



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

CAROLINA ALVES CARNETTA

**Terapia *cell free* como abordagem terapêutica da
Doença do Olho Seco**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

**Botucatu
2024**

CAROLINA ALVES CARNETTA

**Terapia *cell free* como abordagem terapêutica da
Doença do Olho Seco**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Botucatu
2024

C289t Carnetta, Carolina Alves
Terapia cell free como abordagem terapêutica da Doença do
OlhoSeco / Carolina Alves Carnetta. -- Botucatu, 2024
66 f.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientadora: Elenice Deffune

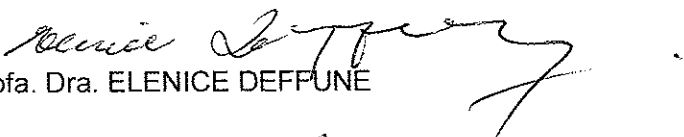
1. Doença do Olho Seco. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Meio
Condicionado. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu. Dados
fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CAROLINA ALVES CARNETTA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (BIOTECNOLOGIA MÉDICA), DA FACULDADE DE MEDICINA.

Aos 29 dias do mês de maio do ano de 2024, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de CAROLINA ALVES CARNETTA, intitulada **Terapia celular cell free como abordagem terapêutica da Doença do Olho Seco**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. ELENICE DEFFUNE (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto. de Especialidades Cirúrgicas e Anestesiologia / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. ARUÃ MASTRANGELO PRUDENCIATTI (Participação Virtual) do(a) Crop Labs Ltda, Profa. Dra. CAROLINE NASCIMENTO BARQUILHA (Participação Virtual) do(a) Laboratório Nacional de Biociências / Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: a_p_r_o_v_a_d_a . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. ELENICE DEFFUNE

Dr. Elenice Deffune
Cremesp 44.445

Agradecimentos

Aos meus pais, Lucileide e Rinaldo, sempre me deram amor, me deram educação e apoio durante minha vida. Sempre fizeram e ainda fazem o possível para que eu atinja meus objetivos. À minha irmã e companheira eterna, Gabriela, que apesar de todas nossas discussões, sempre estará ao meu lado. Ao meu avô, Mário, que sempre esteve ao meu lado, me deu muito amor e sempre me incentivou a sonhar.

Ao meu noivo, Pedro, que todos os dias está ao meu lado e me apoiando em todas as decisões, sendo fáceis ou difíceis. À sua família, que me acolheram e sempre me fizeram sentir parte da família, além de me ajudar no que fosse necessário.

Aos meus amigos de toda vida que sempre me apoiaram, querendo destacar Giovana Bengozi e Maria Luísa.

À minha orientadora, Dra. Elenice Deffune, que me auxiliou para que esse projeto fosse possível. Uma mulher que sempre incentiva seus alunos a conquistarem o melhor. Agradeço a todos seus ensinamentos e creio que tenho muito ainda a aprender com ela.

Às pessoas do laboratório que me auxiliaram durante o projeto, principalmente Ananda e Pâmela.

Às pessoas que fizeram as doações das amostras, que sem essas doações, o projeto não seria possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2022/07884-0.

RESUMO

O meio condicionado (MC) é o secretoma das células-tronco durante o processo de cultura celular, sendo um meio com fatores de crescimento, citocinas e moléculas sinalizadoras livres e vesículas extracelulares, que progressivamente se tornam relevante, tanto para diagnóstico como para terapêutica. Neste campo, identificamos a Doença do Olho Seco (DOS) que impacta profundamente a qualidade de vida das pessoas, cujo tratamento consiste no uso de colírios. O Laboratório de Biologia Celular tem desenvolvido como produto para esses pacientes o autocolírio de soro de sangue, porém existem pacientes com impossibilidade de acesso venoso, ou com sorologias reagentes para doenças infecciosas que são impedidos de utilizar o produto. Também, tendo em vista uma produção sem a necessidade de doador para a produção do tratamento, o projeto teve como objetivo a produção de meios condicionados de células-tronco de diferentes origens, como de cordão umbilical (CTM_{cup}), polpa dentária (CTM_{PD}), tecido adiposo (CTM_{TA}) e límbica (CT_L). As células-tronco foram cultivadas em meio DMEM F-12 aditivado e com 10% de soro fetal bovino para caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo com marcadores específicos. As células foram cultivadas até atingirem 70% de confluência, momento em que sofreram *wash out*, uma etapa de lavagem para a retirada do soro fetal bovino (SFB) e receberam o meio DMEM F-12 aditivado xeno free por 48 horas. Após esse período, o secretoma foi coletado, centrifugado e armazenado para posterior uso. Os meios condicionados foram caracterizados utilizando kit Multiplex que permite análise simultânea de vários biomarcadores de citocinas e quimiocinas. Os fatores dosados foram EGF, Eotaxin/ CCL11, IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL- 8/ CXCL8, IL9, FGF-2/ FGF-basic, IFN α , VEGF, IFN γ , MCP-1/ CCL2 e TNF α . Após a caracterização, pode-se considerar os resultados dos marcadores IFNY, IL2, IL-8 e VEGF. Enquanto o restante, deverá ser reavaliado, mas acredita-se que o MC tenha potencial para tratamento da DOS pelas células produzirem fatores de crescimento e citocinas que estimulam a regeneração de diferentes tecidos.

Palavras-Chave: Doença do Olho Seco. Células-Tronco Mesenquimais. Meio Condicionado.

ABSTRACT

Conditioned medium (CM) is the secretome of stem cells during the cell culture process, being a medium with growth factors, cytokines and free signaling molecules and extracellular vesicles, which progressively become relevant, both for diagnosis and therapy. In this field, we identify Dry Eye Disease that has a profound impact on people's quality of life, the treatment of which consists of the use of eye drops. The Cellular Biology Laboratory has developed blood serum self-eye drops as a product for these patients, however there are patients who cannot have venous access, or with reactive serologies for infectious diseases who are prevented from using the product. Also, with a view to production without the need for a donor to produce the treatment, the project aimed to produce conditioned media from stem cells of different origins, such as from umbilical cord), dental sparing, adipose tissue and limbic tissue. The stem cells were cultivated in DMEM F-12 supplemented medium with 10% fetal bovine serum for immunophenotypic characterization by flow cytometry with specific markers. The cells were cultivated until they reached 70% confluence, at which point they underwent wash out, a washing step to remove fetal bovine serum (FBS) and received DMEM F-12 medium with xeno free additives for 48 hours. After this period, the secretome was collected, centrifuged and stored for later use. The conditioned media were characterized using a Multiplex kit that allows simultaneous analysis of several cytokine and chemokine biomarkers. The factors measured were EGF, Eotaxin/ CCL11, IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8/ CXCL8, IL9, FGF-2/ FGF-basic, IFN α , VEGF, IFN γ , MCP-1/CCL2 and TNF α . After characterization, the results of the IFN γ , IL2, IL-8 and VEGF markers can be considered. While the rest must be reevaluated, but it is believed that CM has a potencial to treat DOS because cells produce growth factors and cytokines thate stimulate the regeneration of fifferent tissues.

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Critérios de Inclusão e Exclusão utilizados para a Seleção das Parturientes para a Doação de Segmento de Cordão Umbilical	24
Quadro 2: Dados do equipamento de radiação	30
Quadro 3: Resultados obtidos na caracterização das células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo	41
Quadro 4: Resultado da viabilidade das células antes e após contato com os meios condicionados	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Dosagem de diferentes fatores de crescimento e citocinas pelo sistema Luminex™ 47
- Tabela 2:** Percentual de inconsistências identificadas na análise de diferentes fatores de crescimento, em meio de cultura, utilizando a plataforma Luminex™ 48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de jovens (0-14 anos) e de idosos (60 anos e mais) e Índice de Envelhecimento. Brasil 2010-2060	13
Figura 2: Fontes de células-tronco mesenquimais	17
Figura 3: Região em que está localizado o limbo do olho	19
Figura 4: Processamento da córnea.....	26
Figura 5: Processamento da gordura para obtenção de células-tronco	27
Figura 6: Fluxograma do procedimento de expansão e cultura celular das células-tronco	27
Figura 7: Procedimento para o preparo das amostras para Citometria de Fluxo .	31
Figura 8: Diluição em série para preparo das curvas padrões.....	36
Figura 9: Fluxograma do preparo da placa do kit Luminex	36
Figura 10: Disposição das amostras nas placas de 96 poços para caracterização das amostras de meio condicionado.....	37
Figura 11: Reagentes e equipamentos usados para a caracterização dos meios condicionados	38
Figura 12: Fotomicrografias da cultura celular das células-tronco.....	39
Figura 13: Análise de Citometria de Fluxo de CTM _{cup} , com diferentes marcadores (CDs) com expressão positiva e negativa.....	40
Figura 14: Análise de Citometria de Fluxo de CTM _{TA} , com diferentes marcadores (CDs) com expressão positiva e negativa.....	40
Figura 17: Microfotografias durante extração de células-tronco límbicas.....	43
Figura 15: Procedimento produção do coating	44
Figura 16: Preparo da placa para irradiação	45
Figura 18: Fotografia do procedimento do teste Ficoll.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BUT	<i>Break up time</i>
CF	Citometria de Fluxo
CT _L	Células-tronco límbicas
CTM _s	Células-tronco mesenquimais
CTM _{cup}	Células-tronco mesenquimais de cordão umbilical e placentário
CTM _{PD}	Células-tronco mesenquimais de polpa dentária
CTM _{TA}	Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo
DEVH	Doença do enxerto versus hospedeiro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOS	Doença do Olho Seco
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
FCDP	Fator de crescimento derivado de plaquetas
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos Humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano
IGF	Fator de crescimento tipo insulina
IL-1	Interleucina 1
MC	Meio Condicionado
MC CTM _{TA}	Meio Condicionado de células-tronco de tecido adiposo
MC CTM _{cup}	Meio Condicionado de célula-tronco cordão umbilical e placentário
MH	Meio Hiperosmolar
MHC classe II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MIF	Média de intensidade de fluorescência
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
POP	Procedimento Operacional Padrão
SCUP	Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
SDF1 α	Fator 1 α derivado de células estromais
SFB	Soro Fetal Bovino
SITC	Sociedade Internacional de Terapia Celular
TGF- β	Fator de crescimento de transformação β
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de crescimento vaso- <i>endo</i> telial
WH	<i>Wound healing</i>

Sumário

1	Introdução	12
1.1	Células-Tronco Mesenquimais de Cordão Umbilical e Placentário e Células-tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo.....	18
1.2	Células-tronco límbicas.....	19
1.3	Células-tronco polpa dentária.....	19
1.4	Meio Condicionado de Células-tronco	20
1.5	<i>Wound healing assay</i>.....	21
2	Justificativa	22
3	Objetivos	22
3.1	Objetivo Geral	22
3.2	Objetivos Específicos.....	22
4	Material e Métodos	23
4.1	Células-tronco mesenquimais de cordão umbilical e placentário humano (CTM_{CUP}).....	24
4.2	Células-tronco mesenquimais polpa dentária (CTM_{PD})	25
4.3	Células- tronco do limbo humano (CT_L).....	25
4.4	Células-tronco de tecido adiposo	26
4.5	Expansão e cultura das células-tronco	27
4.5.1	<i>Coating</i> de fibrina para cultura de CT_L	29
4.5.2	Preparo Placa de cultura para irradiação de CTM_{TA}.....	30
4.6	Caracterização fenotípica das células-tronco	30
4.7	Obtenção do Meio condicionado de CTM_{cup}, CTM-TA e CT_L.....	32
4.8	Análise de toxicidade do MC utilizando <i>Monocyte Monolayer Assay</i> (MMA)	33
4.9	Caracterização do meio condicionado com dosagem de citocinas e fatores de crescimento	34
5	Resultados e Discussão	38
5.1	Citometria de fluxo.....	40
5.2	Obtenção da CT_L.....	42
5.2.1	<i>Coating</i> de cola de fibrina para <i>wound healing</i>.....	43
5.2.1	Irradiação das CTM_{TA}.....	44
5.3	Análise teste <i>Monocyte Monolayer Assay</i> (MMA).....	45

5.4 Caracterização do MC	46
6 Conclusões	51
Referências bibliográficas	52
Anexo	58

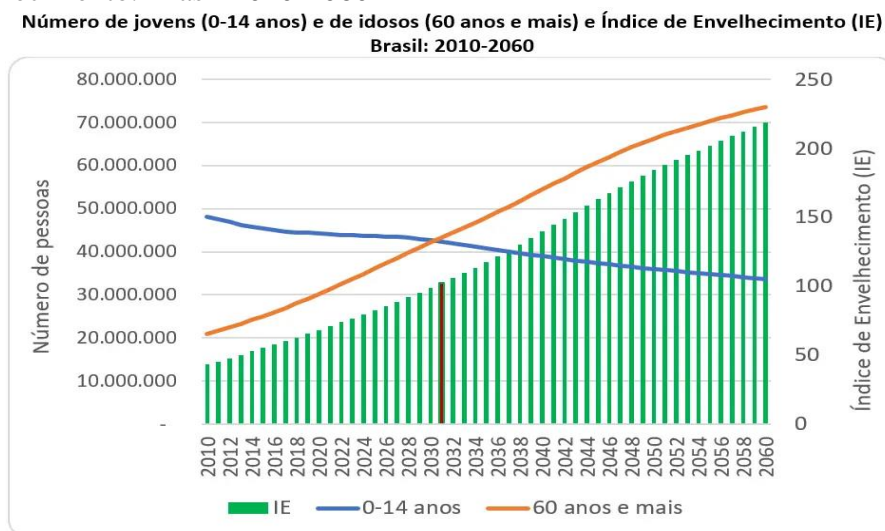
1 Introdução

A Doença do Olho Seco (DOS) ou *Keratoconjuntivite sicca* tem sido classificada como um problema de saúde pública, uma vez que entre os fatores de risco encontram-se: uso de lentes de contato, exposição a ambientes com ar-condicionado e a telas de computadores, mídias eletrônicas de um modo geral, *kindles (leitores digitais)*, celulares, *ipads* etc, além do uso de medicamentos e doenças autoimunes. Sua etiologia é multifatorial envolvendo tanto a superfície ocular como o filme lacrimal. Em suas formas mais leves, causa desconforto ocular, fadiga e distúrbios visuais que interferem na qualidade de vida. Em suas formas mais graves, provoca dor crônica e comprometimento da visão. Embora seja altamente prevalente, os tratamentos atuais têm sido insuficientes, tornando-se uma condição frustrante, tanto para médicos quanto para pacientes(1).

Tendo em vista que o aumento da longevidade pode ser um fator contribuinte para a prevalência da DOS na população, pois o envelhecimento populacional é resultado de um conjunto de fatores, como o aumento da expectativa de vida da população e o declínio das taxas de fecundidade e mortalidade, tornando-se um fenômeno mundial que modifica a estrutura etária da população. Pode-se considerar a maior predominância da doença no sexo feminino cuja expectativa de vida no mundo todo é maior. Na Figura 1 isto fica claro, onde se vê a taxa de jovens diminuindo e a de idosos aumentando(2,3).

Em 2005, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geostatística (IBGE) os idosos no Brasil eram 9,9% da população, perfazendo um contingente de 18,2 milhões de pessoas, já em 2020 este número chegou a 14% de pessoas com mais de 60 anos (28 milhões), um aumento muito expressivo como resultante de fatores como melhora no atendimento à saúde e avanços na tecnologia médica aliados a universalização da Seguridade Social, com a consolidação do Sistema Único de Saúde (SUS), mas isto acarreta problemas relacionados com aumento vultoso dos gastos com saúde (2).

Figura 1: Número de jovens (0-14 anos) e de idosos (60 anos e mais) e Índice de Envelhecimento. Brasil 2010-2060



Fonte: IBGE, Projeções de população (revisão 2018)

Sendo o envelhecimento um processo natural de fragilização do indivíduo, há uma progressiva vulnerabilidade do mesmo perante a sua própria fisiologia e o ambiente, incluindo exatamente aí a DOS.

