

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DE microRNA-140 EM VESÍCULAS
EXTRACELULARES SECRETADAS POR CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEMBRANA SINOVIAL EQUINA**

JOÃO PEDRO HÜBBE PFEIFER

Botucatu, São Paulo
Junho de 2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA VETERINÁRIA E REPRODUÇÃO
ANIMAL

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DE microRNA-140 EM VESÍCULAS
EXTRACELULARES SECRETADAS POR CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEMBRANA SINOVIAL EQUINA**

JOÃO PEDRO HÜBBE PFEIFER

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dra Ana Liz Garcia Alves

Botucatu, São Paulo
Junho de 2021.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pfeifer, João Pedro Hübbe.

Avaliação de microRNA-140 em vesículas extracelulares secretadas por células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina / João Pedro Hübbe Pfeifer. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501003

1. Exossomos. 2. Osteoartrite. 3. Nanotecnologia. 4. Proloterapia. 5. MicroRNA. 6. Células-tronco mesenquimais. 7. Membrana sinovial.

Palavras-chave: Exossomos; Nanotecnologia; Osteoartrite; Proloterapia; microRNA.

Autor: João Pedro Hübbe Pfeifer

Data: 24 de junho de 2021.

Comissão Examinadora

Prof.^a Dra. Ana Liz Garcia Alves

Presidente da mesa e orientadora.

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP, Botucatu

Prof.^o Dr. Rogério Martins Amorim

Membro Titular

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

Prof.^a Dra. Elenice Deffune

Membro Titular

Departamento de Especialidades Cirúrgicas e Anestesiologia – Laboratório
de Engenharia Tecidual

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu

Prof.^o Dr. Tiago Lazzaretti Fernandes

Membro Titular

Departamento de Ortopedia e Traumatologia – Instituto de Ortopedia e
Traumatologia

Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina, USP, São Paulo

Prof.^o Dr. Juliano Coelho da Silveira

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as situações colocadas em minha vida, muitas difíceis, porém todas serviram de aprendizado, que levarei em meu trajeto profissional e pessoal.

A forma com que lidamos essas situações nos molda, forma nosso caráter, e caráter é uma lapidação constante, que quem começa o primeiro entalho são nossos pais, através dos ensinamentos e principalmente como exemplos a seguir, e aqui em especial agradeço à minha mãe, Maria da Graça, por ser exemplo de força e sempre me mostrar o que é certo, e do que é feito o caráter de um homem de bem, correto e principalmente justo. Agradeço ao meu pai, Luiz Fernando e meus irmãos, Fernando, Luiz Francisco e Luiz Felipe, por serem exemplo de pessoas e grandes profissionais, espelhos a serem seguidos. Agradeço à minha companheira, Marina, por sempre estar de braços abertos em todos os momentos de felicidade ou nos mais sensíveis, longe ou perto.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Ana Liz, por ter me aceito como aluno de estágio curricular, mestrado e doutorado. Foram anos de convivência e de aprendizado constante. A sua experiência profissional e como pessoa, demonstra força e seriedade, refletido em sua carreira. Levarei comigo seus ensinamentos e seu exemplo como profissional e pessoa, à conheci e convivi como orientadora, hoje tenho certeza de que tenho uma amiga. És um exemplo para todos os seus alunos.

Agradeço aos meus colegas de grupo de pesquisa, pois sem as discussões científicas, os períodos de experimentos práticos, os momentos de aprendizado mútuo e, claro, os momentos de descontração nada disso seria possível. A ajuda de vocês foi essencial para desenvolver este projeto. Portanto, este trabalho também é de vocês. Os conheci colegas, hoje, os tenho como amigos.

Agradeço a todos os professores que passaram em minha vida do ensino básico, graduação e pós-graduação, os quais ajudaram a lapidar minha carreira profissional. E, aos amigos que mesmo longe, estiveram comigo me apoiando em diversos momentos, infelizmente cada vez nos vemos menos, mas amigos de verdade sempre serão os mesmos.

Agradeço ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Doutorado e auxílio para desenvolvimento do projeto. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CNPq) pela bolsa durante o período inicial do doutorado.

Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
Capítulo 1	10
1.1. INTRODUÇÃO.....	10
1.2. REVISÃO DE LITERATURA	12
1.2.1. <i>Células Tronco Mesenquimais, Vesículas Extracelulares e microRNA na Osteoartrite</i>	12
1.2.2. <i>Vesículas Extracelulares</i>	14
1.2.2.1. <i>Biogênese das Vesículas Extracelulares</i>	16
1.2.2.1.1. <i>Mecanismos da Biogênese dos Exossomos</i>	19
1.2.2.1.2. <i>Mecanismos da Biogênese das Microvesículas</i>	21
1.2.3. <i>microRNAs</i>	23
1.2.3.1. <i>Biogênese dos microRNAs</i>	24
1.2.4. <i>Osteoartrite</i>	28
1.2.4.1. <i>microRNA-140 na Osteoartrite</i>	31
1.3. JUSTIFICATIVA.....	35
1.4. HIPÓTESE.....	35
1.5. OBJETIVOS	36
1.5.1. <i>Objetivo Geral</i>	36
1.5.2. <i>Objetivos específicos</i>	37
1.6. REFERÊNCIAS	37
Capítulo 2	47
2.1. ARTIGO CIENTÍFICO.....	47

PFEIFER, J.P.H., Avaliação de microRNA-140 em vesículas extracelulares secretadas por células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina. Botucatu, 2021, 88p, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESUMO

A função parácrina das células-tronco (MSCs) é desempenhada também por vesículas extracelulares (VEs). Assim, as VEs têm impacto funcional nas células-alvo e nos mecanismos de controle de enfermidades por meio da entrega de microRNAs. A exemplo, na osteoartrite, em que a homeostase articular é regulada pelo microRNA-140. O objetivo deste trabalho foi caracterizar vesículas extracelulares (VEs) liberadas por células-tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial (eqSMMSC) e avaliar a expressão de microRNA-140 nas VEs e nas eqSMMSC em dois modelos de cultivo celular, além de, comparar a secreção de VEs e a expressão do microRNA-140 em ambiente inflamatório *in vitro*. Quatro grupos experimentais foram definidos. Grupos controle, um cultivo de eqSMMSCs 2D e um cultivo de eqSMMSCs 3D. Grupos induzidos, também divididos em 2D-OA e 3D-OA, porém foram expostos ao meio de cultivo simulando o ambiente inflamatório da osteoartrite “OA-Like” (IL-1 β e TNF- α). Amostras dos meios de cultivo de todos os grupos foram coletadas após 24, 72 e 120 horas de incubação para isolamento e caracterização de VEs. O isolamento de VEs foi realizado com *kit* comercial pelo método de precipitação. A caracterização foi realizada pela NTA, MET e expressão de mRNA das tetraspaninas CD9, CD63 e CD81. A análise da expressão do microRNA-140 em VEs e células por RT-qPCR e do mRNA da ADAMTS5 também por RT-qPCR. As VEs puderam ser isoladas e caracterizadas em todos os grupos e momentos experimentais. A expressão do microRNA-140 nas eqSMMSCs, o grupo 3D-OA teve maior expressão em relação aos demais grupos nos momentos 24 h e em 72 h à ambos os controles e ao 2D-OA; no momento 120 h, houve maior expressão do grupo 3D em relação aos tratados 2D-OA e 3D-OA. Já a expressão do microRNA-140 nas VEs, destaca-se no momento 72 h, onde o grupo 3D teve expressão significativa em relação aos demais, e no momento 120 h, a expressão também significativa foi do 2D-OA em relação aos demais. Na análise

da expressão do mRNA ADAMTS5, pode-se destacar o momento 120 h, onde o grupo 3D-OA obteve maior expressão em relação aos controles 2D e 3D. Os dados obtidos apontaram que o modelo e as técnicas utilizadas foram eficazes para o isolamento e caracterização das VEs e para a identificação da expressão de microRNA nos diferentes grupos e momentos. A expressão do microRNA-140 em resposta ao ambiente inflamatório é desempenhada por eqSMMSCs, sendo que, em células 3D demonstrou-se ser rápida e em VEs oriundas de células cultivadas em 2D tardia.

Palavras-chave: exossomos, microRNA, osteoartrite, proloterapia, nanotecnologia.

PFEIFER, J.P.H., Evaluation of microRNA-140 inside extracellular vesicles secreted by equine synovial membrane-derived mesenchymal stem cells. Botucatu, 2021, 88p, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, School of Veterinary Medicine and Animal Science.

