMINATHAN et al., 2018). Esses resultados contrastam com aqueles apresentados pelos estudos pré-clínicos e levantam questões relacionadas à sua utilidade clínica quanto a recuperação da lesão renal aguda no contexto de cirurgia cardíaca. Embora a maioria dos estudos indiquem resultados promissores, é imprescindível que todos os testes sejam realizados, com todos os parâmetros bem definidos para que a segurança, eficácia e viabilidade da proposta terapêutica sejam garantidos. Esse último estudo é um indicativo de que, para a lesão renal após cirurgia cardíaca, a terapia celular com MSCs talvez não seja a melhor alternativa, contribuindo para que novas abordagens sejam elaboradas e apresentem melhores resultados.

2 POTENCIAL DOS EXOSSOMOS NA SAÚDE

Os exossomos representam vesículas promissoras como sistemas de liberação de biomoléculas, conforme demonstrado anteriormente. Em estudos pré-clínicos, os exossomos se mostraram seguros e passíveis de escalonamento, como potencial farmacêutico (MENDT; REZVANI; SHPALL, 2019). Existem atualmente diversos ensaios clínicos avaliando a aplicação de exossomos derivados de MSCs, bem como analisando seu uso para “delivery” de fármacos, relatados no ClinicalTrials.gov. A seguir serão abordados alguns estudos clínicos envolvendo exossomos.

2.1 APLICAÇÃO CLÍNICA

O Quadro 3 traz as informações resumidas dos ensaios clínicos atuais envolvendo a aplicação de exossomos como terapêuticos, além de sua potencial atuação como biomarcadores para fins de diagnóstico de doenças. Todos os estudos citados são descritos em maiores detalhes em seguida.

Quadro 3 - Estudos Clínicos envolvendo exossomos.

Título do Estudo	Doença	Estratégia	Fase	NCT*
iExossomos no tratamento de pacientes com câncer de pâncreas metastático com mutação KrasG12D	Câncer metastático pancreático com mutação KrasG12D	iExossomos	Fase 1	NCT03608631
Papel de microRNAs no diagnóstico de pré-eclâmpsia	Pré-eclâmpsia	Identificar a expressão de miRNAs 136, 494 e 495 em exossomos	Finalizado	NCT03562715
Estudo clínico piloto sobre inalação de exossomos de MSCs no tratamento de pneumonia grave por coronavírus	COVID-19	Exossomos derivados de MSCs	Fase 1	NCT04276987
Avaliação de Segurança e Eficácia de MSC-Exos de tecido Adiposo Alogênico em Pacientes com Doença de Alzheimer	Doença de Alzheimer	Exossomos derivados da AD-MSCs alogênicas	Fase 1 e 2	NCT04388982

* Número de Identificação do ensaio clínico no banco de dados ClinicalTrials.gov

Fonte: Adaptado de ClinicalTrials.gov. Acesso em: 24 abr. 2021.

2.1.1 iExossomos no tratamento de pacientes com câncer de pâncreas metastático com mutação KrasG12D

O câncer de pâncreas mais comum é do tipo adenocarcinoma e pelo fato de ser de difícil detecção e ter comportamento agressivo, apresenta alta taxa de mortalidade, por conta do diagnóstico tardio (INCA, 2021). Mutações na GTPase KRAS com consequente ativação oncogênica são comumente encontradas em adenocarcinoma ductal pancreático, mas o silenciamento do gene oncogênico KRAS por manipulação genética *in vivo* tem inibido a progressão tumoral (KAMERKAR et al., 2017). As terapias a partir de RNAs de interferência (siRNA) vêm sendo aplicadas *in vitro* e *in vivo*, porém ainda são um desafio quanto ao uso de transportadores eficientes para aplicação clínica. Visto isso, este estudo de fase I pretende utilizar exossomos derivados de MSCs contendo siRNA KrasG12D (iExossomos), capazes de agir no gene oncogênico de interesse (ANDERSON, 2018). Os dois principais objetivos do estudo são determinar a dose máxima tolerada dos iExossomos e a toxicidade dose-limitante. É o estudo mais recente envolvendo exossomos, com início em janeiro de 2021, com previsão de término em março de 2022, e atualmente está na fase de recrutamento.

2.1.2 Papel de microRNAs no diagnóstico de pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma das complicações mais ameaçadoras da gravidez. Até o momento atual, nenhuma terapia segura e eficaz, nem biomarcadores assertivos para a descoberta precoce da PE foram alcançados. Diversos estudos têm mostrado expressões alteradas de miRNAs em pacientes com PE na gravidez. Um deles demonstra que células MSCs de placenta de pacientes com PE apresentaram elevada expressão de miRNA-136, miRNA-494 e miRNA-495, associando-os a um ambiente favorável para a doença (LV et al., 2019). Diante dos dados observados, o objetivo do estudo foi identificar a expressão gênica dos miRNAs descritos acima em exossomos presentes no sangue periférico em comparação com aqueles presentes no meio condicionado das UC-MSCs em pacientes com PE, como marcadores valiosos para o prognóstico precoce de PE (MAURICE, 2018).

O estudo teve início em novembro de 2016 e término em dezembro de 2017, e os resultados foram publicados na revista *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Observou-se no estudo que pacientes com PE apresentaram níveis significativos de superexpressão dos miRNA-136, miRNA-494 e miRNA-495 em exossomos, tanto do sangue periférico quanto das UC-MSCs, em comparação com gestações normais. Nos exossomos presentes no sangue periférico de pacientes com PE, observou-se a superexpressão de 6.4 vezes do miRNA-136, 3.9 vezes do miRNA-494 e 2.1 vezes do miRNA-495. Já naqueles presentes nas UC-MSCs, observou-se a superexpressão de 3.25 vezes do miRNA-136, 5.3 vezes do miRNA-494 e 4.3 vezes do miRNA-495. A partir dos resultados apresentados, os autores sugerem que os miRNAs estudados podem ser usados como potenciais biomarcadores não invasivos para a detecção precoce de PE. Dessa forma, o trabalho indica que os exossomos podem ser utilizados não só como vesículas transportadoras, mas também como fonte de

biomarcadores(MOTAWI et al., 2018).

2.1.3 Estudo clínico piloto sobre inalação de exossomos de MSCs no tratamento de pneumonia grave por corona vírus

Conforme já mencionado anteriormente, a resposta imunológica exacerbada na infecção pelo SARS-CoV-2 representa uma característica da COVID-19 e pode levar à síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Esta provoca lesões pulmonares graves e conseqüentemente, pode levar à morte ou a uma longa reabilitação após a alta hospitalar (RUIJIN HOSPITAL, 2020a). De acordo com estudos experimentais, as células-tronco mesenquimais podem reduzir significativamente a inflamação pulmonar e o comprometimento patológico de diferentes tipos de lesão pulmonar. Espera-se, portanto, que os exossomos derivados de MSCs, quando inalados, tenham o mesmo efeito terapêutico sobre a pneumonia, reduzindo a inflamação e os danos ao tecido pulmonar e estimulando os processos regenerativos. Sendo assim, o objetivo deste estudo piloto foi explorar a segurança e eficiência da inalação de aerossol com exossomos derivados de AD-MSCs alogênicas em pacientes graves com pneumonia pelo novo coronavírus (RUIJIN HOSPITAL, 2020a). O estudo teve início em fevereiro de 2020 e término em julho de 2020. Os resultados foram submetidos na plataforma do ClinicalTrials.gov, porém não estão disponíveis para acesso. Embora não seja possível acessar os resultados até o presente momento, o trabalho vem apresentar alternativas de aplicação dos exossomos como estratégias terapêuticas, não só para doenças degenerativas por si só, mas também doenças infecciosas que podem levar a quadros de degeneração tecidual. Ou seja, existe um grande potencial de aplicação de exossomos na área médica, mas todas as propostas devem ser testadas previamente para garantir a segurança, eficácia e viabilidade.

2.1.4 Avaliação de Segurança e Eficácia de MSC-Exos de Tecido Adiposo Alogênico em Pacientes com Doença de Alzheimer

Até o momento, não existem tratamentos eficazes para prevenir, conter ou reverter a doença de Alzheimer. Os exossomos derivados de MSCs estão envolvidos na comunicação célula-célula, sinalização celular, modulação do metabolismo a curtas ou longas distâncias no corpo, e podem influenciar as respostas teciduais a lesões, infecções e doenças degenerativas. O objetivo deste ensaio clínico é explorar a segurança e a eficácia dos exossomos derivados de AD-MSCs alogênicas no tratamento de demência leve a moderada devido à Doença de Alzheimer. O estudo teve início em julho de 2020 e tem previsão de término em abril de 2022. Atualmente o estudo ainda está no status de recrutamento de acordo com o ClinicalTrials.gov (RUIJIN HOSPITAL, 2020b). Embora ainda esteja na fase inicial, o estudo representa mais uma vertente que se abre para a aplicação terapêutica dos exossomos, trazendo esperança para doenças que, até então, não têm tratamento efetivo, como a própria doença de Alzheimer.