A DOS pode ser classificada de duas formas: doença do olho seco por deficiência aquosa e doença do olho seco evaporativa. A primeira forma é quando ocorre uma diminuição na produção de lágrimas pelas glândulas lacrimais e perda do componente aquoso da lágrima. Isso pode ser devido a várias razões, como envelhecimento, doenças autoimunes, danos aos nervos que controlam a produção de lágrimas, efeitos colaterais de alguns medicamentos. No caso da doença do olho seco evaporativa a principal causa é a evaporação excessiva da camada lacrimal devido a problemas na qualidade do filme lacrimal, bem como por excessiva evaporação provocada por fatores ambientais, como vento e ar-condicionado (4,5). O olho seco evaporativo pode ocorrer também por deficiência lipídica, mais frequentemente secundária à disfunção da glândula meibomiana e por defeitos de lubrificação do olho pelo filme lacrimal (6).

Diversas são as causas do olho seco, podendo aparecer de forma isolada, como exposição ao ar condicionado e aparelhos eletrônicos por período prolongado que

levam a evaporação da lágrima, ou podendo também ser um distúrbio secundário a doenças como Síndrome de Sjögren, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, doença do enxerto *versus* hospedeiro (DEVH) e Síndrome de Stevens-Johnson. Sabe-se que a inflamação e a falha da imunorregulação da superfície ocular estão relacionadas com a progressão da doença(7,8).

Pacientes com olho seco apresentam erosões epiteliais denominadas puntatas, que podem ser encontradas na córnea. Além disso, essa doença predispõe a ceratite bacteriana e úlcera, que pode levar à perfuração(4).

A fisiopatologia da doença está relacionada às condições que levam à evaporação da lágrima, baixa produção do filme lacrimal e inflamação. A diminuição da quantidade de lágrima secretada e hiperosmolaridade da lágrima promovem inflamação da superfície ocular, levando à instabilidade do filme lacrimal, resultando em dor ocular, vermelhidão, sensação de corpo estranho, secura, fotofobia, irritação e visão embaçada. A infiltração de células T na glândula lacrimal e produção de citocinas pró-inflamatórias contribuem para o aumento da inflamação local. Os mediadores inflamatórios encontrados na lágrima incluem diversas citocinas, como interleucina 1 (IL-1), fator α de necrose tumoral (TNF- α) e proteases(5,8).

O tratamento do olho seco consiste na reposição da lágrima para aumentar a umidade da superfície ocular e melhorar a lubrificação. É realizado com colírios que contêm conservantes que impedem a proliferação de microrganismos. Entretanto, estes colírios não possuem a complexa composição da lágrima natural, podendo não ser eficazes em alguns casos. Além disso, os conservantes podem ocasionar toxicidade e alergia(9,10).

Sendo assim, buscaram-se novas alternativas de terapia, sendo observado que o colírio produzido com soro autólogo é um tratamento eficaz para distúrbios oculares, como anormalidades encontradas no epitélio ocular e olhos secos, além de ser um produto não tóxico para o organismo e de baixo custo.

Seu uso foi primeiramente descrito por Fox et al em 1984(11). Em seguida, Tsubota et al descreveu a presença no soro de fatores de crescimento e vitaminas com potencial epiteliotrófico para a superfície ocular(9,10,12).

O soro autólogo também pode ser utilizado no tratamento da doença do olho seco após transplante de células-tronco hematopoiéticas. Em estudo realizado em pacientes com doença do enxerto *versus* hospedeiro, foi possível observar melhora significativa após quatro semanas de uso de soro autólogo, sendo que anteriormente todos estes pacientes utilizaram colírio (lágrima artificial) sem melhora do quadro clínico. Os componentes da lágrima, como fatores de crescimento epidermais (EGF) e vitamina A são importantes para a proliferação, diferenciação e maturação do epitélio ocular. O colírio produzido a partir do soro autólogo pode suprir estes fatores e melhorar a condição da superfície ocular(13,14).

Estudo de Kojima *et al* comparou soro autólogo e colírio comercial (lágrima artificial) em pacientes que os utilizaram por duas semanas, seis vezes ao dia. Na comparação dos valores de BUT (*Break up time*), exame oftalmológico que indica a instabilidade do filme lacrimal, dos pacientes que usaram colírio com soro autólogo e dos que utilizaram o colírio comercial, o valor do BUT foi significativamente maior no grupo de pacientes que usaram soro autólogo. Considerando que quanto maior o valor do BUT, melhor a estabilidade da lágrima, os pacientes que utilizaram colírio de soro autólogo tiveram melhor desempenho. Além disso, o BUT dos pacientes pré e pós-tratamento com soro autólogo aumentou (12,15).

Os produtos derivados do sangue, como as plaquetas, têm a capacidade de estimular a regeneração de diferentes tecidos, sendo que os fatores de crescimento derivados de plaquetas (FCDP) têm importante função na reparação tecidual. Estes fatores são utilizados no tratamento de diferentes casos na oftalmologia como defeitos epiteliais da córnea, doença do olho seco, síndrome da superfície ocular e na reconstrução da superfície ocular pós perfuração corneana associada com transplante de membrana amniótica. As plaquetas têm muitos fatores de crescimento e citocinas, as quais estão associadas com o processo de cura e regeneração de tecidos. Os fatores de crescimento que são liberados quando da ativação das plaquetas são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TGF-, IGF e EGF (13,16–18).

O LBA/BioCel, denominado de Laboratório de Engenharia Celular até maio de

2019, iniciou em 2001 pesquisa na área de regeneração de lesões crônicas (pele e olho) a partir da matéria prima excedentes do serviço: plasma e o concentrado de plaquetas. A partir dos primeiros projetos, identificou-se a possibilidade de desenvolver o protocolo japonês de soro autólogo de uso ocular para abordagem da Doença do Olho Seco (DOS). Em 2014 foi defendida a primeira dissertação sobre o tema, e em, 2019 a segunda(19,20).

De 2007 a 2020, cinquenta pacientes foram incluídos no protocolo clínico de uso de soro autólogo de uso ocular, no entanto, muitos outros pacientes teriam a indicação de se beneficiar deste protocolo, mas possuem contraindicações precisas. Dentre estas contraindicações está a dificuldade de acesso venoso em pacientes idosos acometidos de doença crônicas, para estes pacientes existe a possibilidade do uso de soro alogênico, e mais recentemente tem se destacado na literatura, o uso do meio condicionado obtido a partir da cultura de células-tronco mesenquimais. A utilização do meio condicionado proporciona um produto sem que haja a necessidade de um doador para cada lote de colírio, possibilitando produção, doseamento e controle em laboratório (17,21).

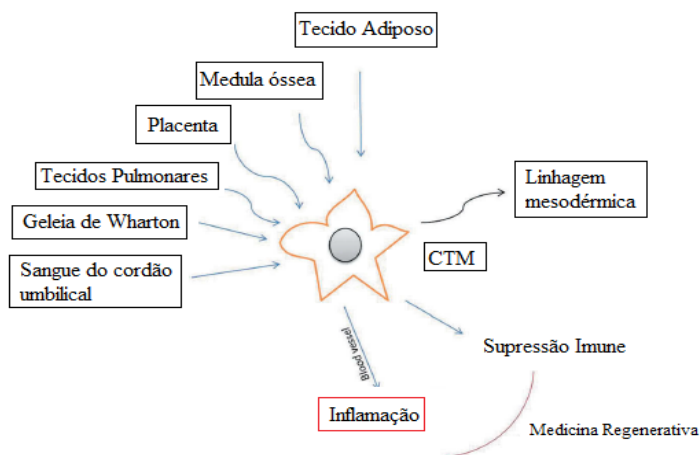
As células-tronco podem ser classificadas como células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. Dentre as células-tronco adultas, encontra-se duas classes de células, as hematopoiéticas e mesenquimais. As células-tronco mesenquimais (CTM_s) são consideradas multipotentes e são capazes de se autorrenovar e de se diferenciar de forma multidirecional, são caracterizadas pelas suas propriedades de aderência ao substrato de cultivo e capacidade de diferenciação. Também, são capazes de produzir fatores imunossupressores, anti-inflamatórios e tróficos, sendo exploradas como um potencial agente terapêutico para reparo de tecidos e tratamentos de diversas doenças(22).

As CTMs liberam diversos fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF, que possibilita a proliferação celular de células progenitoras intrínsecas ao tecido, como fibroblastos e macrófagos, que têm como função reparo e regeneração do tecido). O meio condicionado, ou secretoma, produzido contém uma variedade de fatores bioativos com efeitos antiinflamatórios, antiapoptóticos, neuroprotetores e de

proliferação. Evidências crescentes provaram que o secretoma desempenha um papel importante em várias doenças, incluindo doenças de pele, ossos, músculos e dentárias. O papel do meio condicionado em doenças oculares ainda não é claro, mas acredita-se que o meio condicionado possa promover a proliferação celular, reduzir a inflamação e o vazamento vascular, inibir a degeneração e apoptose das células da retina, proteger as estruturas da córnea e da retina e melhorar ainda mais a função visual(8).

Essas células podem ser obtidas a partir de uma variedade de órgãos teciduais, como medula óssea, tecido adiposo, placenta, tecidos pulmonares, sangue do cordão umbilical, geleia de Wharton, cordão umbilical e outras fontes como pode ser observado na Figura 2 (23)(24)(25)(26). As CTMs têm sido citadas progressivamente como alvo terapêutico envolvendo a Medicina Regenerativa pelas suas propriedades no controle do processo inflamatório e pelo fato de que as mesmas migram entre as células endoteliais do vaso sanguíneo circulando até o local da inflamação (homing) e fazendo a sua mediação.

Figura 2: Fontes de células-tronco mesenquimais



Legenda: As células-tronco podem ser obtidas a partir de uma variedade de órgãos teciduais, indo da mais simples, como tecido adiposo, para medula óssea, cordão umbilical, entre outras. Fonte: Adaptado de Mesenchymal Stem-cell derived Extracellular Vesicles: A Novel Cell-Free Therapy. 2020. DOI: 10.1080/08820139.2020.1712416 (31)

1. 1 Células-Tronco Mesenquimais de Cordão Umbilical e Placentário e Células-tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo

O segmento do cordão umbilical se dá pela doação da mãe após o parto, desde que haja aprovação pelo Conselho de Ética e Pesquisa. Normalmente, é recebido um segmento entre 5-10cm de comprimento e, quanto mais próximo do coto umbilical, maior é a riqueza de células-tronco mesenquimais. O cordão é enviado para o laboratório e fragmentado em pedados entre 1-2mm de tamanho. O tecido pode ser dissociado por dois métodos: explante e enzimático. No primeiro caso, os microfragmentos são colocados diretamente na placa de cultura para células aderentes com meio de cultura e, assim, as células migram para o substrato plástico. No segundo caso, os microfragmentos são colocados em solução enzimática para ocorrer a liberação das células, mas não necessariamente as células de interesse. Após a dissociação, o material é lavado para retirada das hemácias e sob condições adequadas, as células são contadas, plaqueadas e observadas em microscopia invertida contraste de fase. Posteriormente, as células são imunofenotipadas por Citometria de Fluxo para confirmar se as células obtidas são realmente células-tronco mesenquimais(27–29).

O tecido adiposo pode ser obtido por doação de pacientes que fazem o procedimento de remodelamento corporal pela técnica de lipoaspiração, ou lipoescultura, após a caracterização de que se encontram em bom estado de saúde e não sejam portadores de doenças infecto-contagiosas.

O tecido adiposo é considerado uma fonte abundante de células-tronco adultas e de fácil acesso no corpo humano. Geralmente, as células-tronco mesenquimais podem ser obtidos de frações vasculares estromais, após a remoção de células plásticas sem adesão após 24 horas de cultura. A população celular foi classificada com base em marcadores específicos nas superfícies celulares por citometria de fluxo. A qualidade e a quantidade de ASCs dependem, portanto, dos métodos de isolamento. Assim, como as CTMcup, as células-tronco de tecido adiposo podem ser isoladas tanto de forma enzimática, utilizando a colagenase tipo II, quando por dissociação mecânica. Após a expansão celular, é imunofenotipado

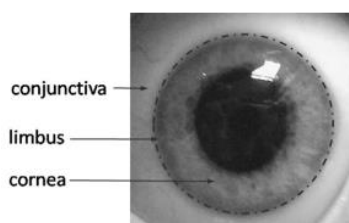
por Citometria de Fluxo utilizando marcadores específicos positivos CD73, CD90 e CD44, e negativos CD45, HLA ABC, CD34 e HLA DR (II)(35).

1. 2 Células-tronco límbicas

Limbo ou também denominado, junção córneo-escleral é uma região transicional entre a córnea e a esclera, que mede entre 1,5 a 2 mm de largura, e está envolvida com o metabolismo da córnea, Figura 3. Especula-se que as células-tronco límbicas estão presentes no tecido endotelial da área do limbo, ou seja, na junção vascularizada entre o epitélio da córnea e da conjuntiva(30,31).

A obtenção do anel córneo-escleral é feita a partir do doador ou da concessão dos familiares que consentem a doação do paciente em fase terminal. A coleta é realizada nas melhores condições, em que se retira o globo ocular para depois retirar a córnea. O anel é microfragmentado e pode ser dissociado pelo método explante ou enzimático, conforme descrito no item 1.1. Também, é imunofenotipado por Citometria de Fluxo.

Figura 3: Região em que está localizado o limbo do olho



Fonte: Notara M et al. In sickness and in health: Corneal epithelial stem cell biology, pathology and therapy. *Experimental Eye Research* [Internet]. 2010; 90: 188-195. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.09.023>(32)

1.3 Células-tronco polpa dentária

Comparadas com as células-tronco da medula óssea, as células-tronco de polpa dentária são altamente proliferativas, osteogênicas e exibem taxas clonogênicas, podendo gerar um ou mais tipo de células especializadas. São contribuintes chave para a homeostase pulpar e reparo de lesões. A polpa dentária é

uma fonte valiosa de células-tronco, pois sua obtenção não é invasiva ao corpo humano, quando comparado com a obtenção de células de medula óssea e de tecido adiposo. Os dentes são uma excelente fonte de células-tronco da polpa dentária para procedimentos terapêuticos e podem ser facilmente obtidos após extração dentária ou queda de dentes decíduos. A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo existente em um espaço vazio (cavidade pulpar) circundado por dentina ou tecido duro(33).

As células-tronco da polpa dentária podem ser isoladas do tecido da polpa dentária de diferentes idades e estados de saúde, como o tecido da polpa dentária saudável de dentes impactados de adultos, a polpa dos dentes decíduos esfoliados de crianças e o tecido da polpa dentária inflamado de pacientes com cárie ou periodontite. Usando tecnologias de classificação de células, as células-tronco da polpa dentária podem ser isoladas em vários subconjuntos de células com fenótipos específicos, positivo para CD271, CD24 α e CD146(34).

1.4 Meio Condicionado de Células-tronco

Os meios de cultura utilizados para a expansão de CTM oferecem produtos especializados otimizados para populações de células-tronco mesenquimais, muitas das quais livres de componentes derivados de animais. Esses meios são projetados para minimizar o tempo de adaptação, maximizar o desempenho da célula e atender aos requisitos regulatórios(36). Sua seleção e validação constituem etapas primordiais e essenciais para a base tecnológica que utiliza a cultura celular. Uma vez que o meio de cultura é adicionado sobre as células passa a fornecer o ambiente adequado para o crescimento das células e conseqüentemente possibilitando as melhores condições para que cada unidade fabril, denominada célula, produza seus fatores de crescimentos, citocinas etc. Em condições padrão de cultura, este meio deve ser trocado a cada 36-48h, momento que o “meio usado” seria descartado. Considerando que este material, até pouco tempo, era considerado rejeito biológico, contém uma gama importantes de proteínas, este material passou a ser considerado um subproduto com metabólitos, fatores de crescimento, conteúdo de microRNAs,

vesículas extracelulares (microvesículas e exossomos) e diversas proteínas da matriz extracelular que são secretadas pelas células que foram cultivadas. Assim, o meio obtido pode ser aplicado na terapia celular, sendo considerado mais recentemente como terapia livre de células(37). Este “meio usado” para o crescimento e expansão das CTM passaram a ser denominados na literatura de meio condicionado e constituem hoje matéria prima de grande valor agregado de mercado. Padronizar sua obtenção, caracterizá-lo e utilizá-lo em medicina regenerativa é um desafio que está sendo desvendado nos últimos anos.