ABSTRACT

The paracrine function of stem cells (MSCs) is mainly performed by extracellular vesicles (EVs). Thus, the EV have functional impact on target cells and mechanisms of disease control through delivery microRNAs. For example, in osteoarthritis, in which joint homeostasis is regulated by microRNA-140. The objective of this work was to characterize extracellular vesicles (EVs) released by synovial membrane derived-mesenchymal stem cells (eqSMMSC) and to evaluate the expression of microRNA-140 in EVs and eqSMMSC cultivated in two cell culture models, in addition to comparing the secretion of EVs and the expression of microRNA-140 in an *in vitro* inflammatory environment. smMSCs were cultured and divided into four experimental groups. Control groups, one cultivation of 2D eqSMMSCs and one cultivation of 3D eqSMMSCs. Treated groups, also divided into 2D-OA and 3D-OA but were exposed to the culture medium simulating the “OA-Like” osteoarthritis inflammatory environment (IL-1 β and TNF- α). Culture media samples from all groups were collected after 24, 72 and 120 hours of incubation for isolation and characterization of EVs. Isolation of EVs was performed with a commercial kit using the precipitation method. Characterization was performed by NTA, TEM and mRNA expression of tetraspanins CD9, CD63 and CD81. Analysis of microRNA-140 expression in EVs and cells by RT-qPCR and ADAMTS5 mRNA in EVs also by RT-qPCR. EVs could be isolated and characterized in all groups and time points. The expression of microRNA-140 in eqSMMSCs, the 3D-OA group had greater expression in relation to the other groups at time points 24 h; and in 72 h for both controls and 2D-OA; at 120 h, there was greater expression in the 3D group compared to those treated 2D-OA and 3D-OA. The expression of microRNA-140 in EVs stands out at 72 h, where the 3D group had significant expression in relation to the others, and at 120 h, the expression was also significant for 2D-OA in relation to the others. In ADAMTS5 analysis of mRNA expression, the 120 h time point can be

highlighted, where the 3D-OA group showed higher expression compared to control 2D and 3D. The data obtained showed that the model and the techniques used were effective for the isolation and characterization of EVs and for the identification of microRNA expression in different groups and time points. The expression of microRNA-140 in response to the inflammatory environment is performed by eqSMMSCs, and it was shown to be early in 3D cells and late in EVs from cells grown in 2D.

Keywords: exosomes, microRNA, osteoarthritis, prolotherapy, nanotechnology.

Capítulo 1

1.1. Introdução

A medicina humana e veterinária têm se aprimorando em utilizar da biotecnologia para compreender os mecanismos promotores e de desenvolvimento de diversas enfermidades, convergindo ao propósito de se utilizar dos achados científicos para aplicação em seus pacientes. Ao analisar a perspectiva de vida da população humana e animal, esses achados poderão beneficiar a sobrevivência de ambas as espécies, uma vez que as alternativas terapêuticas estejam disponíveis para esses indivíduos.

Na face das enfermidades musculoesqueléticas, as descobertas científicas nos modelos experimentais animais além de serem utilizadas nos próprios animais, podem ser extrapoladas de um modo translacional para a medicina humana, uma vez que equinos e ovinos são considerados modelos experimentais ortopédicos para as enfermidades musculoesqueléticas de humanos, principalmente quando relacionado a osteoartrite (OA) (KUYINU et al., 2016).

O desenvolvimento da osteoartrite é multifatorial e de alta incidência nas espécies humana e equina (FRISBIE et al., 2002). Quando o ambiente de OA está instalado, alguns microRNAs, como o microRNA-140, sofrem regulação negativa, tornando o microambiente articular propício à evolução e agravamento desta enfermidade. O equilíbrio articular é desregulado pela expressão reduzida do microRNA-140 em resposta à ação exacerbada de mediadores pró-inflamatórios, o que estimula a ação de enzimas de degradação da cartilagem (MIYAKI; ASAHARA, 2012).

Logo, o micro-RNA-140 tem função direta na manutenção da homeostase articular. A expressão e função tecido-específica do microRNA-140 são semelhantes em equinos, humanos e camundongos (MIYAKI et al., 2009; NAKAMURA et al., 2011; BUECHLI; LAMARRE; KOCH, 2013; VAN DER KOLK; PACHOLEWSKA; GERBER, 2015; YIN et al., 2017).

Tendo em vista a análise dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da OA e nas possíveis terapias disponíveis atualmente, especialmente as inovadoras e de cunho reparador e regenerativo, vislumbra-se o potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial (eqSMMSC) na OA equina. Os diversos estudos já desenvolvidos, relacionados à ação parácrina das células tronco mesenquimais (MSCs) demonstram que a capacidade terapêutica desta fonte celular pode ser ainda explorada. Como exemplo, na utilização das vesículas extracelulares secretadas por eqSMMSC como carreadoras de microRNAs específicos, que atuam na homeostase articular e na condrogênese.

Sabe-se que as MSCs expressam o microRNA-140, em cultivos bidimensionais e durante a diferenciação condrogênica em *pellet* (KARLSEN et al., 2014). Nesse sentido, pode-se presumir que a biotecnologia de encapsulamento celular pode ser incorporada às eqSMMSCs para aumentar o potencial terapêutico das MSCs quando destinada a terapia da OA. O arcabouço ou *scaffold*, de hidrogel de alginato formado no encapsulamento proporciona um ambiente tridimensional para as eqSMMSC, que mimetiza a matriz biológica natural para melhor função e proliferação celular. Outro papel importante do hidrogel de alginato verificado é a influência na indução da diferenciação condrogênica das eqSMMSC (SANTOS et al., 2018, 2019). Acredita-se que a já comprovada influência positiva do *scaffold* na diferenciação condrogênica somada à função condrogênica do microRNA-140, poderá induzir a maior liberação de VEs expressando microRNA-140 pelas eqSMMSC.

Visando utilizar-se de biotecnologias aplicáveis a diferentes espécies, decidiu-se por desenvolver este trabalho. Objetivou-se avaliar fatores biológicos como os microRNAs envolvidos no desenvolvimento da osteoartrite equina, e sua relação com os mecanismos terapêuticos na área da terapia regenerativa *in vitro*.

Os resultados desse trabalho poderão ser transpostos para a medicina humana, tendo em vista, que a atuação e expressão do microRNA-140 no ambiente articular ocorre da mesma forma em diferentes espécies.

1.2. Revisão de Literatura

1.2.1. Células-Tronco Mesenquimais, Vesículas Extracelulares e microRNA na Osteoartrite

As MSCs e suas VEs secretadas retêm grande potencial como “*drug delivery*” de nova geração, graças à sua capacidade de encapsular várias moléculas terapêuticas e ao seu tropismo fisiológico para alcançar os locais afetados. Atualmente, o método de *drug delivery* de nova geração com VEs pode ser utilizado para possível administração exógena de miRNAs. Esse método objetiva minimizar os efeitos colaterais ocasionados pela metabolização de alguns princípios ativos, bem como, garantir a realização do tratamento apenas no alvo terapêutico (PERRINI et al., 2016; CRIVELLI et al., 2017a). Assim, a ação de *drug delivery* desempenhada por VEs enriquecidas com moléculas de miRNA resulta em superexpressão ou deleção altamente eficiente dos miRNAs designados nas células receptoras, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ZHANG et al., 2016a).

Muitos estudos já descreveram diversas funções e ações inerentes às MSCs, e, além, do potencial já conhecido, como secretoras de fatores parácrinos (muitos via VEs) e a migração e diferenciação celular para o tecido afetado, as MSCs possuem grande capacidade para serem utilizadas como fontes produtoras de fatores bioativos para auxiliar na depleção ou reparação de enfermidades (CAPLAN, 2017; CASSANO et al., 2018a; CHEN et al., 2018; LANGE-CONSIGLIO et al., 2018a; RAGNI et al., 2020).

As VEs que são liberadas pelas células no meio extracelular têm sido consideradas como fontes de transporte dos componentes funcionais da ação parácrina das MSCs (RATAJCZAK et al., 2006; CAMUSSI et al., 2010; LANGE-CONSIGLIO et al., 2018a), assim como a utilização das VEs para transporte de miRNAs entre as células, e esses manifestam efeitos de interferência de mRNA nas células receptoras (KOSAKA et al., 2010; PEGTEL et al., 2010). Isso significa, que as VEs têm um impacto funcional nas células-alvo e por consequência em mecanismos de controle de enfermidades por meio da entrega

de miRNA, tanto em humanos, quanto em equinos (LANGE-CONSIGLIO et al., 2018a; QIU et al., 2018; RAGNI et al., 2020).

Exemplificando esse sistema desempenhado pelas VEs, um estudo analisou o padrão de seleção de miRNAs pelas VEs, e foi constatado que alguns miRNAs se mantiveram presentes como carga de VEs e ausentes nas células após a liberação da VEs, enquanto outros foram retidos nas células e não foram transportados para dentro das VEs. Essa observação de que as VEs com alta expressão de miRNAs e transferidas para células-alvo, aumenta a possibilidade de que o efeito biológico das células tronco possa, pelo menos em parte, depender de miRNAs transportados em VEs (COLLINO et al., 2010).