3 ESTUDOS CLÍNICOS E CONSIDERAÇÕES

As MSCs e seus exossomos apresentam a capacidade de estimular a restauração da homeostase tecidual e permitem que as células dentro do tecido se recuperem, reparem e regenerem. Ambos possuem ação Imunomodulatória, angiogênica e anti- inflamatória, com grande potencial regenerativo do tecido lesionado (SQUILLARO; PELUSO; GALDERISI, 2016; YIN; WANG; ZHAO, 2019). Até o momento, descobertas pré-clínicas sobre a aplicação de MSCs e exossomos derivados de MSCs destacam o benefício de usá-los como tratamento em um amplo espectro de doenças e lesões. Existem numerosos estudos que investigam a eficiência das MSCs (terapia celular) e dos exossomos de MSC em testes clínicos. Quanto aos exossomos, eles ainda são encontrados em todos os fluidos biológicos e são secretados por diversos, senão todos os tipos celulares, tornando-se atraentes como alvos de biópsias líquidas, minimamente invasivas com o potencial para diagnóstico de diferentes doenças (KALLURI; LEBLEU, 2020). Embora a maioria dos ensaios clínicos esteja nas fases de recrutamento e ativa, alguns deles foram concluídos e seus resultados são aguardados com grande expectativa pela comunidade médico-científica.

Ainda assim, um dos desafios que permanece é desvendar os mecanismos exatos de ação *in vivo* por trás das terapias com MSCs ou exossomos derivados de MSCs, como também sua biodistribuição, farmacocinética e farmacodinâmica (OH; CHOO, 2011; YIN; WANG; ZHAO, 2019). Outro desafio tão importante quanto é definir padrões e diretrizes quanto à pureza do produto administrado, dose ideal administrada, níveis de contaminação aceitáveis, controle de qualidade dos MSCs/exossomos isolados, armazenamento e preservação do produto, entre outros. A partir de novos dados adquiridos de estudos com foco nesses desafios, será possível desenvolver soluções médicas mais estratégicas (NIKFARJAM et al., 2020). Diante das potencialidades dos exossomos e das vantagens como armazenamento e segurança, do ponto de vista mutagênico, a implementação de bioprocessos voltados à produção dos exossomos é mais interessante para aplicação clínica do que as MSCs. Por isso, vamos abordar essa questão mais a fundo a seguir.

BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE EXOSSOMOS DERIVADOS DE MSCS

1 BIOPROCESSOS

Uma das vertentes dentro da área da biotecnologia é o foco na produção em escala industrial, representada pelos bioprocessos, voltados a produzir moléculas e bioprodutos sintetizados por microrganismos e células animais, humanas e vegetais a um preço economicamente viável. Essa área engloba diversos conhecimentos distintos de diferentes áreas, sendo elas: física, química, bioquímica, biologia, engenharia, programação, entre outros (THOMS, 2021).

O desenvolvimento de um novo bioproduto é classificado em 3 fases de processos: *upstream*, *harvest* (coleta do bioproduto) e *downstream*. Cada fase é caracterizada por suas respectivas operações unitárias (etapas individuais dos processos) (THOMS, 2021). A fase de *upstream* corresponde à preparação das matérias-primas, à cultura celular ou microbiológica em biorreator e à fabricação do produto de interesse. Já a fase de *harvest* corresponde ao processo de coleta do produto. E, por fim, a fase de *downstream* caracteriza-se por processos de purificação e processamento do produto, controle de qualidade e envase (LNBR, 2021; THOMS, 2021).

Atualmente a produção de exossomos é realizada em escala laboratorial (nível bancada), com a finalidade de desenvolver pesquisas que sirvam como embasamento para aplicação futura do produto em questão. Nesse contexto, a produção de exossomos derivados de MSCs se baseia no cultivo e proliferação dessas células em garrafas ou placas específicas para o cultivo de células aderentes, durante o qual pode ser adicionado ao meio de cultura o soro fetal bovino (opcional), como um suplemento para otimizar o crescimento celular. Essas culturas são mantidas por um determinado número de horas ou dias, enquanto secretam exossomos. O meio de cultura, agora condicionado às MSCs, é coletado, decantado e processado. Na etapa de processamento, o produto intermediário passa por fases de isolamento, concentração, caracterização e purificação até a obtenção do produto final, ou seja, os exossomos purificados (WHITFORD; GUTERSTAM, 2019).

Com o intuito de desenvolver uma plataforma economicamente viável para a produção em larga escala de exossomos, é essencial compreender as principais estratégias de processos, aplicados e em desenvolvimento, associados às Boas Práticas de Fabricação (BPF) nas fases de *upstream* e *downstream* para elaboração de um bioprocessos escalonável.

1.1 PROCESSOS UPSTREAM

A fase de *upstream* envolve todas as etapas que antecedem a produção do material de interesse,

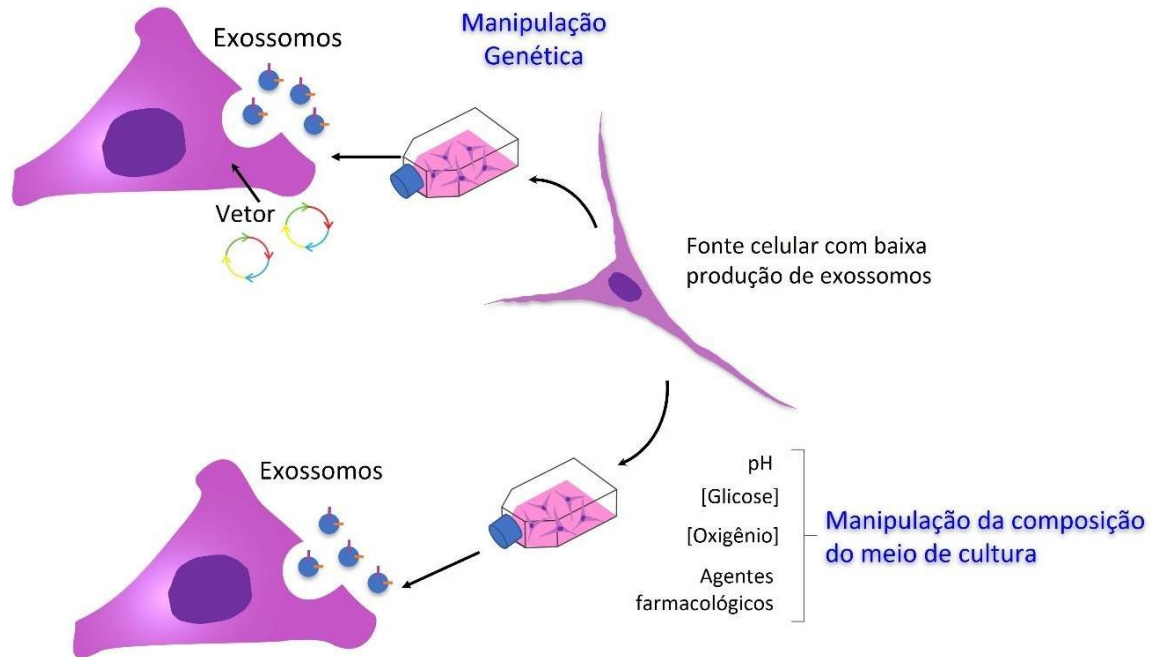
até mesmo a própria produção (síntese e liberação dos exossomos no meio de cultura), englobando desde o preparo de matéria-prima e esterilização até a produção efetiva do produto. No caso da produção de exossomos, são necessários processos que aumentem as capacidades de produção das vesículas como também de cultivo das MSCs, além de definir a melhor plataforma de produção para os exossomos. A seguir, serão abordadas as principais estratégias aplicadas para superar os desafios dessa fase.

1.1.1 Estratégias para aumentar a produção de exossomos

A primeira etapa para escalar a produção de exossomos é o aumento na taxa de produção dessas vesículas pela célula cultivada. Alguns estudos têm mostrado que o meio condicionado pelas MSCs apresenta baixa taxa de exossomos, o que dificulta o escalonamento da produção. Buscando alternativas para intensificar a produção, novas propostas têm surgido. A primeira consiste na manipulação genética de rotas metabólicas. A partir dela é possível gerar biofábricas (células geneticamente modificadas) direcionadas à produção de uma molécula de interesse, tornando os microrganismos/células eficientes e capazes de apenas se desenvolver em um ambiente projetado, específico e controlado (THOMS, 2021). A manipulação genética, através da superexpressão ou sub-expressão induzida de genes-chave, por exemplo, pode induzir a alteração de diferentes processos celulares, o que pode resultar na intensificação de processos de biogênese, vias de reciclagem, ou até mesmo vias de secreção dos exossomos (Figura 13) (JAFARI et al., 2020). Tudo isso contribuindo para melhorar a fabricação do produto de interesse diretamente a partir da manipulação celular. Uma das estratégias estudadas nesse contexto é a manipulação genética do gene MYC em células-tronco mesenquimais, imortalizando a linhagem celular, o que mantém o desenvolvimento da cultura celular e a produção contínua de exossomos (CHEN et al., 2011).