Após sua produção e caracterização, uma etapa importante de validação, ainda em bancada se faz necessário. A técnica com destaque para a testagem da ação do meio condicionado de células-tronco em células-tronco do limbo afetadas pela doença do olho seco, é o *Wound healing assay*.

1.5 *Wound healing assay*

A técnica *wound healing*, ou pela tradução, fechamento da ferida, é uma técnica utilizada para analisar a capacidade de migração celular. As células são cultivadas em placa com poços para cultura aderente e a técnica é feita pela remoção de uma seção de monocamada celular, podendo ser feita na vertical ou em formato de cruz. Sob influência de diversos fatores de crescimento e citocinas, queratinócitos podem exibir uma alta atividade proliferativa, assim, as células migram até o lugar da ferida e começam a restauração. Técnica é utilizada para estudar se o produto de interesse produzido influencia no fechamento da ferida, além de que o tempo também é um fator observado, ou seja, quanto tempo as células levaram para fechar a ferida realizada (38)(39).

De acordo com o protocolo da técnica, deve-se ter uma monocamada celular com confluência “adequada”, ou seja, não se deve permitir que as células atinjam uma confluência muito próxima de 100%, pois como se trata de cultura de células normais, não neoplásicas, estas, possuem a propriedade denominada de inibição por contato. Células normais, ao identificarem um ambiente saturado, sem área de crescimento e alimento disponível, disparam seus mecanismos de sinalização de

morte. Nestes casos, caso a cultura esteja com este tipo de sinalização, haverá um viés importante na análise dos resultados. Diante disto, faz-se necessária uma observação criteriosa por pelo menos dois observadores experientes, para que isto não aconteça. Após esta avaliação, com uma micropipeta com ponteira estéril a ferida é realizada no meio da monocamada celular. Como se trata de uma técnica manual, é importante inclinar a pipeta corretamente e aplicar a mesma pressão em todos os poços para criar uma largura de forma consistente. Após a ferida, os poços são lavados para a remoção de *debris* celulares e o meio de cultura é adicionado (38).

2 Justificativa

Este projeto faz parte de um projeto Jovem Pesquisador em colaboração com a Profa. Mônica de Cássia Alves de Paula/UNICAMP, recentemente aprovado pela FAPESP sob nº 2014/19138-5 intitulado AVALIAÇÃO DE NOVAS TÉCNICAS DE TERAPIA CELULAR EM DOENÇAS DE SUPERFÍCIE OCULAR que tem como objetivo principal avaliar novas abordagens em terapias baseadas em células e produção de produtos de terapias avançadas (PTA) para tratamento de Doença do Olho Seco. Este projeto, com termo de outorga assinado recentemente, tem data de início em 01/02/2022, com duração de 60 meses, com insumos e bolsa de estudo previstos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Contribuição de ensaios envolvendo cultura celular em terapêuticas inovadoras para DOS.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Obter meio condicionado de CTM derivada de tecido adiposo, CTM

derivada de cordão umbilical, CTM derivada de polpa dentária;

2) Caracterizar laboratorialmente o meio condicionado de CTM obtido;

3) Desenvolver um programa de computador (*site* ou *software*) para registro e gerenciamento do banco de células do Laboratório de Engenharia Celular.

4 Material e Métodos

Este projeto respeitou todas as determinações e exigências do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos, obtendo a aprovação do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) com parecer número e da Plataforma Brasil CAAE no 46704421.1.0000.5411. O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA)/ Biologia Celular, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), no campus de Botucatu.

Este projeto encontra-se vinculado a dois outros projetos previamente aprovados via Plataforma Brasil, um, em parceria com o Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário Humano da UNICAMP, que aplicou os TCLE para participação em pesquisa nas gestantes que fizeram a doação de sangue de cordão para criopreservação. Nestes casos, o segmento do cordão umbilical e placentário, normalmente é descartado. Com autorização explícita e o TCLE assinado pela parturiente, um segmento de 10 centímetros do cordão umbilical foi doado para projeto anterior. Este projeto recebeu apoio financeiro, na forma de auxílio pesquisa, da Fapesp sendo cadastrado com o processo n025.281/2016 vigente até 30/09/2021.

Além desta cooperação com a UNICAMP, outra parceria, também com a mesma Universidade foi estabelecida na composição do projeto intitulado AVALIAÇÃO DE NOVAS TÉCNICAS DE TERAPIA CELULAR EM DOENÇAS DE SUPERFÍCIE OCULAR, submetido no Programa de Jovens Pesquisadores (JP2) de Centros Emergentes com a Dra. Mônica de Cássia Alves de Paula, Professora do Departamento de Oftalmologia daquela universidade. Este projeto está cadastrado sob nº 2021/04045-5 a Fapesp, com duração de 60 meses, com um orçamento no valor de R\$ 1.226.549,12 contando com a efetiva

colaboração do LBA/BioCel na linha de pesquisa da orientadora do presente projeto.

Para o desenvolvimento do projeto, foi concedida uma bolsa de treinamento técnico nível três, sendo nº do processo 2022/07884-0 de duração de 24 meses, com vigência no período 01/08/2022 a 31/07/2024.

4.1 Células-tronco mesenquimais de cordão umbilical e placentário humano (CTM_{CUP})

No Banco de Células do LBA/BioCel foram identificadas ampolas de células-tronco de cordão umbilical e placentário humano que foram processadas anteriormente no projeto conjunto do Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário da UNICAMP, mantidas criopreservadas no biorrepositório do LBA/BioCel. O projeto recebeu nº CAAE nº56823316.0.0000.5411 na Plataforma Brasil, em dezembro de 2016. Na ocasião, não só amostras de SCUP (sangue de cordão umbilical e placentário), como segmentos do cordão Umbilical foram transferidos para o LBA/BioCel. No projeto acima aprovado, foram confirmados os critérios de inclusão e exclusão importantes, para o presente projeto, quanto à seleção das amostras de células obtidas. Estes critérios estão explicitados no quadro abaixo.

Quadro 1: Critérios de Inclusão e Exclusão utilizados para a Seleção das Parturientes para a Doação de Segmento de Cordão Umbilical

Indicador	Critérios	
	Inclusão	Exclusão
Idade em anos	$18 \leq I \leq 40$	$18 > I > 40$
Pressão Arterial	Normal	Alterada
Dosagem da Glicemia	Normal	Alterada
Doença autoimune	Ausente	Presente
Complicações do Parto	Ausente	Presente
Sorologia reagente para HIV	Ausente	Presente

ou Hepatites B e C		
Infecção em curso	Ausente	Presente

Fonte: acervo do LBA/BioCel, 2021

4.2 Células-tronco mesenquimais polpa dentária (CT_{PD})

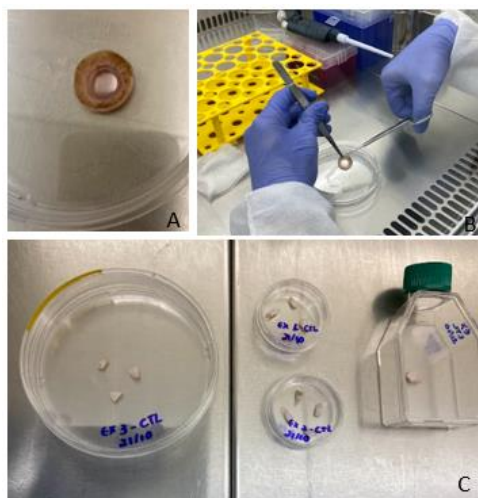
No Banco de Células do LBA/BioCel foram identificadas ampolas de células-tronco de polpa dentária doadas oriundas de projetos anteriormente executados, cujas células remanescentes estão armazenadas de forma regular no biorrepositório da UNESP, sublocado no LBA/BioCel.

4.3 Células- tronco do limbo humano (CT_L)

A obtenção das CT_L está ligada ao projeto Auxílio Jovem Pesquisador 2, em parceria com a UNICAMP, denominado *Avaliação de novas técnicas de terapia celular em doenças de superfície ocular*. O anel córneo-escleral foi fragmentado em pequenos pedaços para dissociação enzimática, pela ação da colagenase tipo I em meio HEPES. O fragmento foi mantido sob condições ideais de cultivo por 24 horas. Assim, o extrato é transferido para um tubo cônico com meio RPMI 1640, 20% de SFB e aditivos, seguido de centrifugação a 1200rpm por 10 minutos. O sobrenadante é descartado e o *pellet* lavado com HEPES. As células recuperadas serão ressuspensas em meio DMEM aditivado e plaqueadas.

As células-tronco límbicas foram descongeladas, mas não houve adesão celular e nem a observação do aspecto fibroblastóide esperado.

Foi processada uma amostra de córnea, enviada pela UNICAMP, para extração de novas células-tronco límbicas. A córnea foi lavada três vezes com solução fisiológica para o processamento. Posteriormente, ¼ da córnea foi colocado em um frasco 25cm² com 200 µL de meio de cultura aditivado e com gentamicina e ciprofloxacino. O restante foi fragmentado em pedaços menores e colocados em placas. Também, foi adicionado meio de cultura suficiente para que o tecido não desgrudasse da placa.

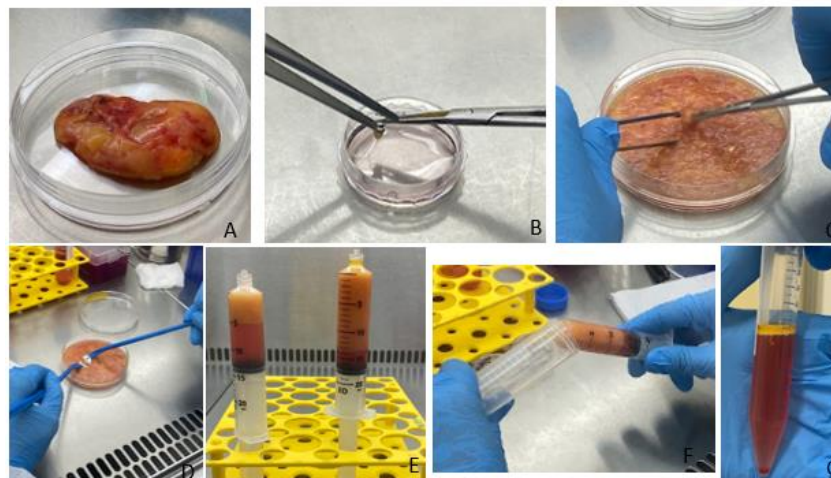
Figura 4: Processamento da córnea

Legenda: Em A, observa-se a imagem da córnea antes do processamento. Em B, tem-se o início da fragmentação da córnea. Em C, os explantes fragmentados em placas de cultura. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

4.4 Células-tronco de tecido adiposo

As células-tronco mesenquimais de tecido adiposo foram isoladas a partir da dissociação mecânica de uma amostra de gordura doada ao laboratório. O tecido foi lavado com soro fisiológico e foi fragmentando com o auxílio de uma tesoura. Posteriormente, com cell scraper, a gordura foi “empurrada” para a liberação das células na placa de petri. Adicionou-se meio de cultura e com uma seringa, foi retirada a amostra. As seringas permaneceram em pé durante 25 minutos para a sedimentação. A gordura foi colocada em um tubo cônico e os líquidos das duas seringas foram colocados em um tubo cônico de 15mL que foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. A camada de gordura foi retirada com uma ponteira e o *pellet* ressuspenso com meio de cultura e armazenado.

Figura 5: Processamento da gordura para obtenção de células-tronco



Legenda: Em (A) temos a visualização da amostra de gordura doada ao laboratório. Em seguida (B), alguns fragmentos das amostras foram colocados em placas petri com meio de cultura para a obtenção de células por meio de explante. O restante da gordura, foi cortado com uma tesoura (C) e foi empurrada com um cell scraper, para forçar a saída das células na placa (D). Após a adição do meio de cultura, a amostra foi colocada em duas seringas que permaneceram em pé por 25 minutos para a sedimentação da gordura (E). A gordura foi colocada em um tubo cônico (F) e o líquido das duas seringas foram colocados em um tubo cônico de 15 mL que foi centrifugado (G), em que houve a remoção da camada de gordura com uma ponteira e o *pellet* foi ressuspense com meio de cultura. Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

As células-tronco foram cultivadas em meio DMEM F12 com aditivos (antibiótico e antimicótico, l-glutamina, aminoácidos essenciais e aminoácidos não essenciais) e 10% de soro fetal bovino.

4.5 Expansão e cultura das células-tronco

Para o cultivo das células-tronco, as ampolas foram retiradas do *container* de nitrogênio líquido (N₂) e procedida a técnica de descongelamento seguindo os Procedimentos Operacionais Padrão do Laboratório, como pode ser visto na figura abaixo(40).

Figura 6: Fluxograma do procedimento de expansão e cultura celular das células-

tronco



Legenda: Para a expansão celular, foi descongelada uma ampola de células que estava criopreservada no laboratório. As células foram colocadas em meio HEPES e centrifugadas para a ressuspensão do *pellet* formado. As células foram plaqueadas em frasco de cultura com meio DMEM F-12 aditivado e 20% de SFB. Fonte: Arquivo Pessoal, 2023

Em um tubo cônico de 15mL, foi adicionado 10mL de tampão HEPES, um meio de transporte ao qual, adicionou-se o conteúdo da ampola criopreservada e descongelada em banho-maria a 37°C, apenas para que o bloco de gelo se desprendesse da ampola. O tubo cônico foi centrifugado a 900g por 10 minutos, com *brake* ajustado para moderado. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado no meio de cultura escolhido.

O meio de cultura escolhido para o cultivo das células em estudo é o DMEM, sem *phenol red*, suplementado com soro fetal bovino, L-glutamina, aminoácidos essenciais e não essenciais e antibiótico-antimicóticos, denominado como anti-anti. No primeiro momento, foi utilizado 20% de SFB para a expansão celular, após a adesão das células e melhor confluência, passou a utilizar 20% de SFB.

Inicialmente as células foram cultivadas em frascos T-25cm² *Tissue-Treated* e observadas por microscopia invertida, usando o equipamento Axiovert 200 Zeiss™. A observação diária é orientativa da adesão celular, se as células estão adquirindo o aspecto desejado, fibroblastóide e, também, para a confluência celular, ou seja, da determinação do percentual de célula que ocupa o espaço da cultura. A determinação da confluência é um aspecto relevante na cultura de células primárias, pois estas células possuem ativamente o fenômeno determinado de inibição por contato, que as células neoplásicas, as linhagens, perdem. Isto significa dizer, que ao confluírem muito no mesmo espaço, naturalmente estas células

retraem os filopódios, assumem a forma esférica (que ocupa menos espaço), e se desdiferenciam em células que requerem pouco meio de cultura. Ao atingirem o máximo de crescimento, se a área não for aumentada, morrem em apoptose.

Em função disto, ao atingirem 70% de confluência, as células sofreram ação da enzima tripsina-EDTA, para se desprenderem do frasco e realizar a contagem e a viabilidade celular para se processar a caracterização por citometria de fluxo. Após a caracterização das células por citometria de fluxo, as CTM_{CUP}, CTM_{TA} e CT_{PD} foram cultivadas para produzirem o meio condicionado.