Em outro estudo, realizado por He e colaboradores (2020), foi observada a ação positiva de “exossomos” secretados por células-tronco derivadas de medula óssea na reparação de cartilagem em modelos de OA *in vitro* (cultivo de condrócitos tratados com IL-1 β) e *in vivo* (infiltração de iodoacetato de sódio). Foi verificado que os condrócitos internalizaram os exossomos por endocitose no modelo *in vitro* e que o tratamento atenuou de maneira significativa o efeito inibitório da IL-1 β na proliferação e migração dos condrócitos, além de reduzir a ação da IL-1 β na regulação negativa do gene do colágeno tipo II peptídeo A1 (COL2A1) e do gene do agrecan (ACAN) e na regulação positiva de MMP13 e ADAMTS5. Tais efeitos foram também observados no modelo *in vivo*. É muito provável que esta regulação negativa da expressão de ADAMTS5 esteja relacionada à inibição da ADAMTS5 pelo miRNA-140, o qual possivelmente foi carregado pelos exossomos.

Os achados do estudo anterior (HE et al., 2020), vão de encontro ao primeiro estudo que avaliou a ação de exossomos secretados por células tronco mesenquimais em modelos de OA *in vivo* (ZHANG et al., 2016b). Neste estudo, defeitos osteocondrais foram criados bilateralmente nos sulcos trocleares femorais de 12 ratos adultos e tratados com exossomos ou PBS. Após seis semanas, identificou-se a restauração completa da cartilagem e do osso subcondral com características incluindo uma cartilagem hialina com boa regularidade de superfície, ligação completa à cartilagem adjacente e deposição de matriz extracelular. Em contraste, nos defeitos osteocondrais tratados com PBS dos membros contralaterais havia apenas tecidos de reparo fibroso.

Com base na literatura pesquisada, verifica-se a necessidade de maiores investigações relacionadas aos fatores moleculares ativos que agem na manutenção da homeostase articular e nas alterações ocasionadas nas fases de OA. Ainda que, por vezes de forma isolada, estudos tenham investigado essas relações, o entendimento da função e ação das células tronco mesenquimais no âmbito da medicina regenerativa nesta enfermidade deve ser mais explorado, de maneira que englobe esses potenciais mecanismos terapêuticos, seja em modelos *in vitro* ou *in vivo*.

1.2.2. Vesículas Extracelulares

Células de diferentes organismos, como todos os eucariotos e procariotos, liberam vesículas no ambiente extracelular. Vesículas Extracelulares (VEs) abrangem uma população heterogênea de vesículas oriundas de membrana plasmática de diversas origens. Nas primeiras observações de VEs, como no estudo de Johnstone e colaboradores (1987), acreditava-se que essas partículas eram uma forma de eliminação de componentes desnecessários pelas células (JOHNSTONE et al., 1987).

Atualmente, sabe-se que as VEs possuem funções mais complexas, e não somente transportadores de resíduos. Desempenham papel na troca de componentes entre células e como veículo na sinalização parácrina de processos biológicos, por exemplo, na homeostase celular e/ou nos processos consequentes do desenvolvimento de enfermidades (LO CICERO; STAHL; RAPOSO, 2015; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Essas funções das VEs ganham cada vez mais interesse das pesquisas relacionadas à terapia regenerativa.

Por muitos anos, uma divergência entre pesquisadores da área foi em relação à terminologia utilizada para determinar os subtipos de VEs. Embora, o termo genérico “vesículas extracelulares” esteja em uso para se referir a todas essas vesículas secretadas via membrana, as VEs são, na verdade, altamente heterogêneas (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Esta heterogeneidade, dificulta a caracterização e manipulação das propriedades e funções das VEs.

Baseando-se no conhecimento da biogênese, as VEs foram divididas de forma ampla, em duas categorias principais: exossomos e microvesículas. Os

exossomos são formados pelo brotamento interno da membrana endossômica enquanto as microvesículas são geradas pelo brotamento externo e fissão da membrana plasmática. A partir dessas duas categorias, a determinação era realizada considerando a origem e o diâmetro dessas VEs: exossomos, 30 – 150 nm, origem (nanovesículas, prostassomos, tolerossomos, dexossomos); microvesículas, 50 nm – 1 µm, até 10 µm no caso de oncossomos, origem (micropartículas, neuroesferas, oncossomos, corpos apoptóticos) (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

Existem evidências de que cada tipo de célula ajusta a biogênese das VEs de acordo ao seu estado fisiológico e libera VEs com composição específica de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Além disso, muitas publicações têm como objeto de estudo as potenciais funções das VEs e não a origem das vesículas analisadas, não deixando explícito qual dos subtipos é responsável por determinada ação.

Este intervalo de sobreposição entre tamanho, morfologia semelhante e composição variável, tem muita discrepância entre autores e desafiou algumas tentativas de conceber uma nomenclatura precisa para VEs (GOULD; RAPOSO, 2013; KOWAL et al., 2016). Alguns protocolos disponíveis para recuperar VEs de sobrenadantes de cultura de células ou amostras de biópsia líquida resultam em uma população heterogênea de vesículas de origem desconhecida (WILLMS et al., 2016).

Para validar os respectivos papéis dos exossomos e microvesículas, em meados de 2018, como consequência da reunião da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), foi publicada uma atualização com informações mínimas que pesquisas no campo das VEs devem seguir, destacando um entendimento sobre a nomenclatura e caracterização para determinação de cada subtipo.

Relacionado à nomenclatura, pode-se utilizar do termo genérico como “vesículas extracelulares”, porém, quanto à determinação dos subtipos, não houve total acordo sobre marcadores específicos, pois permanece difícil atribuir as VEs a uma via de biogênese específica, como exossomos originados do endossoma e microvesículas originadas da membrana plasmática, a menos que, no estudo seja possível detectar por meio de imagem o exato momento de

liberação de determinada VE, ou desde que os autores possam estabelecer na metodologia experimental marcadores específicos de origem subcelular que sejam confiáveis. Portanto, os autores devem considerar o uso de termos operacionais, e lançar mão de meios que proporcionem determinar os subtipos de VEs que se referem quanto a:

1) características físicas das VEs: como tamanho, VEs pequenas (<100 nm ou <200 nm) e médias a grandes (>200 nm) e/ou densidade (baixa, média, alta, com cada faixa definida);

2) composição bioquímica (VEs CD63+ / CD81+ -, VEs coradas com Anexina A5, etc.);

3) descrições de condições ou células de origem (VEs de podócitos, VEs em hipóxia, oncosomas grandes, corpos apoptóticos) no lugar de termos como exossomo e microvesícula, que são historicamente carregados por definições múltiplas e contraditórias e expectativas imprecisas de biogênese única.

Caso a definição da VE não possa ser obtida de acordo com os quesitos mínimos da publicação relacionado do encontro da SIVE 2018, termos como “partícula extracelular” são os mais apropriados (THÉRY et al., 2018).

1.2.2.1. Biogênese das Vesículas Extracelulares

A fim de facilitar a compreensão dos mecanismos particulares de biogênese das VEs, utilizar-se-á a nomenclatura usual, exossomos e microvesículas, até a definição da SIVE 2018, pois os trabalhos que descrevem esses mecanismos são anteriores à nova definição.

Os exossomos e microvesículas possuem diferentes vias de biogênese, porém ambos compartilham processos de passagem por membrana; os exossomos são gerados dentro do sistema endossômico como vesículas intraluminais (VILs) e secretados durante a fusão do endossoma multivesicular (EMV) com a superfície celular, enquanto as microvesículas se originam por um brotamento externo na membrana plasmática (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Ainda que a formação de exossomos e microvesículas ocorra em locais distintos no interior celular, mecanismos intracelulares comuns e processos de

seleção estão envolvidos na biogênese de ambos os subtipos. Estes mecanismos compartilhados e moléculas presentes na morfologia de ambos subtipos, muitas vezes dificultam a distinção entre estas VEs (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014).

Ressalta-se, a importância do processo de transferência dos conteúdos, ou “cargas”, (moléculas de membrana, adesão, sinalizadoras, diversas proteínas e enzimas, ácidos nucleicos, etc.) para as VEs (representado na Figura 4), que devem ser direcionados ao local de produção, seja na membrana plasmática (para microvesículas) ou na membrana limitante do EMV (para exossomos).

A natureza e a concentração das cargas contidas nas VEs, são inerentes ao tipo celular secretor e muitas vezes o microambiente fisiológico ou fisiopatológico influencia o tipo de cargas carregadas. Estes estímulos microambientais, também modulam os mecanismos moleculares que sinalizam a sua biogênese e liberação no meio extracelular (MINCIACCHI; FREEMAN; DIVIZIO, 2015; KALRA; DRUMMEN; MATHIVANAN, 2016).