A segunda estratégia, que também pode contribuir para aumentar a produção, corresponde à manipulação de diferentes estímulos ambientais, sejam os níveis de oxigênio e pH, ou a própria composição do meio de cultura. Essas variáveis, quando controladas e manipuladas, podem promover o aumento da produção dos exossomos (Figura 13) (JAFARI et al., 2020).

Figura 13: Técnicas para intensificar a produção de exossomos



Fonte: Próprio autor. **Ilustração:** Flávia Luísa Dias-Audibert.

Outro ponto importante é a definição do meio de cultura a ser utilizado. Atualmente dois meios estão sendo discutidos pelos pesquisadores, visando o escalonamento da produção de exossomos. O meio tradicionalmente utilizado é, em geral, enriquecido com soro fetal bovino – FBS (do inglês, *fetal bovine serum*), um aditivo rico em fatores de crescimento capazes de melhorar o cultivo celular. Porém, o FBS contém grande quantidade de exossomos endógenos, os quais devem ser removidos antes de seu acréscimo à cultura celular (SHELKE et al., 2014). Caso não sejam eliminados, essas “impurezas” podem estar presentes no produto final, dificultando a aplicação de processos de purificação que isolem apenas exossomos produzidos pelas células de interesse. Por essa razão, estão sendo adotados meios de cultura sem FBS (*xeno-free*), desde que conservem as características celulares e exossomais desejáveis para aplicação terapêutica (COLAO et al., 2018). Alguns testes vêm sendo realizados em relação ao efeito desses dois meios de cultivo na produção de exossomos por linhagens celulares. Analisando linhagens de neuroblastoma, observou-se que a produção de exossomos se mantém inalterada em ambos os meios em termos de características biofísicas e tamanho (LI et al., 2015). Porém, através de análises proteômicas, verificou-se que os exossomos derivados do meio *xeno-free* podem apresentar diferenças de alguns componentes em comparação com aqueles provenientes do cultivo com FBS (LI et al., 2015). Torna-se, portanto, necessário que novos estudos sejam realizados para encontrar as condições ideais de produção de exossomos, considerando a manipulação metabólica das células de origem, parâmetros de cultivo e componentes do meio.

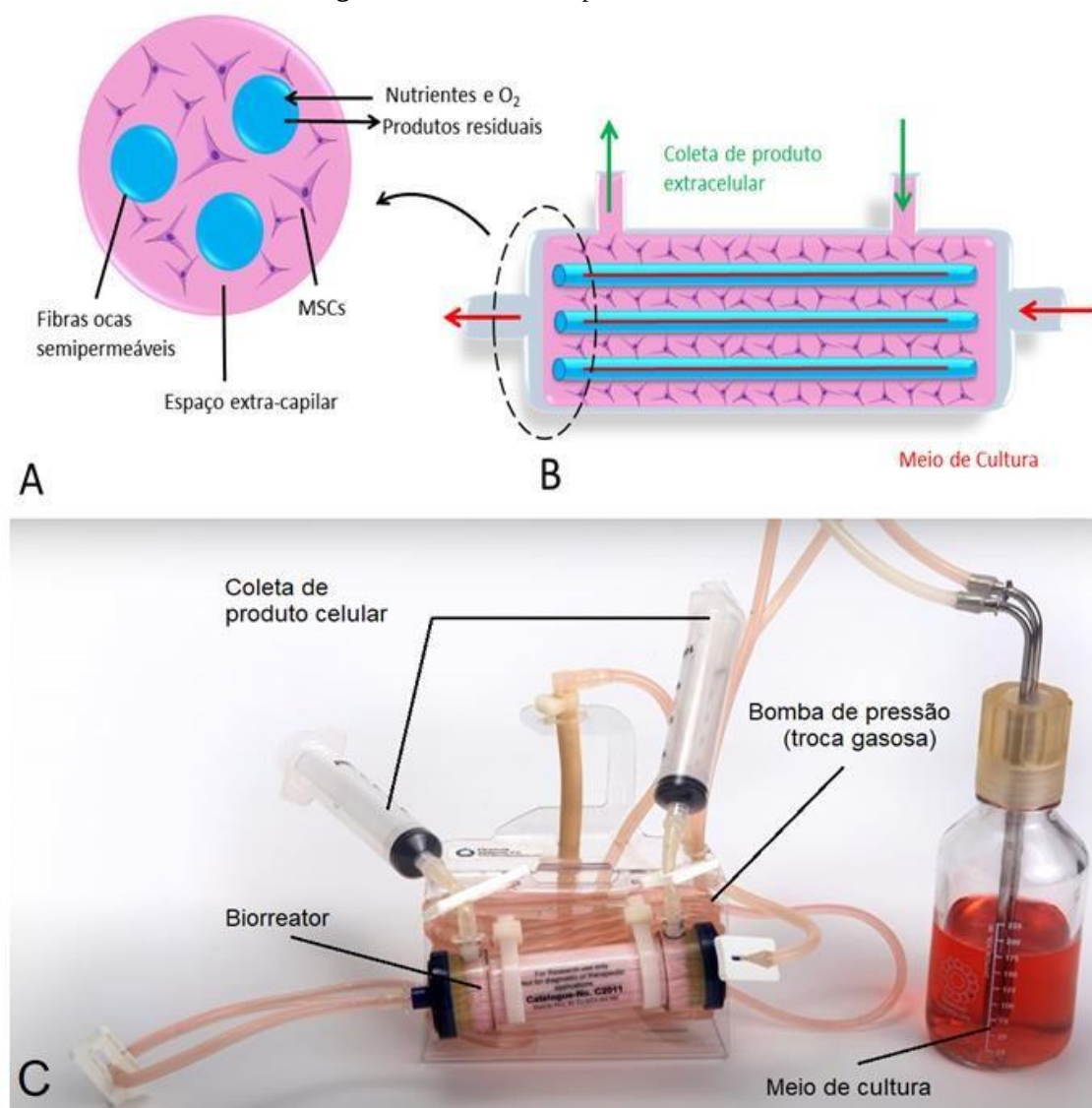
1.1.2 Estratégias de produção em larga escala de exossomos

As estratégias atuais de cultivo celular dependem da característica plástica aderente das MSCs, sendo assim, prioriza-se o desenvolvimento de plataformas que maximizem a área de superfície de cultura, podendo elas serem sistemas estáticos ou dinâmicos. O sistema estático corresponde à proliferação de MSCs em frascos do tipo T225, de superfície plana, enquanto o sistema dinâmico corresponde ao uso de biorreatores (COLAO et al., 2018). Neste tópico serão abordados alguns dos biorreatores promissores focados na produção de exossomos derivados de MSCs, sendo eles: biorreator de perfusão de fibra oca e biorreatores agitados com microtransportadores (CHEN et al., 2020b; WHITFORD; GUTERSTAM, 2019). Vale ressaltar, que independentemente da estratégia escolhida é necessário controlar a proliferação celular e os parâmetros de produção, de forma que as características fenotípicas e a produção de exossomos se mantenham constantes durante o processo de produção em larga escala.

O biorreator de perfusão de fibra oca (do inglês, *hollow fiber bioreactor*) é um sistema de cultura celular tridimensional de perfusão contínua (Figura 14). Esse biorreator consiste em um cartucho contendo milhares de fibras ocas semipermeáveis dentro de um equipamento tubular com válvulas de entrada e saída. As fibras são dispostas em paralelo no equipamento e seladas em cada extremidade do cartucho para que o líquido inserido em uma extremidade flua necessariamente no interior das fibras. As células geralmente são cultivadas no espaço entre o envoltório do equipamento e as fibras (espaço extra-capilar); o meio de cultivo circula dentro das fibras ocas, sendo que as paredes semipermeáveis das fibras permitem a passagem de nutrientes, gases e produtos residuais, com consequente troca entre o meio e as células. Após a circulação do meio pelo cartucho, a bomba de troca gasosa induz sua oxigenação, e em seguida o meio oxigenado entra em circulação novamente (FIBER CELL SYSTEMS, 2018; GERLACH et al., 2012).

Esse sistema de cultivo amplia a área superficial de adesão celular suportando grande número de células. Em um estudo de caso de produção contínua de exossomos derivados de HEK-293 em biorreator de fibra oca por 4 meses, com 3 coletas semanais de 20 mL cada, observou-se produção equivalente à obtida por 70 frascos T225. Sendo assim, o biorreator fornece um sistema otimizado para a produção de exossomos, comparado ao sistema estático utilizado a nível de bancada (WHITFORD; GUTERSTAM, 2019). Outro benefício dessa estratégia é a aplicação de FBS sem que haja contaminação do produto desejado por exossomos do soro. A fibra permite a passagem de fatores e nutrientes séricos que promovem o crescimento celular, porém retém os exossomos endógenos do soro no interior das fibras, evitando possível contaminação e processos de purificação mais elaborados (FIBER CELL SYSTEMS, 2018; WHITFORD; GUTERSTAM, 2019).