4.5.1 *Coating* de fibrina para cultura de CT_L

Durante o descongelamento das CT_L observou-se que as células, ao serem descongeladas, aderiam ao plástico, porém não apresentavam a característica fibroblastóide esperada. Como solução, foi feito um *coating* com plasma humano e trombina, nos poços da placa de 24 *wells* e a placa permaneceu aberta dentro da cabine de fluxo laminar Classe II-A, durante 24 horas para secagem, para posteriormente cultivar as CT_L e realizar o *wound healing assay*. A literatura aponta a necessidade de se fazer *coating* com fibrina ou cultura com células 3T3 para o bom desenvolvimento das células-tronco límbicas(50).

Após a cultura de CT_L, a próxima etapa seria os ensaios de *wound healing*, realizados em triplicata. A placa foi dividida de modo que uma coluna corresponderia ao controle, ou seja, coluna quem as células seriam mantidas com o meio padrão ouro. Nos poços restantes, as células sofreriam estresse osmótico, recebendo meio hiperosmolar (420 mOsm) por 48 horas, simulando a doença do olho seco. Após esse período, a técnica do *wound healing* seria realizada e a coluna determinada CL receberia o meio padrão ouro, a coluna denominada MH continuaria a receber o meio hiperosmolar, enquanto as colunas restantes receberiam os meios condicionados produzidos ou o soro alogênico.

4.5.2 Preparo Placa de cultura para irradiação de CTM_{TA}

Devido à dificuldade de expandir as CT_L, buscou-se uma alternativa na literatura que consiste no cultivo dessas células em CTM_{TA} irradiadas, como alternativa ao *coating* de fibrina. Após as células atingirem 100% de confluência, foi adicionado meio DMEM-F12 até atingir a borda da placa de cultura. A placa foi embalada em papel alumínio e levada à Radioterapia do Hospital das Clínicas de Botucatu.

Quadro 2: Dados do equipamento de radiação

Aparelho	Alcyon
Campo Equivalente	30,0
Profundidade (cm)	1,25
Distância SSD	70
Dose (cGy)	6000
Bandeja	Sem bandeja

PDP (%)	97,13
Rendimento (cGy/min)	39,15
Fator de Campo	1,1240
Fator de Bandeja	1,000
Tempo (min)	140,37

Após 140 minutos de irradiação, as células foram levadas para o laboratório, tripsinizadas e congeladas para futuro uso.

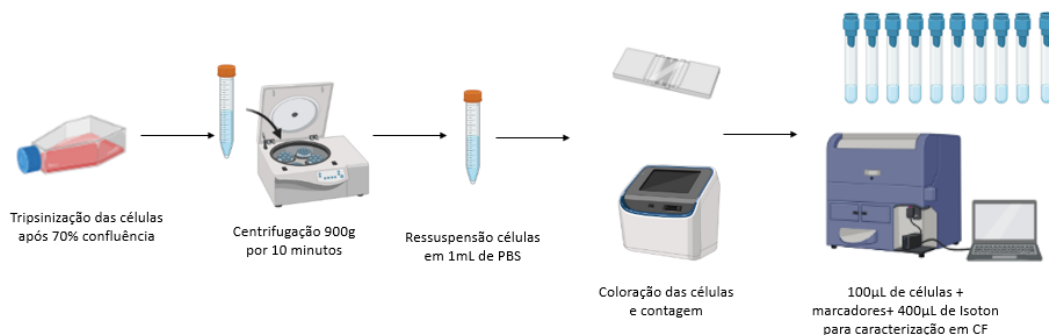
4.6 Caracterização fenotípica das células-tronco

O perfil de marcadores de superfície das células-tronco mesenquimais é estabelecido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) (28). Segundo

recomendações da SITC o ideal é a escolha de dois marcadores, CDs (*Cluster of differentiation*) que sejam negativos e três que sejam reagentes ou positivos. Desta forma, estabeleceu-se que para CTM_{cup} os CDs positivos foram: CD13 (marcador de adesão) e CD90, CD73 e CD105 como marcadores mesenquimais. Para a marcação de antígeno leucocitário humano classe I foi utilizado usado CD HLA-ABC. Como marcadores negativos a escolheu-se pelo CD34, CD45 e MHC Classe II- (HLA-DR). O mesmo painel foi utilizado para CT_L e CTM_{TA} (28,41–46)

Após sofrerem a ação da tripsina-EDTA, as células foram contadas para analisar a viabilidade das células e morte celular, ou seja, analisar a quantidade de células que estão vivas ou mortas em relação à quantidade total de células. A partir de uma alíquota, fez-se uma diluição em Azul de Tripán, marca da Invitrogen® para determinar as células viáveis, assim, se a célula estiver viável, o corante não passará pela membrana celular, então a célula não apresentará coloração azul, o oposto acontece caso a célula não esteja viável. A contagem foi feita utilizando a câmara de Neubauer, para se ajustar a concentração de 1×10^6 células/mL para o processamento das citometria de fluxo, Figura 7. Foi utilizado equipamento de citometria FACSCalibur da BD™. A reação positiva e ou negativa é analisada pelo *Software Cell Quest Pro™* e foram analisados o número de eventos (células), a fluorescência por *gating* (mapeamento das células de interesse), tendo então a média de intensidade de fluorescência (mif) em porcentagem. Os gráficos foram gerados na forma de histograma ou *dot plot*.

Figura 7: Procedimento para o preparo das amostras para Citometria de Fluxo



Legenda: As células sofreram ação da enzima tripsina após atingirem 70% de confluência. Após a

ação das enzimas, as células assumem formato esférico e ficam suspensas no meio de cultura. As células foram colocadas em tubo cônico e centrifugadas para a formação do *pellet* que foi ressuspenso com PBS. Após a contagem celular, foram colocadas 10^6 células com cada marcador e tampão, para leitura no equipamento. Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

4.7 Obtenção do Meio condicionado de CTM_{CUP}, CTM-TA e CT_L

Após a caracterização imunofenotípica e a determinação do índice de apoptose por citometria de fluxo, as CTM_{CUP}, CTM_{TA} e CTM_{PD} foram cultivadas e expandidas em frasco T-150cm² *Tissue Treated* com meio DMEM aditivado com 10% de SFB até atingirem a confluência ideal de 70% para a produção do meio condicionado.

Nesta etapa, o meio de cultura padrão ouro foi removido e o frasco foi lavado sucessivamente (mínimo três vezes) com PBS para posteriormente ser colocado o meio específico para a produção. Essa é uma importante etapa, denominada *wash out* em que ocorre a retirada de qualquer resquício de SFB. Assim, as células receberam o meio de cultura DMEM-F12 aditivado *xeno free*, ou seja, sem SFB. Ao observar que as células atingiram 90-95% de confluência é o momento de interromper a produção do MC, neste caso, com 48 horas. Este dado é importante, pois a partir do momento em que as células atingem 100% de confluência, começa a ocorrer a sinalização de morte e estes sinalizadores podem ficar presentes no MC, fato este indesejável. A sinalização de morte, indesejável corresponde ao efeito autócrino das células, ou seja, de produzir moléculas com efeito sobre elas mesmas.

O sobrenadante das células-tronco, quando a cultura atingir a confluência esperada, corresponde ao meio condicionado ou secretoma da célula-tronco, ou seja, um produto da ação parácrina das células. Hoje é amplamente aceito que os principais benefícios da terapia com CTM são derivados dos efeitos de fatores secretados que atuam nas células vizinhas por meio de um fenômeno parácrino. A diversidade nos fatores secretados que constituem o secretoma foi descrita e fatores-chave foram identificados, como VEGF, HGF, IGF-1, SDF1 α , TGF- β entre outros. Esses mediadores estimulam a angiogênese, inibem a apoptose ou modulam as vias

inflamatórias, exatamente o que a DOS necessita. (47)

4.8 Análise de toxicidade do MC utilizando Monocyte *Monolayer Assay* (MMA)

Diferentes técnicas são listadas para os estudos toxicológicos de exossomos de CTM e meio condicionado, de acordo com as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e ANVISA, como sensibilização cutânea (OECD TG 442B), fotossensibilização (OECD TG 432), irritação ocular (OECD TG 437), irritação cutânea (OECD TG 439) e toxicidade oral aguda (OCDE TG 423), no entanto, todos estes testes são extremamente laboriosos e difíceis de serem executados. Diante disto, foi elencado na literatura o ensaio de monócitos em monocamada. (48,49)

O teste Ficoll foi realizado para verificar a presença de endotoxinas nos meios condicionados produzidos. O teste é verificado a partir da viabilidade celular antes e após o contato com os meios condicionados, se a viabilidade celular diminuir de forma significativa, há presença de endotoxinas, pois estas causaram morte celular, caso contrário, se não diminuir a viabilidade celular, os meios não contêm endotoxinas e podem ser utilizados nos testes *in vitro*.

Foi coletado 10mL de sangue periférico com anticoagulante e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (soro/plasma) foi desprezado até sobrar 1mL de líquido sobre as hemácias. Foi adicionado um volume do sobrenadante para três volumes de meio HEPES. Em dois tubos cônicos foram adicionados 5mL de ficoll densidade 1077 com 10mL do sangue diluído, delicadamente pela parede do tubo para não misturar com o ficoll. Os tubos foram centrifugados a 1500rpm por 30 minutos, sem a utilização de freio. O sobrenadante foi desprezado e a camada linfomononuclear (*buffy coat*) foi recuperada, sendo transferida para um tubo cônico e centrifugada a 1500rpm por 10 minutos para recuperar o pellet. O pellet foi ressuspenso com 1mL de HEPES. Em um tubo de hemólise, foi colocado 10 μ L da suspensão e feita a diluição 1:10 em azul de Tripán para verificar a viabilidade celular (controle).

Adicionou-se 500 μ L de cada meio condicionado com 9×10^4 células em

placa de cultura e armazenados na estufa a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada a contagem celular de cada poço.

4.9 Caracterização do meio condicionado com dosagem de citocinas e fatores de crescimento

O volume de meio condicionado obtido para cada célula-tronco foi de 60 mL. Os meios condicionados foram submetidos a uma centrifugação a 900g durante 10 minutos, utilizando a centrífuga Fisher Scientific Eppendorf™ 581R Centrifuge Bundle with S-4-104 Model Rotor para a eliminação de debris celulares presentes no meio. O material foi aliqotado em tubo criogênico e congelados a -80°C.

A caracterização dos meios condicionados produzidos foi realizada utilizando o kit Human Cytokine A Premixed Magnetic Luminex Performance Assay, adquirido pela R&D Systems, sendo o código FCSTM03-11, sistema Multiplex, que permite a análise, simultaneamente, de vários biomarcadores de citocinas e quimiocinas. Os fatores dosados foram EGF, Eotaxin/ CCL11, IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8/ CXCL8, IL9, FGF-2/ FGF-basic, IFN α , VEGF, IFN γ , MCP-1/ CCL2 e TNF α .

O *kit Luminex® Performance Assay* é utilizado para analisar simultaneamente os níveis de múltiplas citocinas de uma única amostra. As citocinas são proteínas de sinalização liberadas pelas células e desempenham função na regulação do crescimento e da proliferação celular, assim também, na modulação da resposta do hospedeiro perante a infecção, lesão e inflamação. Os anticorpos específicos do analito são pré-revestidos em micropartículas magnéticas incorporadas com fluoróforos em proporções definidas para cada região única de micropartículas. As micropartículas, soluções padrões e amostras são pipetadas em poços e os anticorpos imobilizados ligam-se aos analitos de interesse. Após a lavagem de quaisquer substâncias não ligadas, um coquetel de anticorpos biotinilados específico para os analitos de interesse é adicionado a cada poço. Após uma lavagem para remover qualquer anticorpo biotinilado não ligado, o conjugado

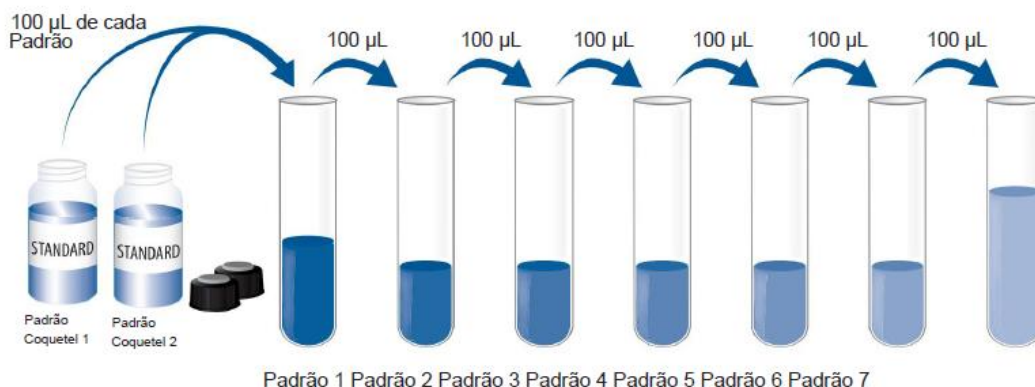
estreptavidina-ficoeritrina (estreptavidina-PE), que se liga ao anticorpo biotinizado, é adicionado a cada poço. As lavagens finais removem a estreptavidina-PE não ligada, as micropartículas são ressuspensas em tampão e lidas usando o MAGPIX®(51).

Um ímã no analisador captura e mantém as micropartículas superparamagnéticas em uma monocamada. Dois diodos emissores de luz (LEDs) espectralmente distintos iluminam as micropartículas. Um LED excita os corantes dentro de cada micropartícula para identificar a região e o segundo LED excita o PE para medir a quantidade de analito ligado a micropartícula. Uma amostra de cada poço é fotografada com uma câmera CCD com um conjunto de filtros para diferenciar os níveis de excitação.

Análise com Luminex® 100/200™, FLEXMAP 3D®, xMAP INTELLI-FLEX® ou Bio-Rad® Bio-Plex® usa um laser para excitar os corantes dentro de cada micropartícula para identificar a região da micropartícula e o segundo laser para excitar o PE para medir a quantidade de analito ligado a micropartícula. Toda a excitação emitida à medida que cada micropartícula passa pela célula de fluxo é então analisada para diferenciar os níveis de excitação usando um tubo fotomultiplicador (PMT) e um fotodiodo Avalanche.

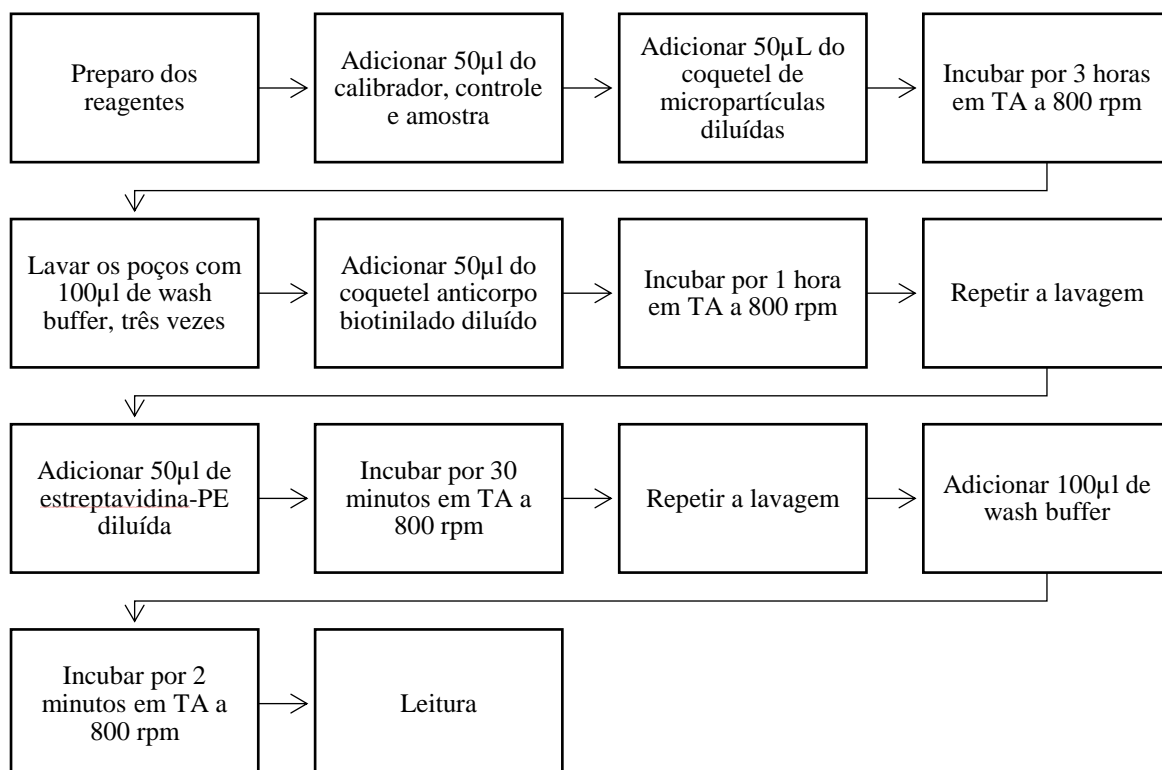
No preparo dos reagentes, 20mL de *wash buffer concentrate* foi diluído em 480mL de água destilada, preparando 500mL de *wash buffer*. O diluente do calibrador RD5K foi diluído (1:2) em que adicionou 20mL do concentrado do diluente do calibrador em 20mL de água destilada. Foram reconstituídos os coquetéis padrão 1 e 2 com RD5K e agitados no *shaker* durante 15 minutos, que foram utilizados no preparo das curvas padrões de leitura, conforme a figura abaixo. O calibrador do diluente foi utilizado como branco para leitura.