As cargas da membrana dos exossomos chegam aos endossomos a partir do complexo de Golgi ou são internalizadas a partir da membrana plasmática antes de serem classificadas em VILs, durante a maturação do endossomo (endossomo precursor). As cargas inseridas nas microvesículas, algumas também advêm da membrana plasmática e da seleção e reciclagem das cargas presentes em endossomos precursores (KLUMPERMAN; RAPOSO, 2014).

No processo de carregamento dos exossomos, as cargas que são recicladas por estarem ligadas à membrana plasmática têm grandes possibilidades de não apresentar expressões significativas nos exossomos, a menos que, essa reciclagem seja comprometida. Este comprometimento ou depleção dos reguladores da reciclagem endossômica e do transporte retrógrado dos endossomos para o complexo de Golgi pode afetar o direcionamento de algumas cargas para as VEs (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

Nesse contexto, a proteína sintenina, a qual atua tanto na reciclagem, quanto na classificação do sindecano (receptor transmembrana) em EMVs para biogênese dos exossomos, possui um potencial regulador do *crosstalk* entre a

reciclagem endocítica e o direcionamento endossomal a partir do complexo de Golgi, de eventuais cargas para os exossomos (BAIETTI et al., 2012).

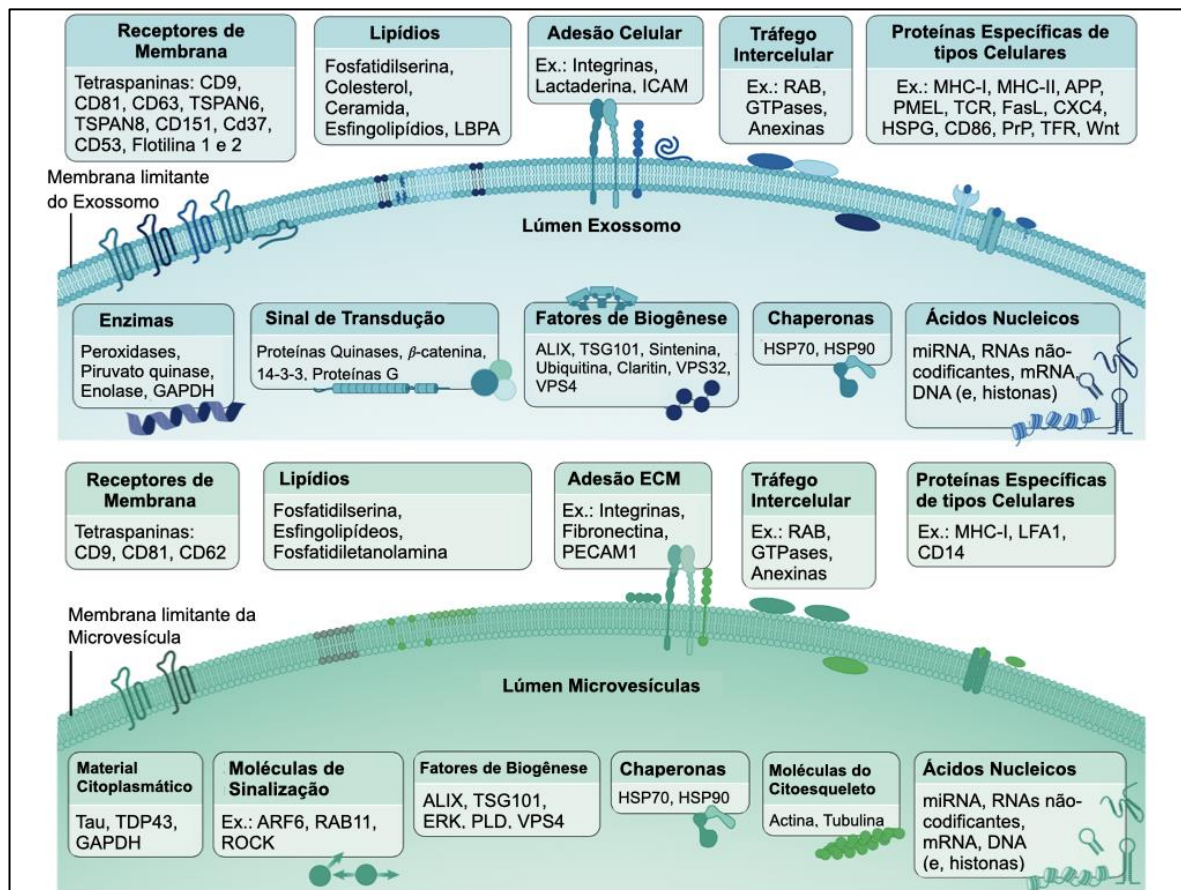


FIGURA 4. A análise da composição das vesículas extracelulares revela que elas podem transportar várias cargas, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e esse conteúdo pode variar amplamente entre as células e as condições. A composição específica afetará diretamente o destino e a função das vesículas extracelulares. Dependendo do tipo de célula, as vesículas extracelulares expressarão um conjunto de proteínas específicas de cada tipo de célula e que são responsáveis por seus destinos e funções. Abreviaturas: ALIX, Proteína X de interação ALG-2; APP, Proteína Precursora de Amilóide; ARF6, Fator de Ribosilação 6 do ADP; ARMMS, Microvesículas mediadas por proteína 1 contendo domínio de arrestina; CXCR4, Receptor 4 de Quimiocina - CXC; GAPDH, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; HSP70, Proteína de choque térmico de 70 kDa; HSPG, Proteoglicano de sulfato de heparano; ICAM, Molécula de adesão intercelular; LBPA, Ácido liso bifosfatídico; LFA1, Antígeno 1 associado à função linfocitária; MHC, Complexo principal de histocompatibilidade; PECAM1, Molécula de adesão celular endotelial plaquetária; PLD, Fosfolipase D; PrP, Proteína príon; ROCK, Proteína quinase associada a RHO; TCR, Receptor de células T; TDP43, Proteína de ligação ao DNA - TAR43; TFR, Receptor de transferrina; TSG101, Proteína do gene 101 de susceptibilidade ao tumor; TSPAN, Tetraspanina; VPS, Proteína vacuolar de seleção. Adaptado de: VAN NIEL, Guillaume;

D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature reviews - Molecular cell biology**, v. 19, n. 4, p. 213, 2018.

1.2.2.1.1. Mecanismos da Biogênese dos Exossomos

Os exossomos são gerados inicialmente como VILs dentro do lúmen dos endossomos durante sua maturação em EMV, um processo que envolve um mecanismo de seleção específico. Esses mecanismos de seleção separam primeiro as cargas nos microdomínios da membrana limitante do EMV, com o consequente brotamento interno e fissão de pequenas vesículas de membrana contendo citosol sequestrado do EMV (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

A descoberta do mecanismo chamado de complexo de classificação endossomal necessário para transporte (ESCRT) foi como um impulsionador da formação da membrana e corte. O mecanismo ESCRT atua de diferentes níveis, em que as subunidades ESCRT0 e ESCRTI agrupam cargas transmembranas ubiquitinadas em microdomínios da membrana limitante de EMV e recruta via ESCRTII, os subcomplexos ESCRTIII, os quais realizam brotamento interno no EMV e fissão deste microdomínio (Figura 5) (COLOMBO et al., 2013).

A via ESCRT canônica pode ser interceptada pela sintenina e a proteína acessória ALIX (conhecida como proteína de interação de morte celular programada 6), que conecta as cargas à subunidade ESCRTIII associada à proteína vacuolar de seleção 32 (VPS 32) (BAIETTI et al., 2012).

Os exossomos também podem ser formados independente de ESCRT, demonstrado em estudos onde os EMVs com VILs internalizadas expressando CD63, ainda são formadas após o esgotamento dos componentes dos quatro complexos ESCRT (STUFFERS et al., 2009). Também foi demonstrado que o primeiro mecanismo independente de ESCRT da biogênese do exossomo precisa da formação de ceramida, a qual, é formada pela esfingomielinase neutra do tipo II, que hidrolisa a esfingomielina em ceramida (TRAJKOVIC et al., 2008). A ceramida permite a formação de subdomínios de membrana, que impõem um abaulamento espontâneo nas membranas, além de poder desempenhar ao ser metabolizada em fosfato de esfingosina-1 para ativar o receptor de fosfato de esfingosina-1 acoplado à proteína Gi. Este processo é essencial para a seleção de cargas em VILs por esta via (GOÑI; ALONSO, 2009; KAJIMOTO et al., 2013).

Outras proteínas, da família das tetraspaninas, fazem a regulação da seleção endossômica independente de ESCRT, estando diretamente ligadas à seleção de cargas para exossomos as tetraspaninas CD9, CD81 e CD82 (CHAIROUNGDUHA et al., 2010).

Um dos objetivos deste trabalho está relacionado quanto a expressão de miRNA internalizado em VEs, incluindo os exossomos. E, além de proteínas e outros fatores, as VEs também carregam ácidos nucleicos, como RNAs (mRNA e RNAs não codificantes, como miRNAs) e sequências de DNA (VALADI et al., 2007; NOLTE' T HOEN et al., 2012; KAHLERT et al., 2014; THAKUR et al., 2014).