Figura 14: Biorreator de perfusão de fibra oca

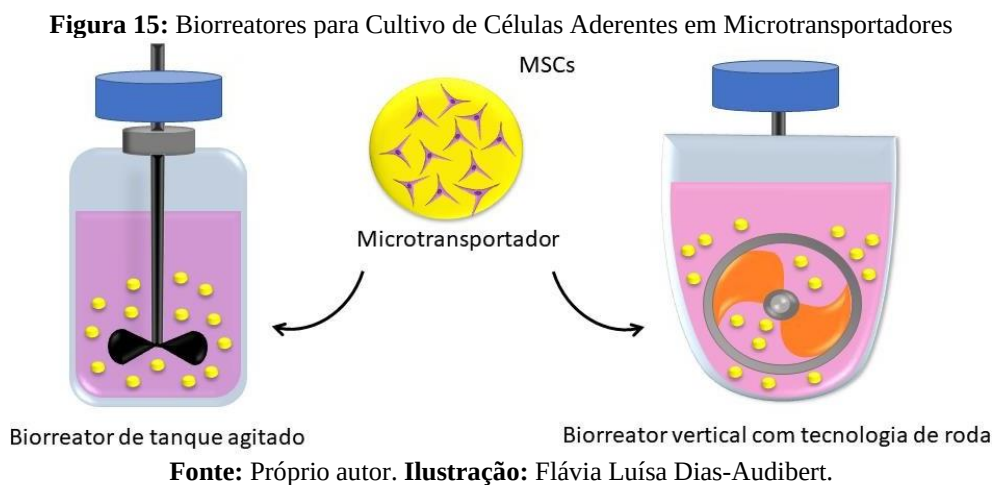


Biorreator de perfusão de fibra oca. A: visão do corte transversal do biorreator; B: visão do corte longitudinal do biorreator; C: imagem ilustrativa modificada de *FiberCell System*¹, com detalhes do biorreator e seus componentes. **Fonte:** Compilação do próprio autor¹. **Ilustração A e B:** Flávia LuísaDias-Audibert.

Além do biorreator de fibra oca, outra estratégia para cultivo de MSCs baseia-se em biorreatores com microtransportadores (do inglês, *Microcarriers*), os quais consistem em esferas de 100 – 300 microns usados como suporte para cultura de células aderentes em suspensão. Essas esferas podem ser produzidas a partir de polímeros sintéticos ou naturais e funcionam da seguinte forma: as células são imobilizadas em sua superfície e cultivadas em suspensão no meio de cultura sob agitação em biorreatores (CHEN et al., 2020a). Existem duas opções de biorreatores para esse tipo de cultivo celular, o biorreator de tanque agitado e o biorreator vertical com tecnologia de roda. O primeiro, de tanque agitado, representa um sistema dinâmico comumente utilizado para expansão escalonável de células-tronco mesenquimais; é capaz de promover homogeneização do meio de cultivo e das células aderidas aos microtransportadores por meio da agitação aplicada (Figura 15). Porém, devido a sua configuração, podem ocorrer altas taxas de cisalhamento

¹ Montagem a partir da imagem coletada no canal da empresa Fiber Cell System In. via youtube.com. Disponível em: < <https://www.youtube.com/watch?v=pi7LFH8m4XE>>. Acesso em: 10 maio. 2021.

prejudiciais, o que dificulta o crescimento celular e gera impactos negativos na fisiologia celular (DE ALMEIDA FUZETA et al., 2020; PINTO et al., 2019).



Visando minimizar os problemas advindos do uso de biorreatores de tanque agitado, novos sistemas estão sendo desenvolvidos, dentre eles o biorreator vertical com tecnologia de roda (do inglês, *Vertical-Wheel bioreactor*) (Figura 15). Neste sistema, uma roda é disposta verticalmente no biorreator, a qual promove fluxos radial e axial, resultando em um fluxo final do meio de cultivo mais homogêneo com mínimos efeitos de cisalhamento, quando comparado ao biorreator de tanque agitado. Além do menor impacto sobre as células, a possibilidade de escalonar a produção para volumes industriais (100 mL – 500 L) representa um dos principais benefícios deste tipo de biorreator (DE ALMEIDA FUZETA et al., 2020).

Recentemente, esse mesmo sistema de biorreator vertical com tecnologia de roda foi aplicado com sucesso para avaliar a proliferação de MSCs em estudo desenvolvido por De Souza Pinto, em 2019. O objetivo do estudo foi estabelecer um sistema de cultura de baixo custo para a produção de UC-MSCs e AD-MSCs utilizando o biorreator vertical de 100 mL durante 7 dias. Observou-se um aumento da expansão celular de 13 e 5.3 vezes, respectivamente (PINTO et al., 2019). Além deste, outro estudo realizado pelos mesmos autores avaliou a produção de EVs por MSCs utilizando o mesmo sistema de biorreator (100 mL) comparado ao sistema estático (frasco T225). A proliferação celular no biorreator apresentou um aumento de 5.7 ± 0.9 vezes na concentração de EVs no meio condicionado e 3.0 ± 0.5 vezes na produtividade das EVs, o que significa maior concentração celular no biorreator e maior secreção EVs por cada célula. De acordo com os autores, essa produção pode ser escalonada para sistemas de 3 L até 500 L (DE ALMEIDA FUZETA et al., 2020). Diante dos resultados observados, os dois sistemas de biorreatores, tanto de fibra oca quanto vertical com tecnologia de roda intensificam a produção, o primeiro para produção a nível de bancada, e o segundo para nível industrial. Sendo assim, representam estratégias interessantes disponíveis para escalonamento da produção e, no futuro, disponibilização de exossomos para aplicação clínica.

1.1.3 Processos *Downstream*

A fase de *downstream* envolve todas as etapas que sucedem a fabricação do produto de interesse. Os processos envolvidos correspondem à recuperação, purificação, caracterização e formulação. No caso da produção de exossomos, são necessários processos eficientes de purificação e de caracterização para se obter um produto de qualidade, com as devidas BPF (COLAO et al., 2018). A seguir, serão abordadas as principais estratégias aplicadas para superar os desafios dessa fase.

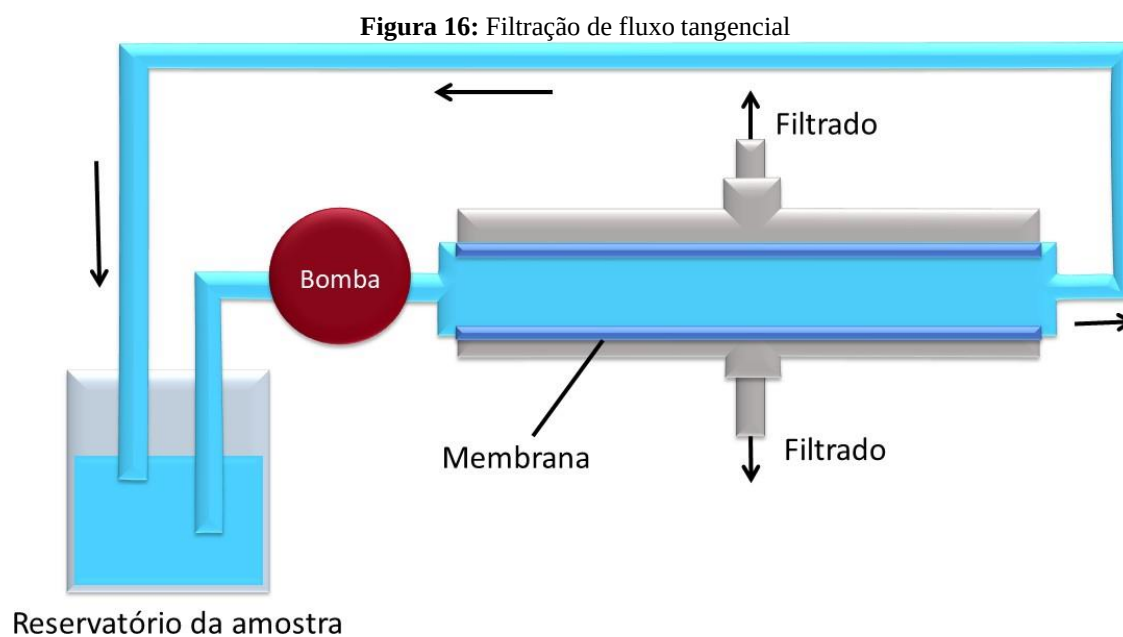
1.1.4 Processos de purificação de exossomos

Conforme citado no capítulo “Exossomos”, os processos de isolamento de exossomos mais utilizados são: ultracentrifugação, cromatografia por exclusão de tamanho, captura por imunoafinidade e precipitação baseada em polímero. Dentre estas, a ultracentrifugação é a metodologia mais utilizada, porém apresenta baixo rendimento e baixa taxa de recuperação, quando aplicada em larga escala. Além de não ser economicamente viável, a ultracentrifugação apresenta elevadas forças de cisalhamento que podem ocasionar o rompimento dos exossomos e, consequentemente, a liberação do seu conteúdo interno, dificultando a sua implementação na fabricação de exossomos em larga escala (CHEN et al., 2020b; JAFARI et al., 2020; WHITFORD; GUTERSTAM, 2019). Diferentemente da ultracentrifugação, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por exclusão de tamanho é outro método de isolamento de exossomos, o qual é baseado no tamanho das vesículas. Nesse método, os exossomos não são submetidos a forças de cisalhamento, e é possível recuperar mais vesículas com tamanho uniforme. Sendo assim, a CLAE também pode ser utilizada para purificar e separar os exossomos (JAFARI et al., 2020; PASHOUTAN SARVAR; SHAMSASENJAN; AKBARZADEHLALEH, 2016).