Figura 8: Diluição em série para preparo das curvas padrões



Legenda: Para o preparo da curva padrão, os coquetéis 1 e 2 foram reconstituídos, 300µL do calibrador foi adicionado no tubo “Padrão 1” e 200 µL foi adicionado nos demais tubos, nomeados de S1-S8. Posteriormente, 100µL de cada coquetel reconstituído (1 e 2) foi adicionado no primeiro tubo. O tubo “padrão 1” foi usado para fazer a diluição em série.

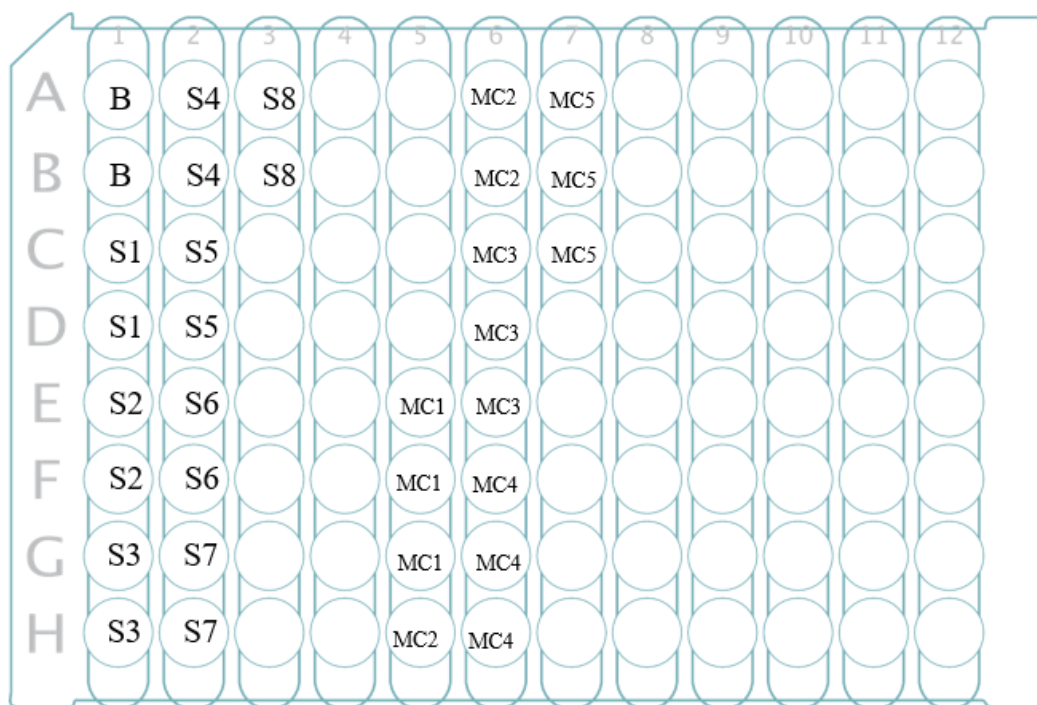
Figura 9: Fluxograma do preparo da placa do kit Luminex



Fonte: Arquivo Pessoal, 2023

As placas foram preparadas de modo que, as primeiras colunas corresponderiam ao branco e as curvas padrões, em duplicata, e as colunas seguintes iriam receber as amostras em triplicata, ou seja, os meios condicionados produzidos para o projeto. A disposição das placas pode ser observada na figura abaixo.

Figura 10: Disposição das amostras nas placas de 96 poços para caracterização das amostras de meio condicionado



Legenda: B: branco; S1-S8: curvas padrões diluídas; MC1: MC-CTM_{cup}; MC2: MC-CTM_{TA}; MC3: MC-CTM_{PD}; MC4: MC-CTL1; MC5: MC-CTL2. Fonte: Arquivo Pessoal, 2023

A placa foi preparada seguindo o passo a passo da bula fornecida pela empresa, em que se fez o preparo de todos os reagentes, seguida pelas incubações e lavagens necessárias. As lavagens foram feitas utilizando o equipamento Bio-Plex Pro™ II Wash Station da BIO-RAD e a leitura foi realizada pelo Bio-Plex™ 200 System da BIO-RAD.

Figura 11: Reagentes e equipamentos usados para a caracterização dos meios condicionados



Legenda: *Wash buffer concentrate* utilizado para o preparo do tampão de lavagem (A); Diluente do calibrador RD5K (B) utilizado como branco e para reconstituir o coquetel padrão 1 e 2 (C); diluente de micropartícula e o coquetel de micropartículas utilizados na primeira incubação (D); anticorpo de Biotina e diluente do anticorpo de biotina usados na segunda incubação (E); Estreptavidina-PE concentrada que foi diluída com *wash buffer* (F); placa de 96 poços com as amostras e coberta durante incubação (G); equipamento para fazer a lavagem da placa três vezes (H); equipamento de leitura da placa (I). Fonte: Arquivo Pessoal, 2023

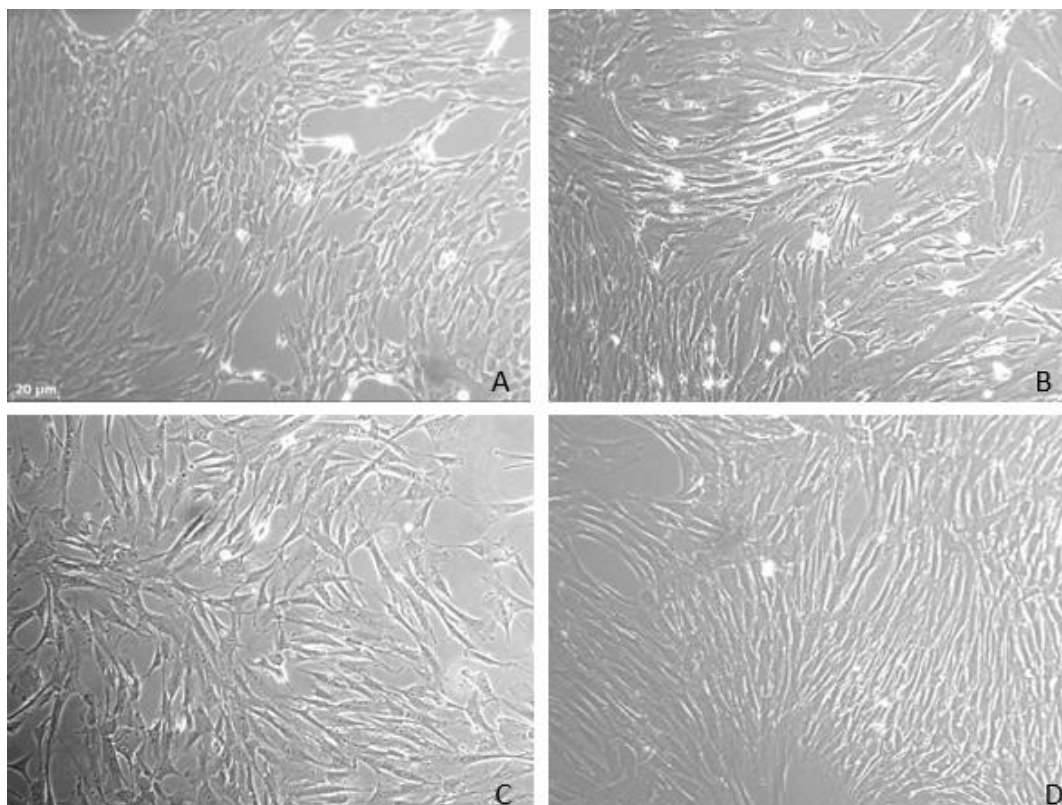
5 Resultados e Discussão

No Projeto para JP de Centros Emergentes toda a parte correspondendo à Cultura Celular e produção de meio condicionado foi de responsabilidade do LBA/BioCel-UNESP. Em todos os processos vinculados, a preocupação com a ética, o respeito e a conformidade com a Declaração de Helsinque/Finlândia foram cumpridos(52).

Após a revisão no banco de células do laboratório, foram identificadas as ampolas de CTMcup, CTL e CTMPD criopreservadas de projetos anteriores. As células foram descongeladas seguindo o protocolo descrito no capítulo de Material e Métodos e expandidas em cultura celular para os procedimentos de caracterização, produção do meio condicionado. Para as amostras das células descongeladas, cujo processo de expansão em cultura em monocamada confirmando as características

esperadas para uma célula-tronco mesenquimal, ou seja: 1) aderentes ao plástico e aspecto morfológico apresentando prolongamentos fibroblastóides. Como somente estas características não são suficientes, destaca-se que no projeto original estas células comprovaram se diferenciar em trilhaagem de células originárias do mesoderma: cartilagem (coloração citoquímica Alcian Blue Sigma Aldrich™ para evidenciar deposição de colágeno e núcleos isógenos); osso, corado por Alizarin Red Thermo Fisher™ e para o tecido adiposo foi utilizada a coloração de Oil Red que evidenciam as gotas lipídicas. As fotos da diferenciação em trilhaagem são do acervo do LBA/BioCel no projeto anterior.

Figura 12: Fotomicrografias da cultura celular das células-tronco

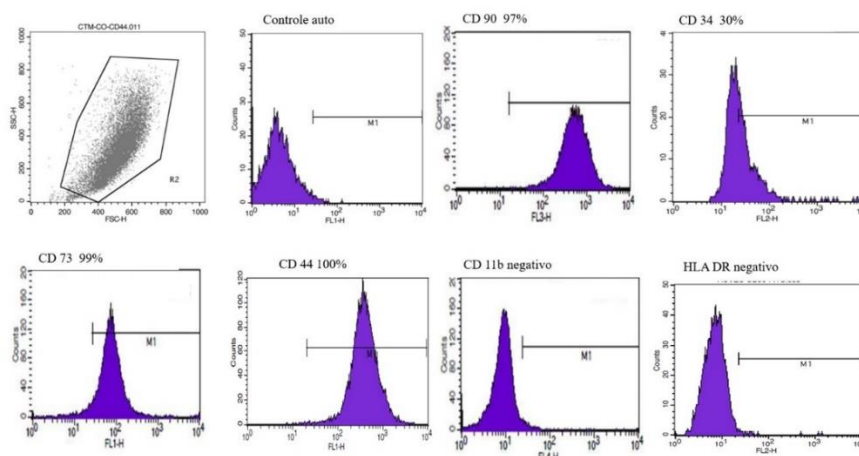


Legenda: Microfotografias de células-tronco de tecido adiposo (A), células-tronco límbicas, células-tronco de cordão umbilical e placentário (C) e células-tronco polpa dentária (D). Arquivo pessoal, 2023

5.1 Citometria de fluxo

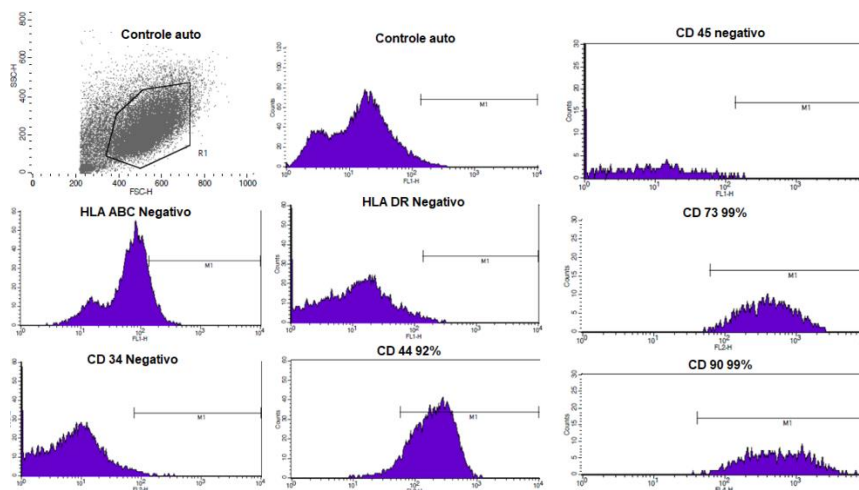
Após a expansão celular, foi seguido o protocolo descrito no Material e Métodos para a caracterização em citometria de fluxo. As Figuras 13 e 14 mostram o resultado da imunofenotipagem das CTM_{cup} e das CTM_{TA}. Em projetos anteriores, foi realizada a citometria de fluxo das demais células.

Figura 13: Análise de Citometria de Fluxo de CTM_{cup}, com diferentes marcadores (CDs) com expressão positiva e negativa



Fonte: acervo do LBA/BioCel, 2021

Figura 14: Análise de Citometria de Fluxo de CTM_{TA}, com diferentes marcadores (CDs) com expressão positiva e negativa



Fonte: Arquivo Pessoal, 2023

Quadro 3: Resultados obtidos na caracterização das células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo

Amostra	CTM_{CUP}	CTM_{TA}
Controle Auto	1,75	1,68
CD 11b	0,78	NR
CD 34	30	1,74
CD 44	100	92,9
CD 45	NR	0,86
CD 73	99	99,08
CD 90	97	99,41
HLA DR	1,2	1,38
HLA ABC	NR	11,33

Legenda: NR (Não realizado)

Fonte: *Acervo do LBA/BioCel e arquivo pessoal, 2023

O CD11b é um marcador negativo clássico para CTM, descrito na literatura especializada. Ele reconhece fundamentalmente uma integrina α expressa em monócitos e *natural killer*(53).

O CD34 é um marcador para progenitor hematopoiético, endotélio e fibroblastos, com maior expressão nas células saudáveis obtidas do cordão umbilical (54).

O marcador CD44 é expresso em leucócitos, células epiteliais, hemácias e fracamente em plaquetas, então temos resultado, negativo, conforme esperado, assim como ocorre para o marcador CD73, expresso em linfócitos T e B, células dendríticas, células epiteliais e endoteliais (55). O CD90 é um marcador positivo para célula-tronco mesenquimal, célula-tronco de cordão e fibroblasto. Então, era esperado dar positivo para essas células, tendo 100% de intensidade (56).

O HLA classe II é um marcador positivo para células B, dendríticas, monócito, macrófago e célula T ativada. Nesse caso, a literatura indica como marcador classicamente negativo em função das propriedades imunomoduladoras das CTM. Como as células descontaminadas expressavam marcadores granulo-

macrofágicos, esperava-se que o HLA DR, nestas amostras fosse positivo.