Os mecanismos envolvidos no carregamento de ácidos nucleicos para exossomos ainda são vagos, e as contribuições científicas relacionadas ao carregamento passivo ou ativo de RNAs nas VEs ainda não foram bem esclarecidas (MATEESCU et al., 2017).

Diferentes mecanismos foram descritos que podem atuar para realizar a seleção de ácido nucleicos específicos, incluindo a subunidade ESCRTII que pode atuar como um complexo de ligação de RNA (IRION; ST JOHNSTON, 2007); os microdomínios enriquecidos com tetraspanina podem sequestrar proteínas de ligação de RNA nos subdomínios de membrana, (PEREZ-HERNANDEZ et al., 2013); ou através o complexo de silenciamento induzido de miRNA (miRISC) e proteína argonauta 2 (AGO2), que medeiam processos de silenciamento de RNA (GIBBINGS et al., 2009).

Novos reguladores de seleção de miRNA como carga de exossomos também foram descritos recentemente, e incluem a via de sinalização KRAS-MEK atuando por meio de AGO2 (MCKENZIE et al., 2016), Proteína de Vault principal (TENG et al., 2017), e Proteína de Ligação YBox-1 (SHURTLEFF et al., 2016).

Em geral, a biogênese dos exossomos é complexa, e varia de acordo com a seleção de cargas e o tipo de célula, além de outros sinais da manutenção homeostática ou de estímulos fisiopatológicos também podem influenciar na biogênese.

1.2.2.1.2. Mecanismos da Biogênese das Microvesículas

Considerando que a erupção formada durante a apoptose é conhecida por produzir microvesículas na forma de corpos apoptóticos (HRISTOV et al., 2004), a liberação de microvesículas da membrana plasmática de células saudáveis e os mecanismos envolvidos nessa secreção ainda estão sendo elucidados.

Esta biogênese requer vários rearranjos moleculares no interior da membrana plasmática, incluindo mudanças nos componentes lipídicos, na composição proteica, e nos níveis de Ca^{2+} (MINCIACCHI; FREEMAN; DI VIZIO, 2015).

Mecanismos enzimáticos dependentes de Ca^{2+} , incluindo translocases de aminofosfolípidios (flipases e flopases), *scramblases* (responsáveis pela translocação de fosfolípidos entre duas monocamadas de uma bicapa lipídica) e calpaína conduzem a rearranjos na assimetria de fosfolípidios de membrana (exposição de fosfatidilserina do folheto interno para a superfície celular), que causa flexão física da membrana e reestruturação do citoesqueleto de actina subjacente, o que favorece o brotamento da membrana e a formação de microvesículas (FIGURA 5) (PICCIN; MURPHY; SMITH, 2007; AL-NEDAWI et al., 2008).

Assim como no direcionamento de cargas para exossomos, lipídios e outras cargas associadas a membranas são localizadas em locais de brotamento de microvesículas por meio de sua afinidade pelas jangadas lipídicas ou, como é o caso das proteínas citoplasmáticas oligoméricas, por sua ancoragem a lipídios de membrana plasmática. Os componentes citosólicos destinados à secreção em microvesículas necessitam de sua ligação ao folheto interno da membrana plasmática. Esta associação é dependente de suas respectivas âncoras de membrana plasmática (palmitoilação, prenilação, miristoilação) e do estabelecimento de complexos de alta ordem, que os concentram nos pequenos domínios da membrana a partir dos quais as microvesículas formadoras irão brotar (SHEN et al., 2011; YANG; GOULD, 2013).

Ainda não está claro como os ácidos nucleicos, que geralmente são encontrados nas microvesículas, são direcionados para a superfície celular. Um possível mecanismo balizado por ação de miRNA em uma região 3'UTR de

mRNAs pode estar envolvido no direcionamento de outros RNAs para microvesículas, este mecanismo foi descrito a partir de estudos de células cancerosas e sugere-se o envolvimento dos miRNA no direcionamento de mRNA para microvesículas (BOLUKBASI et al., 2012), porém tal via de carregamento ainda não está evidente.

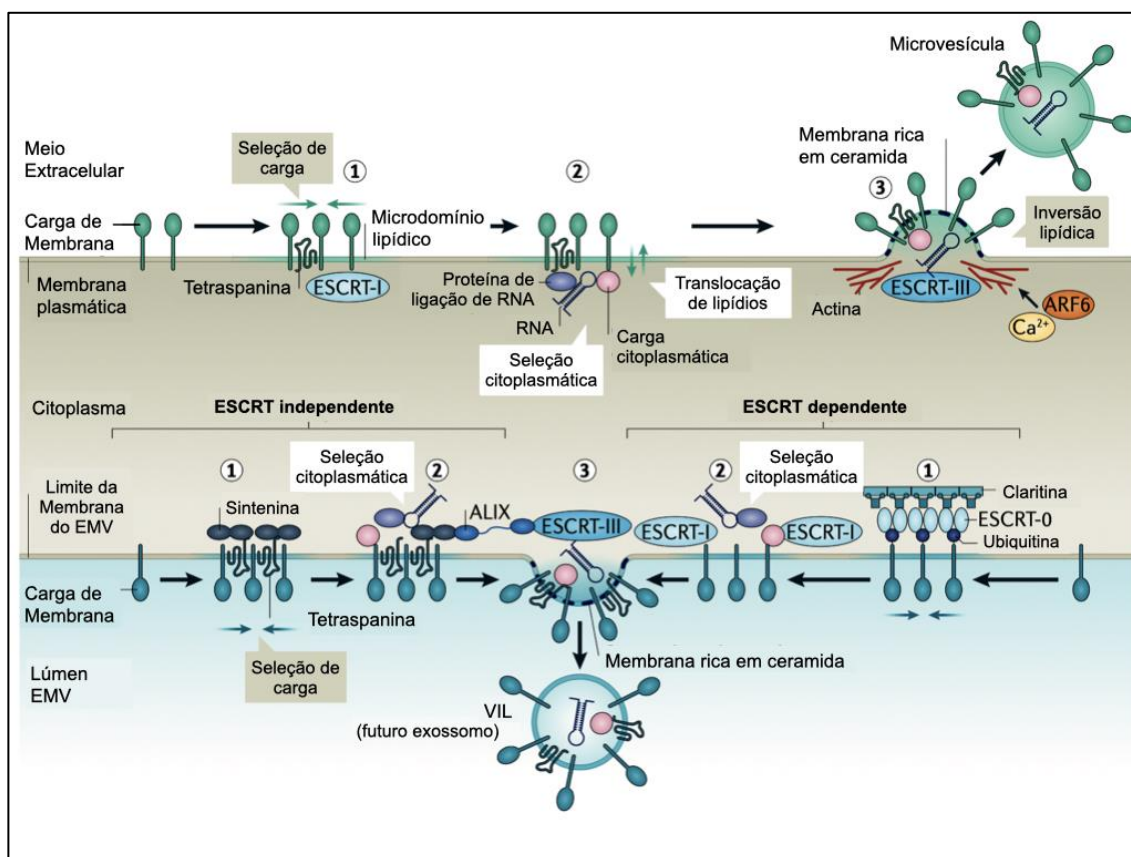


FIGURA 5. Diversos mecanismos e etapas são necessárias para a geração de exossomos e microvesículas. Os lipídios e proteínas associadas à membrana são agrupados em discretos microdomínios da membrana plasmática para microvesículas (topo) e da membrana limitante do endossomo multivesicular (EMV) para exossomos (parte inferior) (etapa 1 – faixa verde discreta). Os microdomínios também participam do recrutamento de componentes solúveis, como proteínas citosólicas e subtipos de RNA, que são destinadas à seleção em vesículas extracelulares (etapa 2). Ao todo, a formação desses microdomínios agrupados junto com mecanismos adicionais promove brotamento da membrana seguido por um processo de abaulamento na membrana plasmática em direção ao meio extracelular ou na membrana limitante do EMV em direção ao lúmen do EMV (etapa 3). As proteínas transmembrana selecionadas em exossomos e microvesículas mantêm a mesma topologia da membrana plasmática. Os mecanismos da biogênese do exossomo envolvem as subunidades do complexo de classificação endossomal necessário para transporte (ESCRT), em diferentes níveis. ESCRT0 e ESCRTI agrupam cargas transmembranas ubiquitinadas em microdomínios da

membrana limitante de EMV e recruta via ESCRTII, já ESCRT-III é necessário para a cisão das vesículas intraluminais (VILs) no lúmen do EMV, mas o agrupamento de carga e o brotamento da membrana podem ocorrer por mecanismos dependentes de ESCRT ou independentes de ESCRT. Os mecanismos moleculares que atuam nas diferentes etapas da biogênese das vesículas extracelulares são parcialmente comuns aos exossomos e microvesículas (incluindo proteínas ESCRT e a geração de ceramida por esfingomielinase). Uma exceção é a inversão de espécies lipídicas específicas entre os folhetos da membrana de brotamento, dada exclusivamente para brotamento de microvesícula. Abreviaturas: ALIX, Proteína X de interação ALG-2; ARF6, Fator de Ribosilação 6 do ADP. Adaptado de: VAN NIEL, Guillaume; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature reviews - Molecular cell biology**, v. 19, n. 4, p. 213, 2018.