Outra abordagem para isolamento de exossomos é a precipitação baseada em polímero, a qual tem por princípio a alteração de características físico-químicas, como solubilidade dos compostos biológicos, quando na presença de determinados polímeros (por exemplo, o polietilenoglicol - PEG). Para este método podem ser utilizados diversos kits comerciais, entretanto esses kits apresentam distintas taxas de recuperação, além da necessidade de um processo adicional de purificação, a fim de remover tanto os reagentes utilizados quanto nucleoproteínas e proteínas que podem precipitar juntamente com os exossomos (JAFARI et al., 2020; WHITFORD; GUTERSTAM, 2019). Para aprimorar as técnicas de isolamento, novas alternativas têm surgido recentemente, dentre elas a captura por imunoafinidade, sendo a tetraspanina a proteína de superfície exossomal mais utilizada como alvo para purificação. Com o intuito de otimizar esse método e escalonar a produção, é recomendado o uso de múltiplos alvos, o que abre espaço para que novos estudos sejam realizados na identificação desses antígenos (JAFARI et al., 2020).

Atualmente uma nova metodologia está sendo estudada e aplicada para purificação e concentração de exossomos, a filtração de fluxo tangencial (TGF, do inglês, *Tangential flow filtration*). A TGF é um tipo de ultrafiltração que utiliza membranas com poros de tamanhos de 0.001 - 0.1 μm , capazes de separar biomoléculas (SCHWARTZ; SEELEY, 2014). O tamanho dos poros é predefinido pelo peso molecular

limitante da membrana (MWCO, do inglês, *Membrane Molecular Weight Cutoff*), o qual refere-se à capacidade de reter 90% do soluto. Para reter o soluto, no caso os exossomos, recomenda-se o uso de uma membrana com MWCO de 3-6 vezes menor do que o peso molecular dos exossomos. Nesse método, a solução rica em exossomos é bombeada a partir do reservatório através de um canal de alimentação, em que as paredes são compostas por membranas de filtração. Nesse mesmo canal, uma parte da solução atravessa a membrana (filtrado), enquanto o restante é recirculado e retorna ao reservatório (Figura 16). O fluxo aplicado sobre a amostra evita a formação de agregados na superfície da membrana, o que evita a obstrução dos poros e permite que um maior volume de produto seja processado no menor tempo possível. No caso da purificação de exossomos, o filtrado é descartado, enquanto que essas vesículas ficam retidas na membrana filtrante (SCHWARTZ; SEELEY, 2014). Em comparação com a ultracentrifugação, esse tipo de filtração exibe exossomos com maior potência imunomodulatória, semelhante à das células parentais, além de uma maior concentração de citocinas, DNA, RNA, proteínas e lipídios (CHEN et al., 2020b).



Fonte: Próprio autor. Ilustração: Flávia Luísa Dias-Audibert.

Além de propostas para produção de exossomos baseada em cultura bidimensional, novas abordagens têm sido testadas, como a cultura tridimensional (3D). Algumas pesquisas têm apresentado uma estratégia de produção de exossomos derivados de MSCs com BPF, combinando a cultura celular 3D com microtransportadores em biorreatores e filtração de fluxo tangencial como método de concentração e purificação dos exossomos produzidos (HARASZTI et al., 2018). Comparando-se a metodologia convencional de produção de exossomos (cultura celular 2D e ultracentrifugação) e sua funcionalidade com a metodologia proposta pela pesquisa, observa-se que a partir da cultura 3D e purificação por filtração, pode-se alcançar um aumento de 140 vezes na produção de exossomos, comparado à produção obtida de cultura 2D e ultracentrifugação (HARASZTI et al., 2018). Além disso, os exossomos purificados podem

apresentar atividade terapêutica 7 vezes maior em relação à transferência de siRNAs para células testadas. Assim, o método relatado tem potencial para elevar o rendimento dos exossomos produzidos e purificados, e pode facilitar sua exploração pré-clínica já com BPF.

Os métodos atuais para purificar exossomos são promissores, mas resultados na literatura ainda variam com relação a qual protocolo é o mais eficiente. Diante deste cenário, as abordagens mais promissoras são aquelas que combinam diferentes métodos de purificação e isolamento, com parâmetros distintos (características bioquímicas e biofísicas), mas que se complementam entre si, tornando a etapa *downstream* mais seletiva quanto à discriminação entre as impurezas e os exossomos. Ainda assim, deve-se estimular pesquisas na área, para que seja possível suprir a demanda industrial de tecnologias reproduzíveis, padronizadas e economicamente viáveis.

1.1.5 Processos de caracterização de exossomos

As metodologias atuais mais utilizadas para a caracterização dos exossomos envolvem análises tanto moleculares, quanto de marcadores proteicos e de tamanho (LÖTVALL et al., 2014; PASHOUTAN SARVAR; SHAMSASENJAN;

AKBARZADEHLEH, 2016). Dentre as análises moleculares utilizadas pode-se citar: qRT-PCR, espectrometria de massas, microscopia de fluorescência, entre outros.

Quanto às análises de marcadores proteicos, sendo eles proteínas presentes no conteúdo interno ou transmembranas, são utilizados *Western blotting*, citometria de fluxo, espectrometria de massas, ELISA, entre outros. Métodos como microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica também são utilizados em análise da caracterização do tamanho dos exossomos (ASHCROFT et al., 2012; HE et al., 2014; LÖTVALL et al., 2014; SOKOLOVA et al., 2011). Atualmente esses métodos são utilizados para a caracterização inicial do produto a nível de bancada. Após a caracterização completa dos exossomos, tal processo pode ser escalonado e, conseqüentemente, a caracterização do produto final pode ser realizada por protocolos mais simplificados.

Após o isolamento e caracterização dos exossomos, o produto deve ser armazenado e refrigerado, de forma a manter a viabilidade e funcionalidade dos mesmos (KONALA et al., 2016). Algumas análises de estabilidade dos exossomos vêm sendo realizadas, principalmente quanto à temperatura de armazenamento. Quando armazenados à temperatura de -20°C, observam-se exossomos estáveis por 6 meses, enquanto que aqueles armazenados a 4°C e 37°C apresentam-se instáveis, com diminuição de tamanho, degradação e mudanças estruturais (SOKOLOVA et al., 2011). Sendo assim, a caracterização por meio de marcadores e a avaliação de estabilidade anteriores ao escalonamento da produção são essenciais para garantir a funcionalidade do produto, principalmente quando se propõe aplicação clínica no futuro.

2 DESAFIOS DO ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE EXOSSOMOS

Os exossomos são promissores candidatos a terapias para diversas doenças e lesões com vários estudos pré-clínicos demonstrando efeitos, além de diferentes estudos clínicos iniciais sendo realizados atualmente. Diversas empresas e startups estão investindo e estudando os exossomos, impulsionando novas tecnologias de produção, caracterização e purificação (COLAO et al., 2018; JAFARI et al., 2020). Como intuito de criar novas soluções clinicamente viáveis e acessíveis, os processos de uma produção em larga escala devem seguir as Boas Práticas de Fabricação, sendo esse o primeiro desafio a ser superado (COLAO et al., 2018; JAFARI et al., 2020). Atualmente não existem metodologias consideradas padrão-ouro dentro do bioprocessamento de exossomos, tanto em relação aos processos em si (produção, caracterização e purificação) quanto à melhor combinação de processos para se obter exossomos funcionais, altamente puros, escalonáveis e acessíveis ao mercado, o que se torna um desafio a ser superado (WHITFORD; GUTERSTAM, 2019).