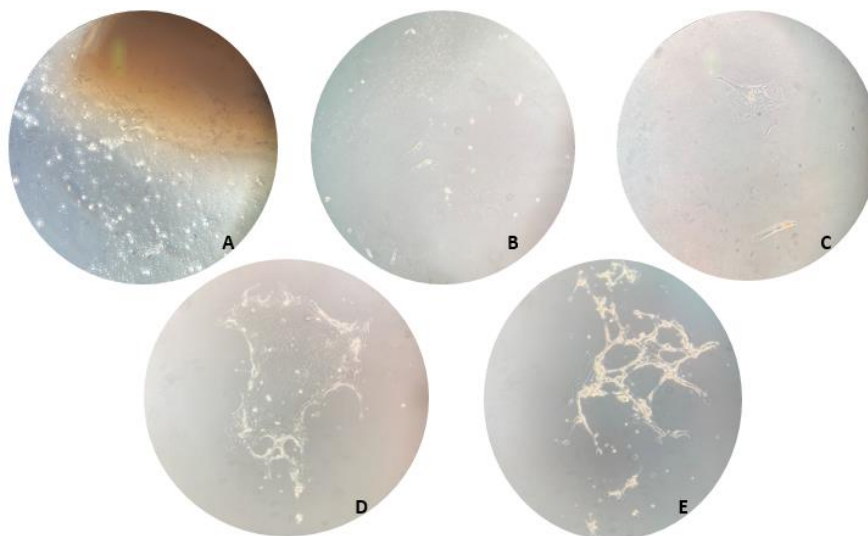
Após a caracterização em CF, as células foram utilizadas para serem expandidas em frasco de T-75cm² até atingirem confluência suficiente para o subcultivos em frasco de T-150cm². Quando foram tripsinizadas, uma parte das células foi congelada e a outra replaqueada no frasco de T-150cm² para a produção do MC *xeno free*.

5.2 Obtenção da CTL

Após o processamento da córnea, as placas foram observadas diariamente para verificar adesão celular. Foi observada a presença de células, mas apenas adesão no frasco T-25 cm², possivelmente pelo tratamento da superfície das placas individuais ser inferior ao do frasco, podendo influenciar na adesão celular. As células estavam saindo em grumos (*clusters*) e foi observada a presença de células epiteliais.

Tanto os frascos quanto as placas apresentavam sujeira em seu fundo e presença de cocos vivos. Os sobrenadantes foram colhidos e colocados em tubos cônicos de 15mL para centrifugação e ressuspensão do *pellet* para contagem celular. Foi difícil a observação do *pellet* e na câmara de Neubauer foi notada pequena quantidade de células. Os sobrenadantes foram distribuídos para uma placa de 6 poços e completado com meio. Notou-se que as células estavam se multiplicando, mas não havia adesão.

Figura 15: Microfotografias durante extração de células-tronco límbicas

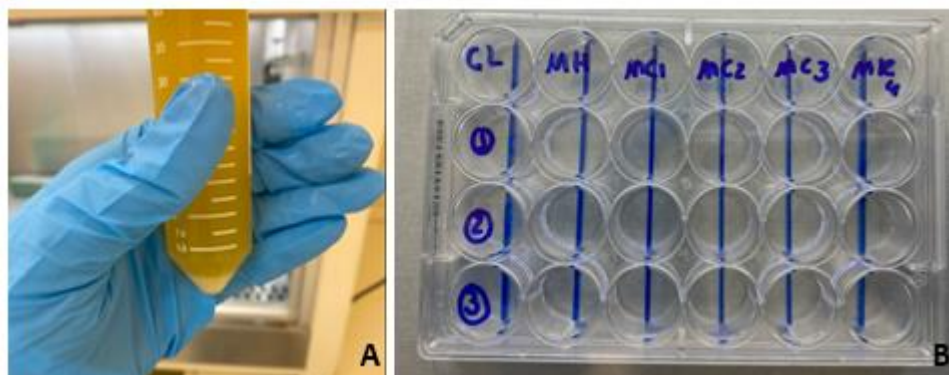


Legenda: Microscopia invertida em A, temos o explante com a saída de células para a região mais vazia. De B até E, temos diferentes etapas da cultura, temos adesão celular e autofagia celular, restando apenas arcabouço de colágeno, cuja cultura não evoluía. Isso pode ocorrer devido à idade do doador, o conservante da amostra e o tempo em que essa amostra estava conservada até ser processada. Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

5.2.1 Coating de cola de fibrina para wound healing

Foi identificado tubo cônico contendo Plasma Fresco Congelado no freezer do laboratório, que foi utilizado para a produção do *coating*. O PFC foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para retirada de *debri*. O plasma foi adicionado nos poços de cultura e posteriormente, a trombina. Após 24 horas, tempo para o *coating* gelificar, uma ampola foi descongelada seguindo o procedimento padrão e as células foram plaqueadas nos poços da placa, sendo mantidos com meio de cultura DMEM-F12 aditivado e 20% SFB.

Figura 16: Procedimento produção do *coating*



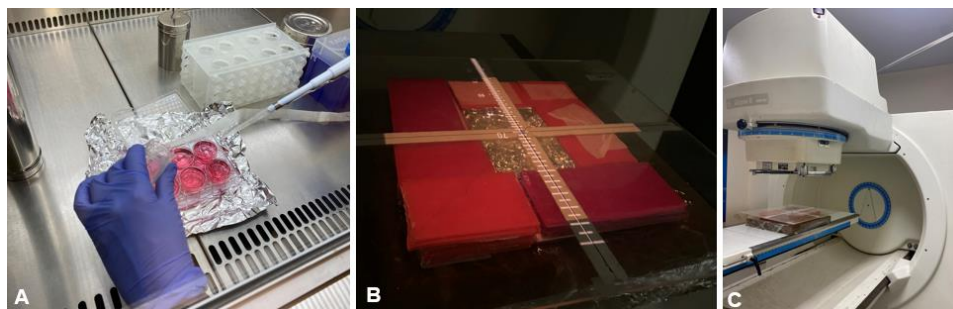
Legenda: Em A, tubo cônico mostrando o *pellet* formado após a centrifugação. Em seguida (B), a placa de 24 poços com o *coating*. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Após três dias de cultura, observou-se que as células aderiram ao plástico, porém não apresentavam a característica fibroblastóide esperada. A próxima etapa seria o teste *in vitro* dos meios condicionados utilizando a técnica do *wound healing*, mas pela dificuldade de obter cultura de CTL, a realização da técnica não foi possível.

5.2.1 Irradiação das CTM_{TA}

As células-tronco que estavam em expansão celular foram passadas para uma placa de seis poços para serem irradiadas. Após atingirem 100% de confluência, foi adicionado meio de cultura DMEM-F12 até a borda dos poços de cultura. A placa foi envolvida em papel alumínio e levada à Radioterapia. Foram colocadas ceras em volta da placa de cultura para que a dose seja distribuída pela placa de forma homogênea.

Figura 17: Preparo da placa para irradiação



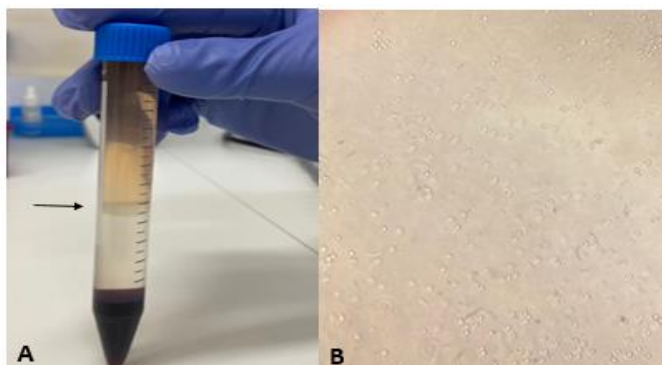
Legenda: Adição do meio de cultura nos poços contendo as células-tronco (A); Placa com as ceras em volta da placa (B); placa posicionada no equipamento para receber a dose de radiação (C). Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

Após a irradiação, as células foram congeladas para posterior uso. Porém, como não foi possível obter a adesão e proliferação de nenhum exemplar criopreservado de célula-tronco límbica, as células-tronco de tecido adiposo irradiadas (CTM_{Tai}) permaneceram criopreservadas no Biorrepositório/Biobanco do laboratório.

5.3 Análise teste *Monocyte Monolayer Assay* (MMA)

Foi realizado o teste Ficoll para garantir que não há presença de endotoxinas nos meios condicionados produzidos para ser realizado o teste *in vitro*. É necessário verificar a viabilidade celular antes e após o contato com os meios condicionados. A viabilidade celular pode ser feita por teste de anexina V e iodeto de propídio, por contagem celular e outras técnicas. Para a realização do teste, foi escolhida a contagem celular.

Figura 18: Fotografia do procedimento do teste Ficoll



Legenda: A primeira figura mostra as fases formadas após a centrifugação do tubo cônico, em que se tem meio HEPES, a camada linfomononuclear (indicada pela seta), Ficoll e sangue. Retirou-se a camada linfomononuclear que foi centrifugada. O *pellet* formado foi ressuspenso com HEPES e foi realizada a contagem celular para verificar a viabilidade celular. As células foram colocadas em contato com os meios condicionados durante 30 minutos (B). Posteriormente, foi verificada a viabilidade celular dessas células. Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Quadro 4: Resultado da viabilidade das células antes e após contato com os meios condicionados

Amostra	Viabilidade (%)
Controle (pré)	93,48
MC CTM _{PD}	90,9
MC CT _{L02}	96,43
MC CT _L	90
MC CTM _{CUP}	96,55

Fonte: Arquivo Pessoal, 2023

Com o teste, foi possível observar que não houve alteração significativa na viabilidade celular, assim, pode-se concluir que os meios condicionados não estavam contaminados com endotoxinas.

5.4 Caracterização do MC

Foi adquirido painel de dosagens dos fatores definidos no projeto pelo sistema Luminex™, de custo elevado, com número exato de procedimentos. A execução do ensaio requer habilidades técnicas e precisão, durante a realização dos

testes, houve erro humano que implicou na não adição das micropartículas na placa, comprometendo o delineamento inicial. Com menor número de parâmetros disponíveis, optou-se por repetir o experimento, apenas com as determinações dos meios condicionados, branco e curva em duplicata. Para todos os parâmetros foram construídas as curvas padrão que podem ser observadas no Anexo. Para facilitar a compreensão dos dados, os valores digitados à direita em cada coluna, estão dentro dos valores esperados e projetados pela curva padrão/método. Os valores que estão à esquerda precedidos de um asterisco são aqueles denominados “fora da curva” ou muito baixos, ou muito altos, mas que o sistema ainda calculou a concentração enquanto a denominação OOR< (*out of range*) se refere aos valores que estavam muito abaixo do menor valor previsto para esta tecnologia (1 picograma/ml). Os dados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Dosagem de diferentes fatores de crescimento e citocinas pelo sistema Luminex™

Analito	MCP1	FGF	IFN- γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-1RA	IL-2	IL-6	IL-8	TNF- α	VEGF
MC-MA pool	69,95	*1.71	12,14	*1.54	OOOR <	8,94	15,91	233,53	197,17	*0.73	OOOR <
MC-CTMCUP	1,09	10,06	12,14	*2.48	*0.29	OOOR <	20,82	*3.21	OOOR >	*1.34	380,84
MC-MCTMTA	5,22	6,23	8,46	*0.27	OOOR <	OOOR <	20,91	63,14	31,29	*0.28	243,11
MC-CTMPD	96,81	5,65	9,42	*0.72	OOOR <	OOOR <	19,09	19,26	16,88	*0.09	124,67
MC-CTL1	*2480.19	18,6	18,64	11,23	4,13	66,89	36,44	*19457.45	OOOR >	5,69	308,85
MC-CTL2	*817.94	31,89	15,5	7,44	*1.68	40,19	35,97	365,63	*3130.91	*3.00	543,11
MC-CTL3	*2507.57	OOOR <	12,14	4,78	*0.42	21,56	43,9	2231,09	667,16	*3.14	1319,41
MC-MA pool	77,61	2,77	18,64	*1.92	OOOR <	9,41	15,4	245,71	215,16	*0.93	OOOR <
MC-MA pool	62,42	OOOR <	4,16	*1.14	OOOR <	8,45	16,42	221,3	179,38	*0.54	OOOR <
MC-CTMCUP	1,09	10,48	12,14	*2.67	*0.29	OOOR <	21,07	*3.21	*32575.36	*1.20	382,44
MC-CTMCUP	1,09	9,64	12,14	*2.30	*0.29	OOOR <	20,58	*3.21	OOOR >	*1.47	379,24
MC-MCTMTA	5,15	5,65	8,46	OOOR <	OOOR <	OOOR <	17,42	58,55	30,4	*0.41	236,52
MC-MCTMTA	5,29	6,78	8,46	*1.14	OOOR <	OOOR <	24,32	67,68	32,19	*0.15	249,69
MC-CTMPD	94,2	5,04	10,35	*1.14	OOOR <	OOOR <	19,42	18,79	13,26	OOOR <	119,22
MC-CTMPD	99,44	6,23	8,46	*0.27	OOOR <	OOOR <	18,76	19,72	20,58	*0.41	130,12
MC-CTL1	*2550.51	17,41	18,64	12,46	4,53	100,86	35,97	*19279.31	OOOR >	5,41	305,93
MC-CTL1	*2411.48	19,75	18,64	9,99	3,74	29,08	36,9	*19638.39	OOOR >	5,98	311,76
MC-CTL2	*788.72	30,59	12,14	6,79	*1.68	41,55	34,12	343,85	2982,62	*2.58	538,9
MC-CTL2	*847.86	33,17	18,64	8,08	*1.68	38,82	37,82	387,4	*3292.17	*3.42	547,31
MC-CTL3	*2549.65	OOOR <	15,5	4,78	OOOR <	15,23	55,48	2096,93	639,99	*3.14	1301,27
MC-CTL3	*2466.06	OOOR <	8,46	4,78	*0.78	27,26	31,94	2370,56	694,72	*3.14	1337,58

Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

Os ensaios multiplex baseados em esferas alimentados pela tecnologia

Luminex multi-analyte profiling (xMAP) são usados para medir concentrações de vários analitos, anticorpos, quimiocinas, citocinas ou outras proteínas, simultaneamente, e tem ganhado mercado de forma progressiva baseado principalmente na economia de analitos (são usados de 1 a 5 microlitros de amostras) e da maior facilidade de ensaios múltiplos (57,58).

Diante da constatação das inconsistências identificadas no método utilizado analisamos o número de parâmetros, entre as 21 determinações de amostras reais, para referendarmos ou não o uso desta metodologia para análise de citocinas e fatores de crescimento em meio de cultura. Os parâmetros mais estáveis para esta plataforma de determinação foram IFN γ e IL2. A análise de dados gerados por ensaios multiplex pode ser complexa devido à quantidade de informações obtidas simultaneamente para múltiplos marcadores, mas esses ensaios podem apresentar limitações de sensibilidade e especificidade em comparação com os ensaios individuais de cada marcador. Isso pode afetar a capacidade de detectar quantidades muito baixas ou muito altas de biomarcadores nos meios condicionados.

Conforme os resultados da Tabela 1, as dosagens dos fatores dos meios condicionados produzidos pelas células-tronco límbicas são maiores do que os outros meios condicionados, apesar de ter alguns valores abaixo da curva padrão. Considerando que o olho é um ambiente naturalmente hipóxico em comparação aos outros tecidos devido à alta demanda metabólica e baixa vascularização, pode-se sugerir que ao cultivar as células-tronco límbicas em um ambiente com maior oxigenação, pode representar um tipo de estresse para as células, podendo influenciar no aumento na secreção de fatores e citocinas (59).