1.2.3. microRNAs

Em um contexto temporal, em 1993, Lee e colaboradores (1993) ao pesquisarem genes que regulam as fases de desenvolvimento do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, encontraram dois pequenos RNAs reguladores, conhecidos como *lin-4* e *let-7*, de aproximadamente 22 a 61 nucleotídeos (nt) (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Mais tarde, em 2001, Lagos-Quintana e colaboradores (2001), reportaram que esses pequenos RNAs representavam uma classe populosa de pequenos RNAs endógenos de aproximadamente 22nt, denominados microRNAs (miRNAs). Esses miRNAs funcionam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, e são altamente conservados em vertebrados, invertebrados e plantas (nestas, com regulação distinta dos demais) (LAGOS-QUINTANA et al., 2001).

Da descoberta inicial até os dias atuais os papéis e as funções dos diferentes tipos de miRNAs têm sido amplamente estudados em diversos modelos experimentais. Um ponto a se destacar na evolução dos estudos na área é que se pequenos RNAs não codificantes podem regular a expressão gênica, seria possível que a regulação alterada da expressão do microRNA pudesse resultar em expressão gênica aberrante com potencial desenvolvimento de enfermidades (BUDD, 2016).

Desta forma os miRNAs são classificados como pequenos RNAs não codificantes endógenos, que têm íntima função na expressão de diversos genes a fim de manter a regulação celular em homeostase (MIYAKI; ASAHARA, 2012).

1.2.3.1. Biogênese dos microRNAs

A característica de diferenciação dos genes de miRNA é o dobramento dos transcritos intermediários de RNA em estruturas *hairpin* que são reconhecidas especificamente e processadas pelo mecanismo de biogênese do miRNA. São conhecidos como fatores de transcrição a Proteína 1 de determinação de mioblastos (MyoD1), a Miogenina 11 (MYOG11) e o Fator Nuclear - κ B (NF- κ B). Esses transcritos primários de miRNA (pri-miRNAs) são produtos específicos da RNA polimerase II, e possuem estruturas da extremidade CAP-5' e cauda 3' poli-A, sendo esses transcritos processados no núcleo e no citoplasma celular, resultando na formação de miRNAs maduros (BARTEL, 2009; BEREZIKOV, 2011; MIYAKI; ASAHARA, 2012).

Os miRNAs são codificados nos genomas como unidades transcricionais independentes com seus próprios promotores como os miRNAs simples. Dessa maneira, o *locus* genômico dos miRNAs transcritos pode diferir (Figura 1a); ou como aglomerados (*clusters*) de vários genes de miRNA transcritos como um único pri-miRNA, mas podem ser clivados posteriormente para formar os miRNAs maduros individuais (Figura 1b). Alguns genes de miRNA de animais estão localizados em íntrons de genes codificadores de proteínas (Figura 1c) (BEREZIKOV, 2011; MIYAKI; ASAHARA, 2012; BUDD, 2016; TREIBER; TREIBER; MEISTER, 2019).

Enquanto alguns miRNAs intrônicos têm orientação *antisense* em relação aos seus genes de origem e, portanto, não dependem diretamente da transcrição do gene de origem, acredita-se que os miRNAs intrônicos de orientação *sense* sejam processados como parte do RNA mensageiro (mRNA) do gene de origem e sua expressão se correlacione com a de suas origens. No entanto, existem evidências crescentes de que muitos genes de miRNAs intrônicos com orientação *sense*, também tenham seus próprios promotores localizados em regiões intrônicas opostas (TREIBER; TREIBER; MEISTER, 2019). MicroRNAs não convencionais conhecidos como Mirtrons, são gerados a partir de íntrons curtos que fazem uso do mecanismo do spliceossoma e seguidos de desramificação para garantir os limites corretos do microRNA precursor (pre-

miRNA) (Figura 1d) e, em alguns casos, os mirtrons ainda podem possuir uma cauda de ribonucleotídeos na extremidade 5' e/ou 3' que são posteriormente removidos pelo complexo exossomo (complexo envolvido na degradação de RNAs, diferente do exossomo – vesícula extracelular) para formar pre-miRNAs funcionais (Figura 1e) (BEREZIKOV, 2011; MIYAKI; ASAHARA, 2012; BUDD, 2016; TREIBER; TREIBER; MEISTER, 2019).

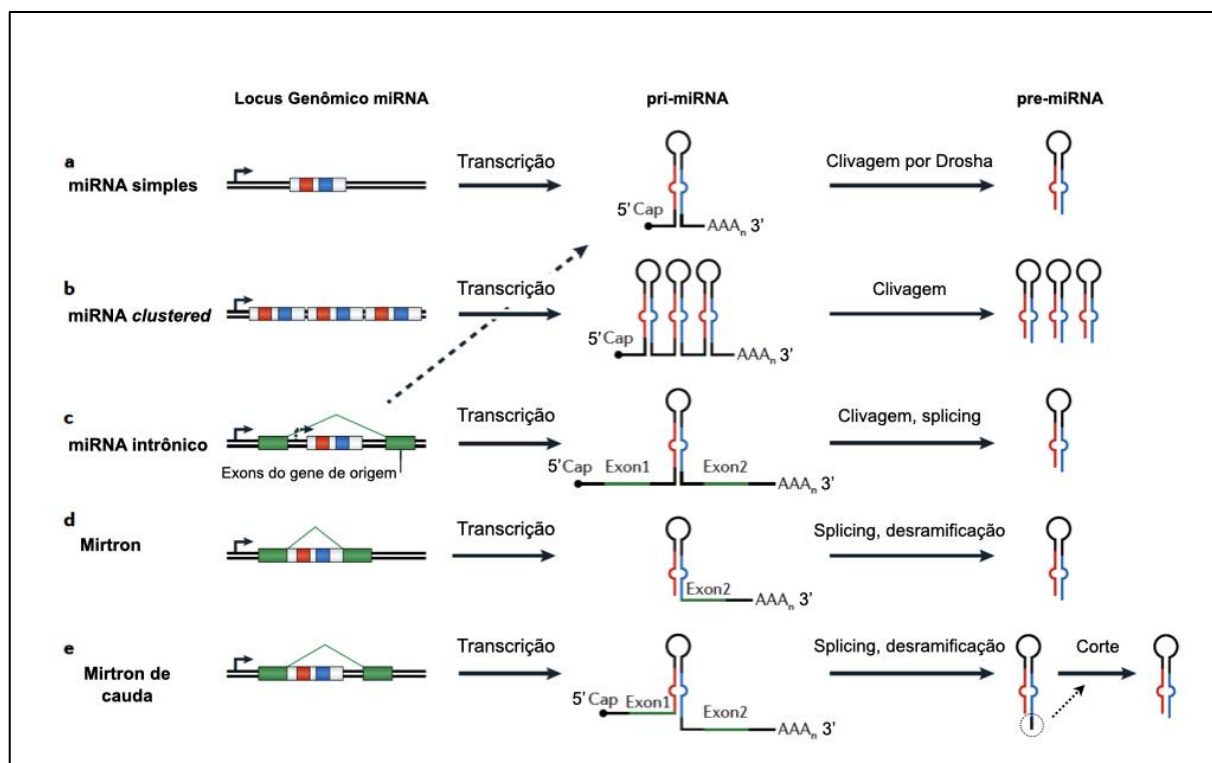


FIGURA 1. O *locus* genômico dos miRNAs transcritos pode diferir, e são codificados nos genomas como unidades transcricionais independentes com seus próprios promotores como os miRNAs simples (a); ou como aglomerados (*clusters*) de vários genes de miRNA transcritos como um único pri-miRNA, mas podem ser clivados posteriormente para formar os miRNAs maduros individuais (b); e, uma parcela considerável de genes de miRNA está localizada em íntrons de genes codificadores de proteínas (c). Mirtrons, são gerados a partir de íntrons curtos que fazem uso do mecanismo do spliceossoma e seguidos de desramificação para garantir os limites corretos do pre-microRNA (d) e, em alguns casos, os mirtrons ainda podem possuir uma cauda de ribonucleotídeos na extremidade 5' e/ou 3' que são posteriormente removidos pelo exossomo para formar pre-miRNAs funcionais (e). Abreviaturas: miRNA, microRNA; pri-miRNA, microRNA primário; pre-miRNA, microRNA precursor. Figura adaptada de: BEREZIKOV, Eugene. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 846-860, 2011.