Conforme descrito no Capítulo “Exossomos”, heterogeneidade é outro obstáculo a ser superado quanto à produção de exossomos, tanto em pequena quanto em larga escala. Além disso, a possível contaminação viral dos exossomos também representa um desafio, pois em culturas celulares derivadas de células de mamíferos, existe o risco de co-isolamento de vírus endógenos. Porém, nesses casos, são realizadas triagens das células utilizadas para que apresentem baixíssimo ou inexistente material genético viral (COLAO et al., 2018; MCNAMARA; DITTMER, 2020). No caso de produtos baseados em exossomos derivados de MSCs alogênicas, os processos de concentração também podem levar ao acúmulo da carga viral e consequentemente aumentar o potencial risco de contaminação. Caso esse cenário ocorra, o maior desafio é o desenvolvimento de uma metodologia viável para purificar os exossomos e eliminar partículas virais, o que ainda não está disponível. Devido à semelhança das características físicas (tamanho) e bioquímicas dos vírus (presença de marcadores de superfície), alguns processos para sua eliminação podem levar a danos aos exossomos, como inativação química ou ultravioleta (COLAO et al., 2018; MCNAMARA; DITTMER, 2020). Portanto, a contaminação do produto por vírus endógenos é um ponto importante de atenção na fabricação de exossomos, sendo necessários estudos futuros para o desenvolvimento de métodos eficientes para garantir maior segurança para o produto final.

Atualmente as tecnologias de biorreatores utilizadas comercialmente são projetadas para produção de anticorpos ou proteínas recombinantes a partir de células adaptadas em suspensão (COLAO et al., 2018). Para a produção de exossomos, essas tecnologias devem ser adaptadas, ou seja, ainda não há tecnologias especificamente voltadas a produção de exossomos derivados de células aderentes em escala industrial. (WHITFORD; GUTERSTAM, 2019). O processamento *upstream* precisa incluir cultura de células aderentes com alta secreção de exossomos e que seja escalonável (COLAO et al., 2018). Por isso, diversas plataformas e modos de produção distintos devem ser avaliados, já que podem oferecer vantagens e desvantagens para a produção de exossomos com diferentes finalidades. Equipamentos e consumíveis adequados para a fabricação de exossomos sob BPF estão disponíveis, mas em grande parte esses produtos

foram desenvolvidos para outros fins (WHITFORD; GUTERSTAM, 2019). Portanto, são necessários novos estudos de aplicabilidade e comfoco em escalonamento de produção, de forma a otimizar a resposta e atender às demandas específicas de exossomos. Considerando que a terapia com exossomos representa uma terapia alternativa livre de células, essa característica que já viabiliza a sua aplicação clínica comparado às terapias celulares, mas ainda assim é necessário a obtenção de sua aprovação regulatória (COLAO et al., 2018).

3 PRODUÇÃO DE EXOSSOMOS NO MERCADO INTERNACIONAL E NACIONAL

Atualmente existem diversas empresas que estão trabalhando no desenvolvimento de metodologias e na produção de MSCs ou exossomos, transformando-os em produtos. As 4 maiores empresas que utilizam exossomos comercialmente são: Codiak Biosciences, Exosome Diagnostic, Evox Therapeutics e ExoCoBio. A Codiak utiliza exossomos engenheirados aplicados ao câncer, enquanto a Exosome Diagnostic realiza o diagnóstico molecular a partir de exossomos coletados de amostras biológicas como sangue e urina. Já a Evox Therapeutics utiliza os exossomos como carreadores moleculares, e a ExoCoBio produz biofarmacêuticos baseados em exossomos para a regeneração de pele e tecido. No Brasil, temos a InSitu, uma *startup* que produz biocurativos para feridas crônicas e queimaduras graves através da técnica de bioimpressão 3D utilizando MSCs. Atualmente estão estudando a possibilidade de produzir um produto à base de exossomos obtidos do meio condicionado das MSCs. Mesmo diante de empresas empenhadas no desenvolvimento de metodologias e na própria produção de exossomos ou células para aplicação terapêutica, os desafios são os mesmos para todas elas, o que reforça a necessidade de constante dedicação ao aprimoramento dos processos produtivos para garantir a reprodutibilidade e a qualidade do produto final.

CONCLUSÃO

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes capazes de autorrenovação e diferenciação em diferentes tecidos. Possuem características particulares quando comparadas às demais células tronco, como invisibilidade imunológica e capacidade imunomodulatória. Contribuem ainda para a regeneração tecidual principalmente através de sua ação parácrina (liberação de vesículas extracelulares), na qual os exossomos são as vesículas que participam mais significativamente. Estes, por sua vez, têm sido intensamente avaliados quanto à potencial aplicabilidade, devido às características terapêuticas semelhantes às suas células de origem. Atualmente, tanto a terapia celular com MSCs quanto a terapia *cell-free*, com exossomos derivados das MSCs, vêm sendo estudadas para diversas aplicações clínicas, sendo que numerosas pesquisas investigam a eficiência terapêutica de ambas as estratégias em testes clínicos, alguns com resultados bastante promissores.

Existe grande expectativa pela comunidade médico-científica frente a aplicação clínica e mercadológica das terapias à base de MSCs e de produtos utilizando exossomos. Diversas empresas e *startups* estão investindo, particularmente, na potencialidade dos exossomos, impulsionando novas tecnologias de produção, caracterização e purificação, com o intuito de criar soluções clinicamente viáveis e acessíveis. No entanto, ainda há obstáculos e perguntas a serem respondidas quanto aos mecanismos exatos de ação *in vivo* por trás da terapia celular e *cell-free* derivados de MSCs, como também sua biodistribuição, farmacocinética e farmacodinâmica. São necessários também novos estudos clínicos para definir protocolos terapêuticos mais adequados, a depender da doença/lesão do paciente, juntamente com estudos com foco em escalonamento de produção com Boas Práticas de Fabricação, tornando essas novas terapias e produtos disponíveis no mercado, mas principalmente acessíveis à população.

O bioprocesso de um produto biológico, como aqueles os envolvidos na produção de exossomos e MSCs, demanda por profissionais de diferentes áreas devido ao viés interdisciplinar da proposta terapêutica, que envolve desde o conhecimento biológico básico, passando pela produção até a estratégia para aplicação clínica. Diante deste cenário, é crucial que as instituições de ensino (faculdades e universidades) e institutos de pesquisa devam seguir investindo na formação de recursos humanos altamente capacitados para garantir ao país alta competitividade, independência científica e tecnológica nas áreas de biotecnologia e correlatas, que são estratégicas para o desenvolvimento e crescimento de qualquer nação.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 15 fev. 2005.
- ANDERSON, M. D. *iExosomes in Treating Participants With Metastatic Pancreas Cancer With KrasG12D Mutation*. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03608631?term=NCT03608631&draw=2&rank=1>>. Acesso em: 24 abr. 2021.
- ANDRADE, C. A. P. DA S. E S. DE. *AS CÉLULAS IPS E O SEU USO NA CONSTRUÇÃO DE MODELOS CELULARES DE DOENÇAS HUMANAS*. [s.l.] INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ, 2015.
- ASHCROFT, B. A. et al. Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic force microscopy and microfluidics. *Biomedical Microdevices*, v. 14, n. 4, p. 641–649, 6 ago. 2012.
- BAGNO, L. et al. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges. *Molecular Therapy*, v. 26, n. 7, p. 1610–1623, 5 jul. 2018.
- BAKER, C. L.; PERA, M. F. Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, v. 22, n. 1, p. 25–34, 4 jan. 2018.
- BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, n. 4, p. 568–584, abr. 2004.
- BETZER, O. et al. In Vivo Neuroimaging of Exosomes Using Gold Nanoparticles. *ACS Nano*, v. 11, n. 11, p. 10883–10893, 28 nov. 2017.
- BIEBACK, K. Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells*, v. 22, n. 4, p. 625–634, 1 jul. 2004.
- BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science*, v. 344, n. 6189, p. 1242281–1242281, 13 jun. 2014.
- BOHELER, K. R. et al. Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes. *Circulation Research*, v. 91, n. 3, p. 189–201, 9 ago. 2002.
- BONAFEDE, R. et al. Exosome derived from murine adipose-derived stromal cells: Neuroprotective effect on in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Cell Research*, v. 340, n. 1, p. 150–158, 1 jan. 2016.
- BÖRGER, V. et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 7, p. 1450, 6 jul. 2017.
- CANTINIEAUX, D. et al. Conditioned Medium from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Rats: An Original Strategy to Avoid Cell Transplantation. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. e69515, 27 ago. 2013.
- CAPLAN, A. I. All MSCs Are Pericytes? *Cell Stem Cell*, v. 3, n. 3, p. 229–230, 11 set. 2008.

- CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. In: *Principles of Regenerative Medicine*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 219–227.
- CCB. *Célula-tronco Mesenquimal (CTM) :: CCB*. Disponível em: <<https://ccb.med.br/texto/celula-tronco-mesenquimal>>. Acesso em: 2 abr. 2021.
- CHEN, T. et al. Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *Journal of Translational Medicine*, v. 9, n. 1, p. 47, 25 abr. 2011.
- CHEN, X. Y. et al. *Recent advances in the use of microcarriers for cell cultures and their ex vivo and in vivo applications* Biotechnology Letters Springer, , 10 jan. 2020a. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-019-02738-7>>. Acesso em: 10 maio. 2021
- CHEN, Y. S. et al. *Exosomes in clinical trial and their production in compliance with good manufacturing practice* Tzu Chi Medical Journal Wolters Kluwer Medknow Publications, , 1abr. 2020b. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7137364/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32137364/)>. Acesso em: 7 maio. 2021
- COLAO, I. L. et al. Manufacturing Exosomes: A Promising Therapeutic Platform. *Trends in Molecular Medicine*, v. 24, n. 3, p. 242–256, 1 mar. 2018.
- DAHBOUR, S. et al. Mesenchymal stem cells and conditioned media in the treatment of multiple sclerosis patients: Clinical, ophthalmological and radiological assessments of safety and efficacy. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 23, n. 11, p. 866–874, 1 nov. 2017.
- DE ALMEIDA FUZETA, M. et al. Scalable Production of Human Mesenchymal Stromal Cell- Derived Extracellular Vesicles Under Serum-/Xeno-Free Conditions in a Microcarrier-Based Bioreactor Culture System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, 3 nov. 2020.
- DJOUAD, F. et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *STEM CELLS*, v. 25, n. 8, p. 2025–2032, ago. 2007.
- 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. 315–317, 2006.
- FÉVRIER, B.; RAPOSO, G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 16, n. 4, p. 415–421, 1 ago. 2004.
- FIBER CELL SYSTEMS. *The Advantage of Hollow Fiber Bioreactors*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.fibercellsystems.com/wp-content/uploads/2018/10/FiberCell-Systems-The-advantage-of-HFBR.pdf>>. Acesso em: 10 maio. 2021.
- FUOCO, N. L. et al. Efficient isolation and proliferation of human adipose-derived mesenchymal stromal cells in xeno-free conditions. *Molecular Biology Reports*, v. 47, n. 4, p. 2475–2486, 2 abr. 2020.
- GAO, L. R. et al. Intracoronary infusion of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Medicine*, v. 13, n. 1, p. 162, 10 dez. 2015.
- GARA, E. et al. Isolation, Expansion and Application of Human Mesenchymal Stem Cells. In: *Comprehensive Biotechnology*. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 304–319.

- GERLACH, J. C. et al. Adipogenesis of human adipose-derived stem cells within three-dimensional hollow fiber-based bioreactors. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, v. 18, n.1, p. 54–61, 1 jan. 2012.
- GHANNAM, S. et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 1, n. 1, p. 2, 2010.
- GOMZIKOVA, M. O.; RIZVANOV, A. A. Current Trends in Regenerative Medicine: From Cell to Cell-Free Therapy. *BioNanoScience*, v. 7, n. 1, p. 240–245, 18 mar. 2017.
- GRANGE, C. et al. Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 33, n. 5, p. 1055–1063, maio 2014.
- GREENING, D. W. et al. A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods. In: *Methods in Molecular Biology*. [s.l.] Humana Press Inc., 2015. v. 1295p. 179–209.
- HARASZTI, R. A. et al. Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher Yield and Improved Activity. *Molecular Therapy*, v. 26, n. 12, p. 2838–2847, 5 dez. 2018.
- HARE, J. M. Umbilical Cord Tissue (UC) Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Versus Placebo to Treat Acute Pulmonary Inflammation Due to COVID-19. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT04490486>, 2020.
- HE, M. et al. Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. *Lab on a Chip*, v. 14, n. 19, p. 3773, 18 jul. 2014.
- HELDLING, N. et al. Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Human Gene Therapy*, v. 26, n. 8, p. 506–517, 1 ago. 2015.
- HERBERTS, C. A.; KWA, M. S. G.; HERMSEN, H. P. H. Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine*, v. 9, n. 1, p. 29, 22 dez. 2011.
- HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 7, n. 5, p. 393–395, 2005.
- HYENNE, V. et al. RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *Journal of Cell Biology*, v. 211, n. 1, p. 27–37, 12 out. 2015.
- INC., A. A Study to Evaluate the Safety and Efficacy of AC607 for the Treatment of Kidney Injury in Cardiac Surgery Subjects (ACT-AKI). *ClinicalTrials.gov*, 2014.
- INCA. *Câncer de pâncreas*. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas>>. Acesso em: 21 maio. 2021.
- INSTITUTO HOC. *Medula Óssea*. Disponível em: <https://www.institutohoc.com.br/artigo_medula-ossea.html>. Acesso em: 20 fev. 2021.

- IWASAKI, H.; AKASHI, K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene*, v. 26, n. 47, p. 6687–6696, 15 out. 2007.
- JAFARI, D. et al. Improvement, scaling-up, and downstream analysis of exosome production. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 40, n. 8, p. 1098–1112, 16 nov. 2020.
- JANKOWSKI, R. J.; DEASY, B. M.; HUARD, J. Muscle-derived stem cells. *Gene Therapy*, v.9, n. 10, p. 642–647, 21 maio 2002.
- JUNG, J. W. et al. Familial Occurrence of Pulmonary Embolism after Intravenous, Adipose Tissue-Derived Stem Cell Therapy. *Yonsei Medical Journal*, v. 54, n. 5, p. 1293, set. 2013.
- KALLURI, R.; LEBLEU, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, v. 367, n. 6478, p. eaau6977, 7 fev. 2020.
- KAMERKAR, S. et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*, v. 546, n. 7659, p. 498–503, 7 jun. 2017.
- KASSIS, I. et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation*, v. 37, n. 10, p. 967–976, 3 maio 2006.
- KAY, A. G. et al. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Reduces Disease Severity and Immune Responses in Inflammatory Arthritis. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 18019, 21 dez. 2017.
- KEAN, T. J. et al. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem Cells International*, v. 2013, p. 1–13, 2013.
- KERN, S. et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, v. 24, n. 5, p. 1294–1301, maio 2006.
- KICHENBRAND, C. et al. Dental Pulp Stem Cell-Derived Conditioned Medium: An Attractive Alternative for Regenerative Therapy. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 25, n. 1, p. 78–88, 1 fev. 2019.
- KOCHAE, A. et al. Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Stem Cells*, v. 25, n. 5, p. 1270–1278, maio 2007.
- KONALA, V. B. R. 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, 1 jan. 2016.
- KUPCOVA SKALNIKOVA, H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*, v. 95, n. 12, p. 2196–2211, 20 dez. 2013.
- LAI, C. P. et al. Dynamic Biodistribution of Extracellular Vesicles in Vivo Using a Multimodal Imaging Reporter. *ACS Nano*, v. 8, n. 1, p. 483–494, 28 jan. 2014.
- LENNON, D. P.; CAPLAN, A. I. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, v. 34, n. 11, p. 1604–1605, nov. 2006.
- LI, J. et al. Serum-free culture alters the quantity and protein composition of neuroblastoma-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 4, n. 1, p. 26883, 1 jan. 2015.

- LNBR. *Bioprocessos*. Disponível em: <<https://lnbr.cnpem.br/pt-br/diviso-es-de-pesquisa/processos-tecnologicos/bioprocessos/>>. Acesso em: 30 abr. 2021.
- LOS, M. J.; SKUBIS, A.; GHAVAMI, S. Stem Cells. In: *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 5–16.
- LÖTVALL, J. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 3, n. 1, p. 26913, 22 jan. 2014.
- LV, Y. et al. Roles of microRNAs in preeclampsia. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n.2, p. 1052–1061, 1 fev. 2019.
- MAGGINI, J. et al. Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages into a Regulatory-Like Profile. *PLoS ONE*, v. 5, n. 2, p. e9252, 16 fev. 2010.
- MATHIEU, M. et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, v. 21, n. 1, p. 9–17, 2 jan. 2019.
- MAURICE, N. W. *microRNAs Role in Pre-eclampsia Diagnosis*. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03562715?term=NCT03562715&draw=2&rank=1>>. Acesso em: 24 abr. 2021.
- MCDANIEL, J. S. et al. Quantitative Assessment of Optimal Bone Marrow Site for the Isolation of Porcine Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, v. 2017, p. 1–10, 2017.
- MCNAMARA, R. P.; DITTMER, D. P. Modern Techniques for the Isolation of Extracellular Vesicles and Viruses. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 15, n. 3, p. 459–472, 12 set. 2020.
- MENDT, M.; REZVANI, K.; SHPALL, E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplantation*, v. 54, n. S2, p. 789–792, 20 ago. 2019.
- MIZRAHI, O. et al. Nucleus pulposus degeneration alters properties of resident progenitor cells. *The Spine Journal*, v. 13, n. 7, p. 803–814, jul. 2013.
- MIZUNO, H.; HYAKUSOKU, H. Mesengenic Potential and Future Clinical Perspective of Human Processed Lipoaspirate Cells. *Journal of Nippon Medical School*, v. 70, n. 4, p. 300–306, 2003.
- MOTAWI, T. M. K. et al. Role of mesenchymal stem cells exosomes derived microRNAs; miR-136, miR-494 and miR-495 in pre-eclampsia diagnosis and evaluation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 659, p. 13–21, 1 dez. 2018.
- NAKAHARA, H. et al. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*, v. 11, n. 3, p. 181–188, jan. 1990.
- NAKAMURA, Y. et al. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Letters*, v. 589, n. 11, p. 1257–1265, 8 maio 2015.
- NAVY GENERAL HOSPITAL. *Intracoronary Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Transfer in Patients With Acute Myocardial Infarction (AMI)* <<https://clinicaltrials.gov/show/NCT01291329>>, 2011. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01291329>>. Acesso em: 24 abr. 2021