Tabela 2: Percentual de inconsistências identificadas na análise de diferentes fatores de crescimento, em meio de cultura, utilizando a plataforma Luminex™

	MCP1	FGF	IFN γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-1RA	IL-2	IL-6	IL-8	TNF α	VEGF
Nº de análises (amostras)	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Nº de flags/alertas do equipamento	9	5	0	12	18	9	0	6	3	18	3

% de amostras com problemas	42,85	23,8	0	57,14	85,71	42,85	0	28,57	14,28	85,71	14,28
------------------------------------	-------	------	---	-------	-------	-------	---	-------	-------	-------	-------

Fonte: Arquivo Pessoal, 2023.

Os problemas identificados neste trabalho corroboram aqueles reportados por alguns autores tais como: inconsistências dentro de uma solução de curva padrão pré-misturada; “cauda” de amostras em certas diluições de uma curva padrão; amostras frequentemente fora da curva padrão. As curvas padrão foram produzidas usando os padrões liofilizados pré-misturados contidos nos *kits* de arranjo de esferas de citocinas Th1/Th2. As amostras frequentes fora da curva padrão podem ser devido a não coleta do MC no seu melhor momento ou o tipo de preservação do MC pode ter favorecido a degradação de citocinas ou em determinada situação, a célula-tronco não produz a citocina ou o método de dosagem precisa ser refinado para capturar as concentrações mais baixas da citocina.

Quando o número de *flag* é abaixo de 20%, o resultado pode ser considerado consistente. Pode-se considerar os resultados dos marcadores IFNY, IL2, IL-8 e VEGF. Enquanto os outros marcadores, deverão ser reavaliados.

5.5 Desenvolvimento do *Software*

Em paralelo, deu-se o desenvolvimento do *site* para o registro e administração do banco de células do Laboratório em colaboração com a UFSCAR curso de ciência da computação da unidade de Sorocaba. Optou-se pelo formato de *site* pois é um formato aceito em qualquer aparelho, sendo possível utilizá-lo em computadores, celulares Android e celulares iOS. O fato de ter sido desenvolvido na plataforma hospedeira do Google torna esse serviço confiável e seguro, sendo que dificilmente terá algum problema de queda por exemplo.

Trata-se do que é denominado “sub-serviços” do Google oferecidos na versão básica, que possui limitações de capacidade, e a versão “paga sob demanda”. Tendo em vista a limitação de recursos optou-se inicialmente pela versão gratuita,

mas havendo a possibilidade de migrar para o outro sistema, sob demanda. As informações sobre os planos pagos estão disponíveis no link: <https://firebase.google.com/pricing>. O uso gratuito está incluso no plano pago, portanto só seria cobrado algum valor a partir do momento que a cota gratuita é excedida, por isso o nome "sob demanda". E os valores tendem a ser baixos, caso o excedido também seja pequeno.

O site está hospedado com um domínio oferecido gratuitamente pelo *Firebase*, portanto não tem muitas opções para modificar o endereço *web*. O endereço do site ficou como: bancocelulas.web.app (sem o www). Para acessá-lo é necessário ter uma conta do Google vinculada para se utilizar o *Firebase*. Diante disto foi criada uma conta nova só para esta finalidade. A conta pode ser acessada pelo Email: bancocelulas@gmail.com e senha disponibilizada de forma privada.

Ao entrar no site pela primeira vez, é necessário se cadastrar. Esse cadastro pede nome, email, senha (senha fixa fornecida de forma privada) e uma senha especial para o cadastro do usuário. Essa senha fixa pode ser mudada no painel do *Realtime Database* do *Firebase*. Lá existe uma chave e um valor, chamado de Senha Cadastro e o valor atual é privado (informação dada aos gestores). Para mudar, é só alterar a senha mantendo as aspas. Como por exemplo, "laboratorio2021".

Portanto, para cada pessoa da confiança do gestor, que começará a utilizar o sistema, é necessário ter em mãos esta senha fixa e o site a ela, para que proceda seu cadastramento. Após o cadastro, o usuário terá acesso à tela principal podendo escolher entre pesquisar célula, pesquisar em uma gaveta, inserir uma célula ou remover uma célula. Tem também um botão para fazer o *logout*.

Na tela de pesquisar célula, o usuário pode informar qualquer um dos parâmetros da pesquisa, ou mais de um. Na tela de navegar pelas gavetas, o usuário deve informar o container, o rack e a gaveta que deseja pesquisar. Na tela de inserir célula, o usuário deve informar todos os campos. Na tela de remover célula, o usuário também deve informar todos os campos. Sempre que inserir ou remover, o banco de dados guardará um registro da última alteração, com o nome da pessoa que realizou a alteração, a data e a célula anterior.

A célula anterior será guardada apenas na remoção. Para substituir uma célula, é necessário primeiro deletar a célula e depois inserir uma nova célula na mesma posição. Caso o nome de determinada célula esteja em branco, significa que alguém removeu a célula que estava ali e restou o registro da última alteração. As células removidas aparecerão na pesquisa pela gaveta e na pesquisa por célula, sob os parâmetros de data e por nome de usuário, que modificou por último. Caso uma posição vazia tenha sido ocupada previamente por alguma outra célula, existirá um registro da última célula. Nesse caso, existiam duas abordagens: 1) Ao adicionar nessa posição, é possível manter o registro da última célula válida (não nula) na posição ou 2) Ao adicionar nessa posição, é possível manter o registro de que a última célula na posição era nula. Decidiu-se pela segunda abordagem, mas é possível mudar para a primeira sem grandes problemas.

O registro da última célula na posição serve para saber o que estava ocupando aquela posição por último, como forma de manter um controle maior sobre as operações.

O desenvolvimento do *site* está em fase de registro na Agência Inovadora da UNESP e, futuramente, poderá ser compartilhado com instituições parceiras.

6 Conclusões

No projeto, obteve-se os meios condicionados de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, de cordão umbilical, de polpa dentária e límbica. Em relação à caracterização laboratorial do MC de CTM, pode-se afirmar que as concentrações de e MCP-P1, FGF, IL1- α , IL1-RA, IL2, IL6, IL8, TNF- α e VEGF foram muito maiores em MC de células-tronco límbicas quando comparado com os outros meios produzidos. Pela baixa porcentagem de número de *flags*, pode-se considerar os resultados dos marcadores IFNY, IL2, IL-8 e VEGF, enquanto o restante deverá ser reavaliado, mas acredita-se que o meio condicionado tenha potencial para tratamento da DOS pelas células produzirem fatores de crescimento e citocinas que estimulam regeneração de diferentes tecidos.

Em paralelo ao projeto, foi desenvolvido um site para registro e

gerenciamento do banco de células do Laboratório de Engenharia Celular cuja validação está em curso e seu registro junto à Agência de Inovação da UNESP.

Referências bibliográficas

1. Galperín GJ, Berra M, Marquez MI, Mandaradoni M, Tau J, Berra A. Impact of environmental pollution on the ocular surface of Sjögren's syndrome patients. *Arq Bras Oftalmol*. 2018;81(6):481–9.
2. IBGE. Projeções da população: Brasil e unidades da Federação, revisão 2018. Vol. 40. 2018. 56 p.
3. Tovar AA, Frankel ST, Galor A, Sabater AL. Living with Dry Eye Disease and its Effects on Quality of Life: Patient, Optometrist, and Ophthalmologist Perspectives. Vol. 12, *Ophthalmology and Therapy*. Adis; 2023. p. 2219–26.
4. Bielory BP, Shah SP, O'Brien TP, Perez VL, Bielory L. Emerging therapeutics for ocular surface disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2016;16(5):477–86.
5. Mariscalco G, Biancari F, Juvonen T, Zanobini M, Cottini M, Banach M, et al. Red blood cell transfusion is a determinant of neurological complications

- after cardiac surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2015;20(2):166–71.
6. Villani E, Strologo M Dello, Pichi F, Luccarelli S V., De Cilla S, Serafino M, et al. Dry eye in vernal keratoconjunctivitis. *Medicine (United States).* 2015;94(42):e1648.
 7. Giannaccare G, Scorcio V. False Myths versus Medical Facts: Ten Common Misconceptions Related to Dry Eye Disease. *Biomedicines.* 2020;8(6):172.
 8. Zhang C, Xiao J, Fa L, Jiang F, Jiang H, Zhou L, et al. Advances in the applications of mesenchymal stem cell-conditioned medium in ocular diseases. *Exp Eye Res.* 2023 Aug 1; 233:109560.
 9. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren' s syndrome Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren' s syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;(July 2005):390–5.
 10. Tsubota K, Yokoi N, Shimazaki J, Watanabe H, Dogru M, Yamada M, et al. New Perspectives on Dry Eye Definition and Diagnosis: A Consensus Report by the Asia Dry Eye Society. *Ocular Surface.* 2017;15(1):65–76.
 11. Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial Effect of Artificial Tears Made with Autologous Serum in Patients with Keratoconjunctivitis Sicca. *Arthritis Rheum.* 1984;27(4):459–61.
 12. Dogru M, Kojima T, Simsek C, Tsubota K. Potential Role of Oxidative Stress in Ocular Surface Inflammation and Dry Eye Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2018;59(14):DES163.
 13. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *New England Journal of medicine.* 2017;377(26):2565–79.
 14. Tannan A. EyeWiki. 2021 [cited 2021 May 13]. p. 8 Ocular Graft Versus Host Disease. Available from: https://eyewiki.aao.org/Ocular_Graft_Versus_Host_Disease
 15. Kojima T, Dogru M, Kawashima M, Nakamura S, Tsubota K. Advances in the diagnosis and treatment of dry eye. *Prog Retin Eye Res.* 2020;78(January):100842.

16. Herbaut A, Liang H, Denoyer A, C. Baudouin, A. Labbé. Tear film analysis and evaluation of optical quality: A review of the literature -. *J Fr Ophtalmol*. 2019;21.
17. Xu Y. Spotlight Unveiling the Origin and Transmission of 2019-nCoV. *Trends Microbiol*. 2020; xx(xx):1–2.
18. Mao B, Huang S, Lu X, Sun W, Zhou Y, Pan X, et al. Early Development of Definitive Erythroblasts from Human Pluripotent Stem Cells Defined by Expression of Glycophorin A/CD235a, CD34, and CD36. *Stem Cell Reports*. 2016;7(5):869–83.
19. Martins JRB. Avaliação do desempenho de colírio usando soro alogênico e fatores de crescimento derivados de plaquetas em cultura de células do anel córneo-escleral. 2014.
20. Chaparro E. Soro Autólogo de Uso Ocular: Enfoque em Medicina Personalizada. Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2019.
21. Zhou FF, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. WHO Model List of Essential Medicines - 19th List (April 2015). *Stem Cell Res Ther*. 2020;2(1):1–9.
22. Jabbehdari S, Yazdanpanah G, Kanu LN, Chen E, Kang K, Anwar KN, et al. Therapeutic Effects of Lyophilized Conditioned-Medium Derived from Corneal Mesenchymal Stromal Cells on Corneal Epithelial Wound Healing. *Curr Eye Res*. 2020;45(12):1490–6.
23. Yin J, Kheirkhah A, Dohlman T, Saboo U, Dana R. Reduced Efficacy of Low-dose Topical Steroids in Dry Eye Disease Associated With Graft-versus-Host Disease. *Am J Ophthalmol*. 2018; 190:17–23.
24. Yin S, Ji C, Wu P, Jin C, Qian H. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and exosomes: Bioactive ways of tissue injury repair. *Am J Transl Res*. 2019;11(3):1230–40.
25. Hatayama Y, Matsumoto S, Hamada E, Kojima N, Hara A, Hino N, et al. Analysis of acute transfusion reactions and their occurrence times. *Yonago Acta Med*. 2018;61(1):87–90.
26. Yaghoubi Y, Movassaghpour AA, Zamani M, Talebi M, Mehdizadeh A,

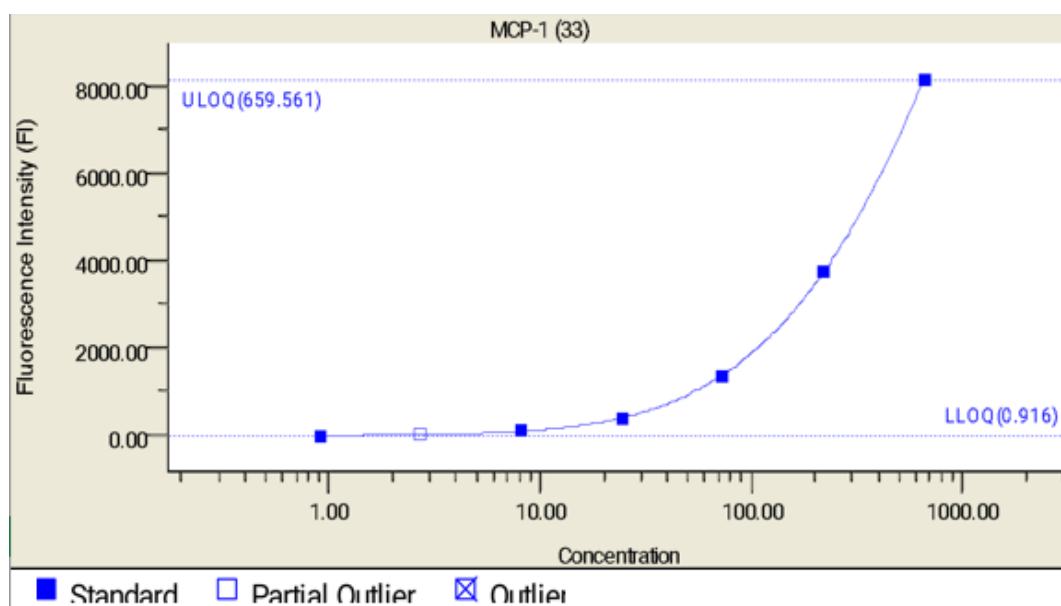
- Yousefi M. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived-exosomes in diseases treatment. *Life Sci.* 2019;233(August).
27. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. Concise review: The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2014;32(6):1408–19.
 28. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
 29. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy.* 2019;21(10):1019–24.
 30. Higuchi A. Autologous Serum and Serum Components. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;(November 2017).
 31. Notara M, Behboudifard S, Kluth MA, Maßlo C, Ganss C, Frank MH, et al. UV light-blocking contact lenses protect against short-term UVB-induced limbal stem cell niche damage and inflammation. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–12.
 32. Notara M, Alatza A, Gilfillan J, Harris AR, Levis HJ, Schrader S, et al. In sickness and in health: Corneal epithelial stem cell biology, pathology and therapy. *Exp Eye Res.* 2010;90(2):188–95.
 33. Honda M, Ohshima H. Biological characteristics of dental pulp stem cells and their potential use in regenerative medicine. *J Oral Biosci.* 2022 Mar 1;64(1):26–36.
 34. Yuan SM, Yang XT, Zhang SY, Tian WD, Yang B. Therapeutic potential of dental pulp stem cells and their derivatives: Insights from basic research toward clinical applications. *World J Stem Cells.* 2022;14(7):435–52.
 35. Chu DT, Phuong TNT, Tien NLB, Tran DK, Minh LB, Thanh V Van, et al. Adipose tissue stem cells for therapy: An update on the progress of isolation, culture, storage, and clinical application. Vol. 8, *Journal of Clinical Medicine.* MDPI; 2019.