Para todos os miRNAs (com exceção dos miRNAs oriundos de mirtrons, processados pela via não canônica) após a transcrição, as regiões em *hairpin* nos pri-miRNAs (também chamadas estruturas *stem-loop*) em torno de 60-70nt são reconhecidas e processadas pelo complexo microprocessador. Este complexo contém as endonucleases do tipo RNA polimerase III (RNApol-III), a DiGeorge critical region 8 (DGCR8) que reconhece a região de *loop* terminal e a Drosha que tem a função de clivar a região do tronco de fita dupla (via canônica). O resultado desse processo de clivagem é um miRNA precursor (pre-miRNA) com característica da extremidade 3' com grupo hidroxila (OH), saliências de 2 nt e extremidade 5' fosfato. O pre-miRNA processado é exportado para o citoplasma pela proteína Exportin 5 (Exp5) (Figura 2), onde é reconhecido e processado por outra enzima RNApol-III, a Dicer (BEREZIKOV, 2011; MIYAKI; ASAHARA, 2012; BUDD, 2016; TREIBER; TREIBER; MEISTER, 2019).

No citoplasma, o pre-miRNA é reconhecido pela Dicer, que cliva o *loop* terminal do *hairpin*, reconhecendo apenas o final do *hairpin* do pre-miRNA. A atividade da helicase resulta em um pequeno RNA de fita dupla de 22 a 23 nt chamado miRNA-miRNA* duplex (formado por um miRNA maduro de fita simples e um miRNA* de fita simples, "*" fita afuncional). É formado um complexo de carregamento a partir do agrupamento Dicer, proteína de ligação a RNA responsiva à transativação (TRBP) e proteína Argonauta (AGO) junto ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Sendo a sequência de miRNA* degradada, e a sequência de miRNA maduro transferida associada à proteína AGO e RISC, formando miRISC, onde o miRNA maduro pode direcionar a regulação do mRNA alvo, que contém sequências complementares na região não traduzida 3' (UTR) para a sequência do miRNA maduro (Figura 2) (BEREZIKOV, 2011; MIYAKI; ASAHARA, 2012; BUDD, 2016; TREIBER; TREIBER; MEISTER, 2019).

O miRNA maduro no miRISC serve como um guia para o reconhecimento de mRNAs alvos por pareamento parcial de bases, o que leva a um bloqueio na tradução do alvo de mRNA e/ou sua degradação (BARTEL, 2009).

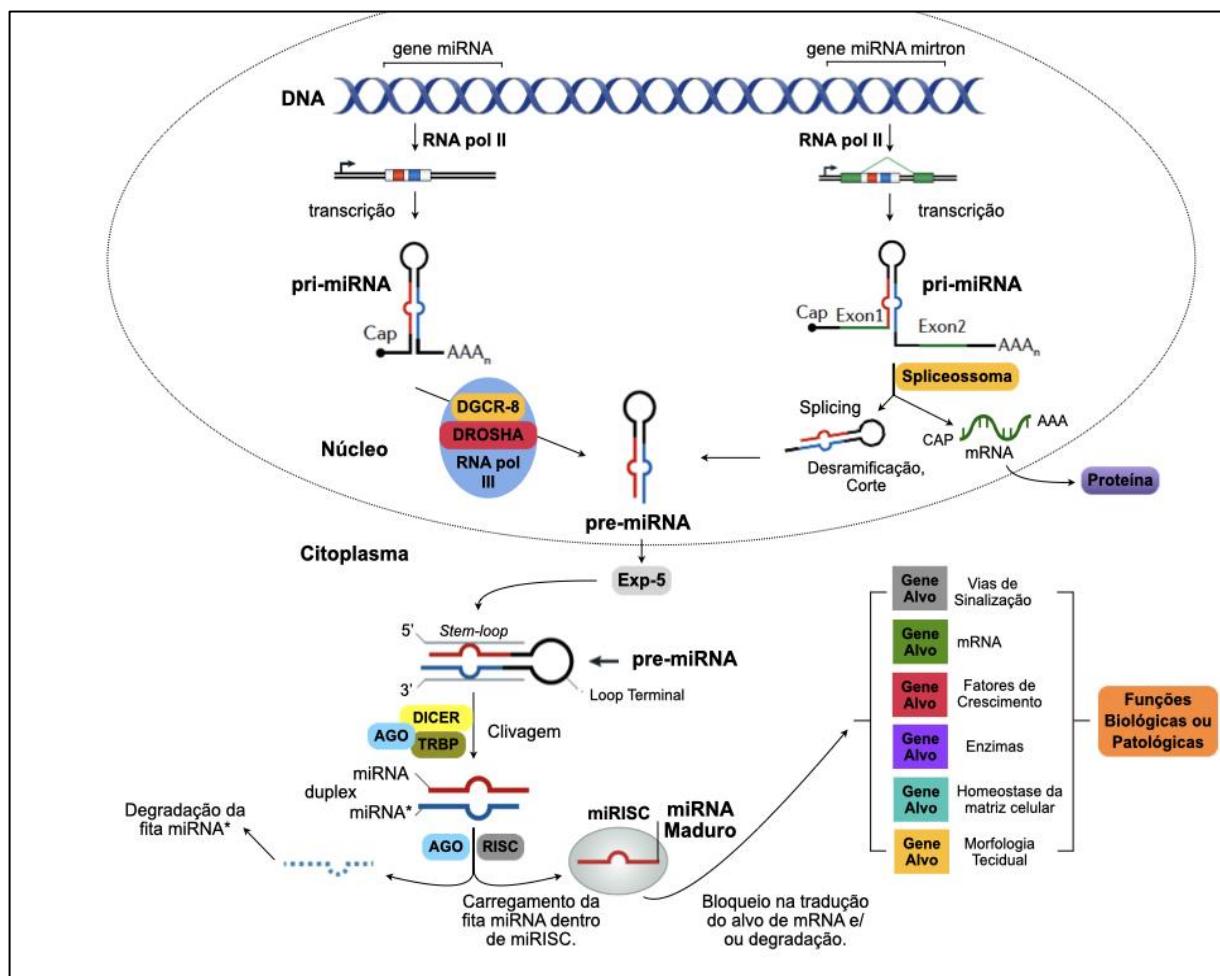


FIGURA 2. A partir de genes de miRNA processados pela via canônica (utilizando RNA pol II e via Drosha), produz transcritos de pri-miRNA, seguido pelo processamento de RNA pol III / DGCR8 / Drosha dos transcritos de pri-miRNA em pre-miRNAs. Os *hairpins* dos pre-miRNAs intrônicos do mirtron também são transcritos pela RNA pol II, e são formados pelo spliceossoma, (splicing, desramificação e corte), ou seja, pela via não-canônica, sem o processamento de Drosha. Os pre-miRNAs gerados por ambas as vias são exportados do núcleo via Exp-5, seguido pelo Dicer/TRBP subsequente clivam o *loop* terminal, que gera RNAs de fita dupla chamados miRNA/miRNA* duplex. As proteínas AGO desenrolam e separam a fita de miRNA da fita miRNA*. A fita miRNA* é degradada. O RISC carrega o miRNA maduro e interage com o 3-UTR do mRNA alvo e regula a expressão gênica por inibição da tradução ou degradação do mRNA. Abreviaturas: miRNA, microRNA; RNA pol II, RNA polimerase II; pri-miRNA, microRNA primário; DGCR-8, DiGeorge critical region 8; mRNA, RNA mensageiro; RNA pol III, RNA polimerase III; pre-miRNA, microRNA precursor; Exp-5, Exportin-5; AGO, Argonauto; TRBP, proteína de ligação a RNA responsiva à transativação; RISC, complexo de silenciamento induzido por RNA; miRISC, complexo de carregamento do miRNA maduro. Adaptado de: BEREZIKOV, Eugene. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 846-860, 2011; MIYAKI, Shigeru; ASAHARA, Hiroshi. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 9, p. 543, 2012; BRONZE-DA-ROCHA, Elsa. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases. **BioMed research**

international, v. 2014, 2014; YU, Xiao-Ming et al. MicroRNAs' involvement in osteoarthritis and the prospects for treatments. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

1.2.4. Osteoartrite

A osteoartrite é uma das principais enfermidades do sistema musculoesquelético que acomete os equinos e seres humanos (FRISBIE et al., 2002). A OA causa dor e incapacidade funcional, gerando grande impacto econômico e social (ANDERSON et al., 2011; MCILWRAITH; FRISBIE; KAWCAK, 2012).