- NIKFARJAM, S. et al. Mesenchymal stem cell derived-exosomes: a modern approach in translational medicine. *Journal of Translational Medicine*, v. 18, n. 1, p. 449, 27 dez. 2020.
- OH, S. K. W.; CHOO, A. B. H. Stem Cells. In: *Comprehensive Biotechnology*. [s.l.] Elsevier, 2011. v. 1p. 341–365.
- OPHELDERS, D. R. M. G. et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Protect the Fetal Brain After Hypoxia-Ischemia. *STEM CELLS Translational Medicine*, v. 5, n. 6, p. 754–763, 9 jun. 2016.
- OREFFO, R. O. C. et al. Human bone marrow osteoprogenitors express estrogen receptor- alpha and bone morphogenetic proteins 2 and 4 mRNA during osteoblastic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 75, n. 3, p. 382–392, 1 dez. 1999.
- ÖZTÜRK, S. et al. Therapeutic Applications of Stem Cells and Extracellular Vesicles in Emergency Care: Futuristic Perspectives. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 17, n. 2, p. 390–410, 24 abr. 2021.
- PASHOUTAN SARVAR, D.; SHAMSASENJAN, K.; AKBARZADEHLALEH, P. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: New Opportunity in Cell-Free Therapy. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 6, n. 3, p. 293–299, 25 set. 2016.
- PATEL, A. N.; BARTLETT, C. E.; ICHIM, T. E. Mesenchymal Stem Cells. In: *Stem Cell and Gene Therapy for Cardiovascular Disease*. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 139–150.
- PATEL, S. A. et al. Mesenchymal Stem Cells Protect Breast Cancer Cells through Regulatory T Cells: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived TGF- β . *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 10, p. 5885–5894, 15 maio 2010.
- PHINNEY, D. G.; PITTINGER, M. F. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *STEM CELLS*, v. 35, n. 4, p. 851–858, 1 abr. 2017.
- PHINNEY, D. G.; SENSEBÉ, L. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy*, v. 15, n. 2, p. 140–145, fev. 2013.
- PINTO, D. et al. Scalable Manufacturing of Human Mesenchymal Stromal Cells in the Vertical-Wheel Bioreactor System: An Experimental and Economic Approach. *Biotechnology Journal*, v. 14, n. 8, p. 1800716, 31 ago. 2019.
- POTOLICCHIO, I. et al. Proteomic Analysis of Microglia-Derived Exosomes: Metabolic Role of the Amino peptidase CD13 in Neuropeptide Catabolism. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 4, p. 2237–2243, 15 ago. 2005.
- RIAD, D. M. *Effect Of Mesenchymal Stem Cells Transfusion on the Diabetic Peripheral Neuropathy Patients*. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02387749?recrs=e&cond=mesenchymal+stem+cell&draw=2&rank=23>>. Acesso em: 24 abr. 2021.
- RIPA, R. S. et al. Bone Marrow–Derived Mesenchymal Cell Mobilization by Granulocyte- Colony Stimulating Factor After Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, v. 116, n. 11_supplement, 11 set. 2007.

- ROCCARO, A. M. et al. BM mesenchymal stromal cell–derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *Journal of Clinical Investigation*, v. 123, n. 4, p. 1542–1555, 1 abr. 2013.
- RUIJIN HOSPITAL. *A Pilot Clinical Study on Inhalation of Mesenchymal Stem Cells Exosomes Treating Severe Novel Coronavirus Pneumonia*. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT04276987?term=NCT04276987&draw=2 &rank=1>>. Acesso em: 21 maio. 2021a.
- RUIJIN HOSPITAL. The Safety and the Efficacy Evaluation of Allogenic Adipose MSC-Exos in Patients With Alzheimer’s Disease. *NIH Clinical Trials*, n. NCT04388982, 2020b.
- SAGARADZE, G. et al. Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 7, p. 1656, 3 abr. 2019.
- SCHEPERS, K.; FIBBE, W. E. Unraveling mechanisms of mesenchymal stromal cell– mediated immunomodulation through patient monitoring and product characterization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1370, n. 1, p. 15–23, 29 abr. 2016.
- SCHWARTZ, L.; SEELEY, K. Introduction to Tangential Flow Filtration for Laboratory and Process Development Applications. *PALL Corporation*, p. 1–10, 2014.
- SHELKE, G. V. et al. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 3, n. 1, p. 24783, 30 jan. 2014.
- SOKOLOVA, V. et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 87, n. 1, p. 146–150, 1 out. 2011.
- SQUILLARO, T.; PELUSO, G.; GALDERISI, U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplantation*, v. 25, n. 5, p. 829–848, 1 maio 2016.
- SWAMINATHAN, M. et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of AKI after Cardiac Surgery. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 29, n. 1, p. 260–267, 1 jan. 2018.
- TANG, Y. L. et al. Paracrine Action Enhances the Effects of Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Vascular Regeneration in Rat Model of Myocardial Infarction. *The Annals of Thoracic Surgery*, v. 80, n. 1, p. 229–237, jul. 2005.
- TANIKAWA, D. Y. S. et al. Deciduous Dental Pulp Stem Cells for Maxillary Alveolar Reconstruction in Cleft Lip and Palate Patients. *Stem Cells International*, v. 2020, p. 1–9, 12 mar. 2020.
- TAYLOR, D. D.; SHAH, S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods*, v. 87, p. 3–10, 1 out. 2015.
- TENG, X. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 37, n. 6, p. 2415–2424, 1 dez. 2015.

- THOMS, J. . *Bioprocessos em detalhes: do laboratório à indústria*. Disponível em: <<https://profissaobiotec.com.br/bioprocessos-em-detalhes-do-laboratorio-a-industria/>>. Acesso em: 30 abr. 2021.
- TOMASONI, S. et al. Transfer of Growth Factor Receptor mRNA Via Exosomes Unravels the Regenerative Effect of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*, v. 22, n. 5, p. 772–780, 1 mar. 2013.
- TRIAL.GOV, C. Use of Mesenchymal Stem Cells for Alveolar Bone Tissue Engineering for Cleft Lip and Palate Patients. *ClinicalTrials.gov*, p. 4–7, 2016.
- VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 4, p. 213–228, 17 abr. 2018.
- WANG, H.-S. et al. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cells*, v. 22, n. 7, p. 1330–1337, dez. 2004.
- WANG, K. et al. Enhanced Cardioprotection by Human Endometrium Mesenchymal Stem Cells Driven by Exosomal MicroRNA-21. *STEM CELLS Translational Medicine*, v. 6, n. 1, p.209–222, jan. 2017.
- WHITFORD, W.; GUTERSTAM, P. Exosome manufacturing status. *Future Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 10, p. 1225–1236, maio 2019.
- WILLIS, G. R.; KOUREMBANAS, S.; MITSIALIS, S. A. Toward Exosome-Based Therapeutics: Isolation, Heterogeneity, and Fit-for-Purpose Potency. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 4, p. 9, 9 out. 2017.
- WOBUS, A. M. Potential of embryonic stem cells. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 22, n. 3, p. 149–164, 1 jun. 2001.
- WOBUS, A. M.; BOHELER, K. R. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiological Reviews*, v. 85, n. 2, p. 635–678, abr. 2005.
- WONG, R. W. .; RABIE, A. B. . Effect of Bio-Oss® Collagen and Collagen Matrix on Bone Formation. *The Open Biomedical Engineering Journal*, v. 4, n. 1, p. 71–76, 9 mar. 2010.
- XIN, H. et al. Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Promote Functional Recovery and Neurovascular Plasticity After Stroke in Rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 33, n. 11, p. 1711–1715, 21 nov. 2013.
- YANG, Y. et al. Extracellular vesicles as a platform for membrane-associated therapeutic protein delivery. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 7, n. 1, p. 1440131, 1 dez. 2018.
- YIANNI, V.; SHARPE, P. T. Perivascular-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Dental Research*, v. 98, n. 10, p. 1066–1072, 5 set. 2019. YIN, K.; WANG, S.; ZHAO, R. C. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm. *Biomarker Research*, v. 7, n. 1, p. 8, 4 dez. 2019.
- ZANOTTI, L. et al. Mouse mesenchymal stem cells inhibit high endothelial cell activation and lymphocyte homing to lymph nodes by releasing TIMP-1. *Leukemia*, v. 30, n. 5, p. 1143–1154, 22 maio 2016.

ZHANG, B. et al. HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing. *STEM CELLS*, v. 33, n. 7, p. 2158–2168, 1 jul. 2015.

ZUK, P. A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 12, p. 4279–4295, 1 dez. 2002.