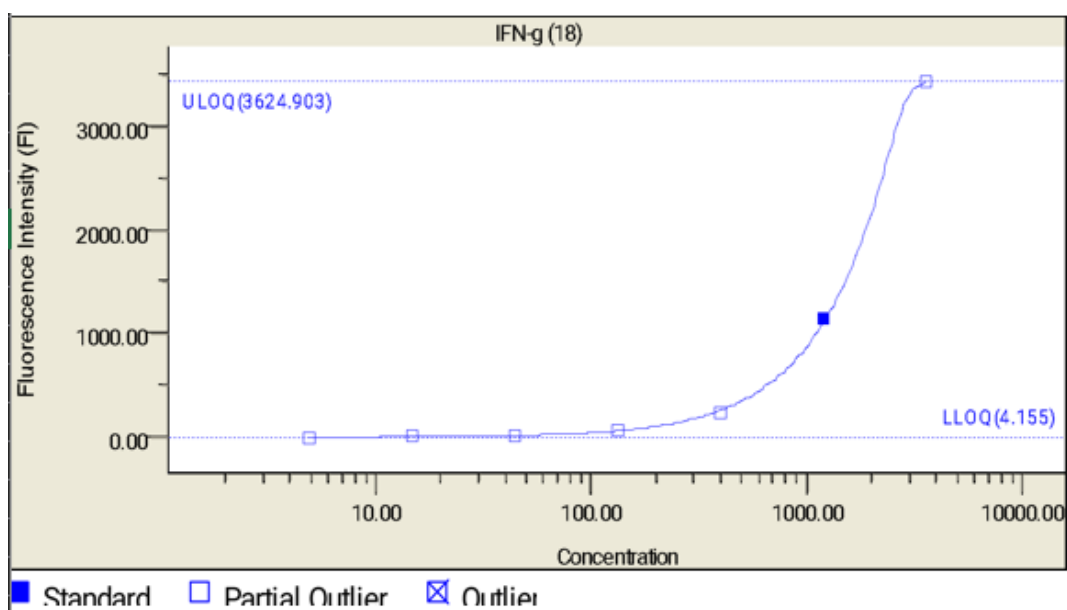
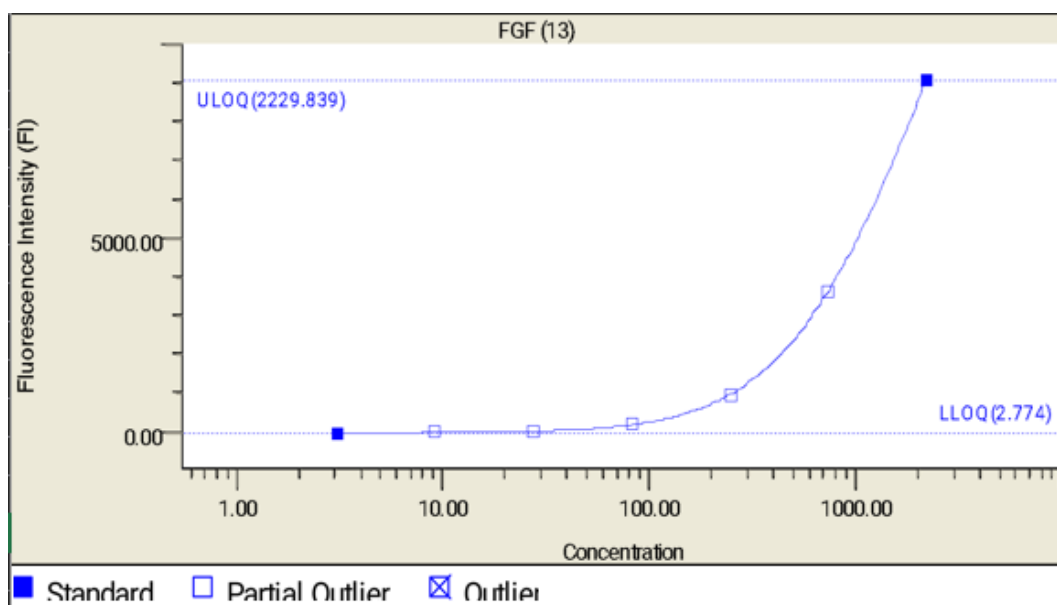
36. ThermoFisher Scientific. Mesenchymal Stem Cell (MSC) Media, Reagents & Differentiation Kits.
37. Balistreri CR, De Falco E, Bordin A, Maslova O, Koliada A, Vaiserman A. Stem cell therapy: old challenges and new solutions. *Mol Biol Rep.* 2020;47(4):3117–31.
38. Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology.* 2017;137(2):e11–6.
39. Tremel A, Cai A, Tirtaatmadja N, Hughes BD, Stevens GW, Landman KA, et al. Cell migration and proliferation during monolayer formation and wound healing. *Chem Eng Sci.* 2009;64(2):247–53.
40. Balistreri CR, De Falco E, Bordin A, Maslova O, Koliada A, Vaiserman A. Stem cell therapy: old challenges and new solutions. Vol. 47, *Molecular Biology Reports.* Springer; 2020. p. 3117–31.
41. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy.* 2019 Oct 1;21(10):1019–24.
42. Yin J, Kheirkhah A, Dohlman T, Saboo U, Dana R. Reduced Efficacy of Low-dose Topical Steroids in Dry Eye Disease Associated With Graft-versus-Host Disease. *Am J Ophthalmol.* 2018 Jun 1; 190:17–23.
43. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. Concise review: The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. Vol. 32, *Stem Cells.* Wiley-Blackwell; 2014. p. 1408–19.
44. Deffune E. Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Biologia Celular. Botucatu-SP, BRASIL; 2020.
45. Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, Bentez Del Castillo JM, Geffen D, Tauber J, et al. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J Ophthalmol.* 2011;151(5):792–8.
46. Mildmay-White A, Khan W. Cell Surface Markers on Adipose-Derived Stem

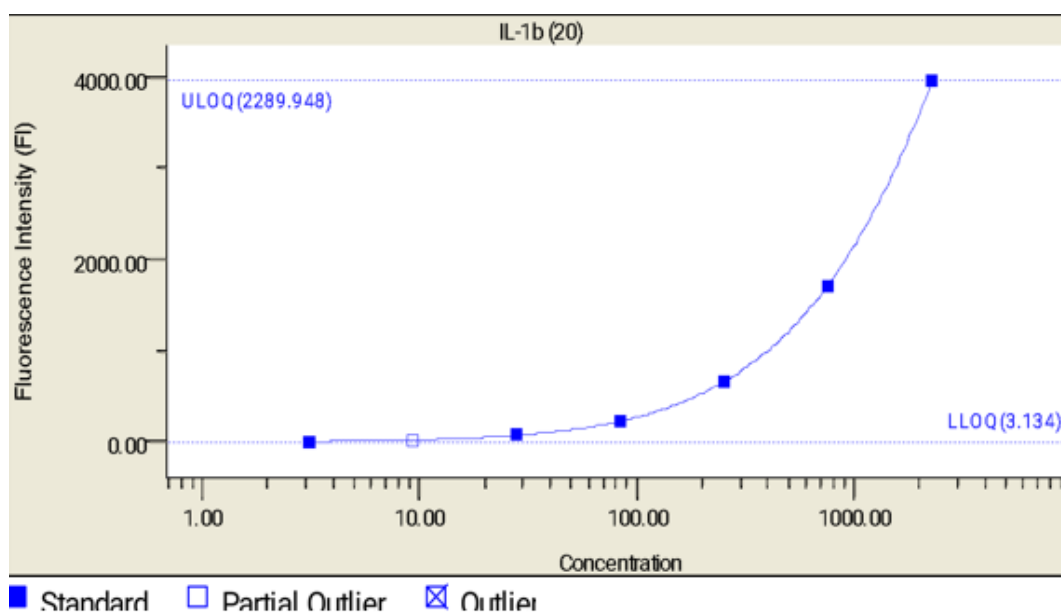
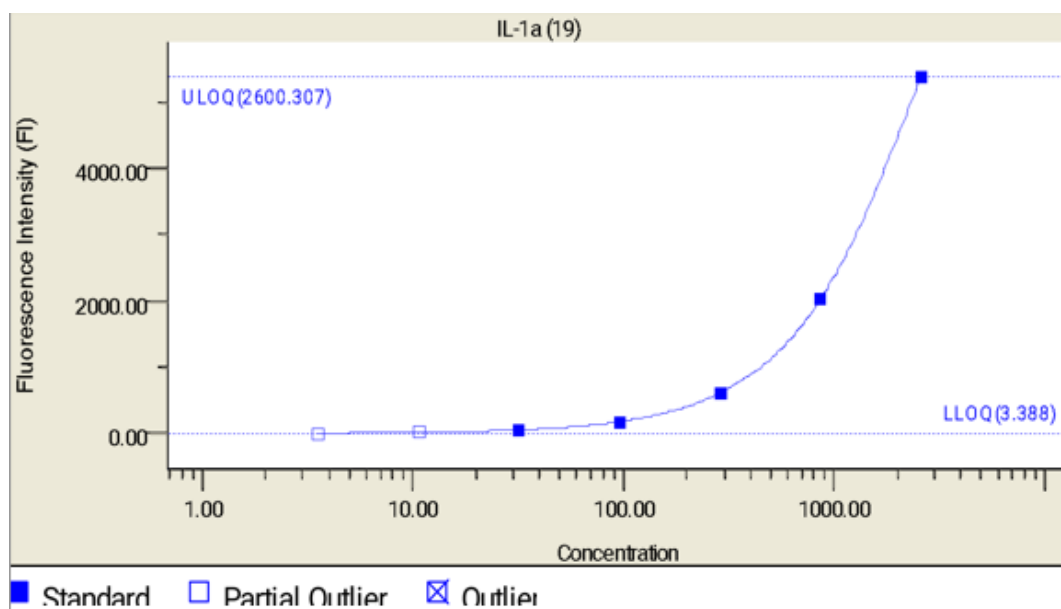
- Cells: A Systematic Review. Ingenta Connect. 2029;
47. Sid-Otmane C, Perrault LP, Ly HQ. Mesenchymal stem cell mediates cardiac repair through autocrine, paracrine and endocrine axes. *J Transl Med.* 2020;18(1):1–9.
 48. Lee J, Ha D, Cho B, Yi Y. A Toxicity study of exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2020 May;22(5):S189.
 49. Franzoni G, Mecocci S, De Ciucis CG, Mura L, Dell'Anno F, Zinellu S, et al. Goat milk extracellular vesicles: immuno-modulation effects on porcine monocyte-derived macrophages in vitro. *Front Immunol.* 2023;14.
 50. Mariappan I, Maddileti S, Savy S, Tiwari S, Gaddipati S, Fatima A, et al. In vitro culture and expansion of human limbal epithelial cells. *Nat Protoc.* 2010;5(8):1470–9.
 51. Human Cytokine Premixed Kit A [Internet]. Available from: www.RnDSystems.com/pdf/...
 52. 491535001395167888_DoHBrazilianPortugueseVersionRev.
 53. Liu Y, Li C, Wang S, Guo J, Guo J, Fu J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells confer potent immunosuppressive effects in Sjögren's syndrome by inducing regulatory T cells. *Mod Rheumatol.* 2021;31(1):186–96.
 54. Bucar S, Branco AD de M, Mata MF, Milhano JC, Caramalho Í, Cabral JMS, et al. Influence of the mesenchymal stromal cell source on the hematopoietic supportive capacity of umbilical cord blood-derived CD34+-enriched cells. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Dec 1;12(1).
 55. Burgucu D. Effect of short-term in vitro antibiotic administration into the human umbilical cord tissue on cfu count and mesenchymal stem cell immunophenotype. *Medicine Science | International Medical Journal.* 2021;10(1):98.
 56. Rakic R, Maddens S, Robert C, Rosset E, Saulnier N. A novel cell-based strategy based on MHCI/CD90 expression levels for highly proliferative MSC identification. *Cytotherapy.* 2020 May 1;22(5):S102.
 57. Lima N, Camara D, Tromp G. Tools for Analysis of Luminex Immunoassay

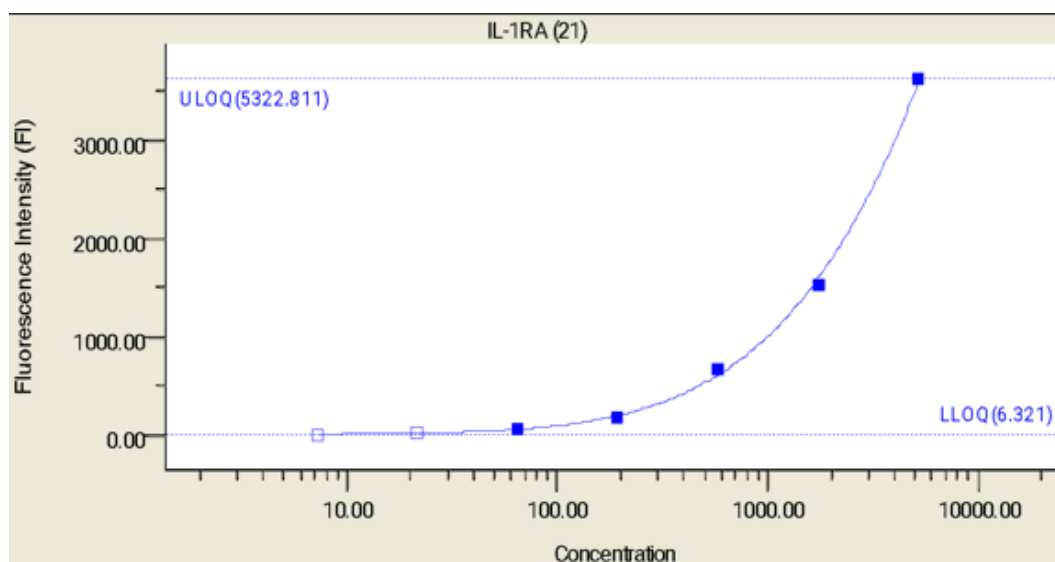
- Data: Development of a Robust Pipeline and Best Practices Recommendations [Internet]. 2023. Available from: <https://scholar.sun.ac.za>
58. Reslova N, Michna V, Kasny M, Mikel P, Kralik P. xMAP technology: Applications in detection of pathogens. Vol. 8, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
59. Pang K, Lennikov A, Yang M. Hypoxia adaptation in the cornea: Current animal models and underlying mechanisms. Vol. 4, *Animal Models and Experimental Medicine*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 300–10.

Anexo

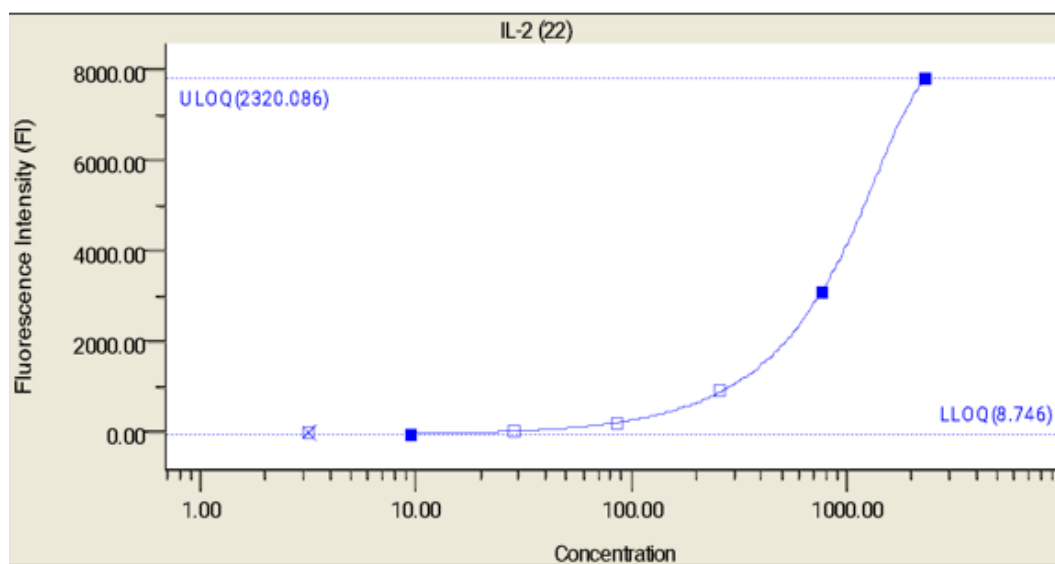








■ Standard □ Partial Outlier ⊠ Outlier



■ Standard □ Partial Outlier ⊠ Outlier