Segundo a Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite – OARSI, a OA é definida como:

“[...] um distúrbio que envolve articulações móveis, caracterizada por alteração celular e degradação da matriz extracelular iniciada por micro e macrolesão que ativa respostas de reparo mal adaptativas, incluindo vias pró-inflamatórias da imunidade inata. A doença se manifesta primeiro como um distúrbio molecular (metabolismo anormal do tecido articular), seguido de distúrbios anatômicos e/ou fisiológicos (caracterizados por degradação da cartilagem, remodelação óssea, formação de osteófitos, inflamação articular e perda da função articular normal), que podem culminar nos sinais clínicos” (KRAUS et al., 2015).

Os fatores de risco que predis põem ao desenvolvimento da OA são: atividade atlética de alta performance, traumas repetitivos, conformação anatômica, idade e hereditariedade (BROMMER et al., 2003; RIGGS, 2006; YTREHUS; CARLSON; EKMAN, 2007; LOESER, 2010). O cavalo de corrida é um atleta que serve de modelo para OA induzida por trauma repetitivo de ocorrência natural (MCILWRAITH; FRISBIE; KAWCAK, 2012) e está associado ao que ocorre em atletas humanos que praticam esportes extenuantes e também sofrem de OA por compressão repetitiva induzida pelo trabalho. Os exemplos incluem OA nos joelhos de jogadores de futebol (MOLLOY; MOLLOY, 2011).

As etiologias da OA incluem trauma, sinovite aguda, osteocondrose ou degeneração por senilidade, e podem afetar cada uma das estruturas articulares de diferentes formas. Além disso, independente do tecido primário afetado, as estruturas desempenham papéis importantes que contribuem para a patogênese global da OA (GOODRICH; NIXON, 2006). O dano à cartilagem articular é comum em cavalos de corrida e apresentam degeneração crônica ou dano agudo ou pós-traumático. Semelhante às classificações ortopédicas humanas, as lesões agudas são tipicamente caracterizadas por áreas focais de perda de cartilagem, sendo que as lesões crônicas permanecem desafiadoras por causa da presença de alteração patológica generalizada que compreende a OA (JOHNSON; FRISBIE, 2016). Relacionado às lesões de cartilagem e ósseas subcondrais na OA equina por trauma de impacto repetitivo, apresentam alterações degenerativas progressivas na cartilagem articular e osso subcondral, incluindo lesões de reabsorção focais marcantes no terceiro osso carpiano de cavalos de corrida sujeitos a trauma repetitivo de alto impacto (LACOURT et al., 2012).

A sinovite aguda e a capsulite são as manifestações mais comuns nas articulações e podem contribuir para o processo de degradação da cartilagem articular pela liberação de enzimas, mediadores inflamatórios e citocinas (MCILWRAITH et al., 2018). O processo inflamatório é iniciado na sinóvia, na cartilagem, na cápsula articular ou no osso subcondral e rapidamente uma cascata de mediadores inflamatórios do tecido primário lesionado é desencadeada (GOODRICH; NIXON, 2006). Assim, os mediadores catabólicos e pró-inflamatórios, como citocinas, óxido nítrico, prostaglandina E2 e neuropeptídeos, que são secretados no microambiente articular alteram o equilíbrio entre degradação e reparo da matriz cartilaginosa, levando à produção excessiva de enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação da cartilagem. Dessa maneira, a alteração da cartilagem, amplifica a inflamação sinovial, criando um *feedback* positivo (SELLAM; BERENBAUM, 2010).

De acordo com Nesic e colaboradores (2006), o processo inflamatório cíclico, esclerose do osso subcondral, perda de glicosaminoglicanos, destruição da matriz extracelular e rede de colágeno mediadas por enzimas e apoptose são fatores que resultam na quebra estrutural e funcional da cartilagem articular,

característica degenerativa e progressiva inerente à OA (NESIC et al., 2006). Essa afirmação, reforça a descrição feita por McIlwraith (1982), sendo a degeneração articular considerada a condição *sine qua non* do estabelecimento da OA (MCILWRAITH, 1982).

Embora diversos fatores de risco e etiologias sejam responsáveis pela progressão da OA, a fase de degradação da cartilagem articular é determinante para estabelecer o prognóstico e a terapêutica. Esta fase do desenvolvimento da OA, é alvo de investigação de diversos pesquisadores.

A homeostase da cartilagem articular é mantida por equilíbrio anabólico/catabólico. O desequilíbrio anabólico/catabólico resulta no aparecimento de alterações degenerativas da cartilagem articular, que demonstra a existência de uma rede de sinalização complexa e interconectada que controla o equilíbrio catabólico e anabólico, indicando que a regulação positiva de fatores catabólicos induz a degradação da cartilagem (BUDD, 2016; BUDD; NALESSO; MOBASHERI, 2018).

A regulação anômala da homeostase articular está relacionada à ação da enzima agreganase-2 ou ADAMTS-5 (tipo de desintegrina e metaloprotease [do tipo reprotisina] com padrão de trombospondina - família das agreganases e metaloproteinases) que promove sinalização para outras enzimas e proteínas inflamatórias que contribuem para degradação da cartilagem articular. Tal enzima age, especificamente na clivagem do agregan que, tem como função manter as ligações da rede de colágeno que formam a matriz extracelular (GLASSON et al., 2005; SANDY et al., 2015; BUDD, 2016).

A regulação da expressão da enzima ADAMTS5 e dos demais mecanismos inflamatórios e proteolíticos é coordenada por expressão gênica e que, por sua vez, depende da expressão de microRNAs. Os efeitos da expressão de microRNAs vêm sendo associados a características fisiopatológicas de diversas enfermidades, e alguns microRNAs têm funções específicas e/ou abrangentes em processos biológicos (BUDD, 2016). Em vista disso, a investigação do papel dos microRNAs na fisiopatologia da OA é amplamente explorada.

1.2.4.1. microRNA-140 na Osteoartrite

Os miRNAs exercem funções na manutenção do balanço anabólico/catabólico em condrócitos articulares. A sinalização atípica pode ter impacto sobre a expressão de miRNAs, e assim induzir alterações na expressão de genes envolvidos no equilíbrio anabólico/catabólico (YU; CHEN; WANG, 2011).

Iliopoulos e colaboradores (2008), investigaram a expressão de miRNAs de cartilagem normal em comparação à cartilagem acometida por OA e identificaram 16 miRNAs. Como exemplo da expressão alterada de microRNAs na OA e a importância sobre a homeostase cartilagem articular, o miRNA-140 tem função direta na manutenção do equilíbrio articular ao inibir o gene da agreganase 2, pois esta enzima atua na degradação de cartilagem e regula positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (ILIOPOULOS et al., 2008). A expressão e função tecido-específica do miRNA-140, na articulação este miRNA regula os processos de manutenção da homeostase e no desenvolvimento ósseo e cartilágneo, estas funções são semelhantes em diferentes espécies, como equinos, humanos e *Rattus norvegicus* (MIYAKI et al., 2009; NAKAMURA et al., 2011; BUECHLI; LAMARRE; KOCH, 2013; VAN DER KOLK; PACHOLEWSKA; GERBER, 2015; YIN et al., 2017).

O miRNA-140 desempenha importantes papéis na formação óssea embrionária e na ossificação endocondral (Figura 3). Dois grupos de pesquisa desenvolveram camundongos que não expressavam miRNA-140 e compararam com aqueles que expressavam miRNA-140. Ambos pesquisadores obtiveram resultados similares, em que os camundongos sem a expressão do miRNA tiveram defeitos no processo de ossificação endocondral, resultando em nanismo e deformidades craniofaciais (MIYAKI et al., 2010; NAKAMURA et al., 2011).

Nakamura e colaboradores (2011) observaram o processo de ossificação endocondral estava ligeiramente avançado devido à diferenciação hipertrófica acelerada de condrócitos em camundongos sem a expressão de miRNA-140. Ao comparar os perfis de RNA associados com a enzima AGO entre os condrócitos de camundongos expressando miRNA-140 e os induzidos a não expressarem,

foi identificado *Dnpep* (que codifica a enzima aspartilamino-peptidase) como um alvo do miRNA-140.

No estudo, a expressão de *Dnpep* foi aumentada nos condrócitos provenientes dos camundongos nulos de miRNA-140. A superexpressão de *Dnpep* mostrou um baixo efeito antagonista na sinalização da Proteína Morfogenética Óssea (BMP) via ativação *Smad*, mas ainda assim, os condrócitos nulos de miRNA-140 apresentaram sinalização da BMP basal inferior ao normal. Desta forma, o *Dnpep* pode degradar cofatores de *Smads* na regulação da transcrição do gene BMP. Os resultados sugerem que a sinalização reduzida de BMP causada pela regulação positiva de *Dnpep* implica em defeitos esqueléticos de camundongos nulos de miRNA-140, demonstrando que o miRNA-140 é essencial para o desenvolvimento normal do osso endocondral (NAKAMURA et al., 2011)

Outro papel significativo ao qual o miRNA-140 está ligado à condrogênese, demonstrado por estudos utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* com a espécie humana e *Rattus norvegicus*. O miRNA-140 mostra-se ser ativado pelo Fator de Transcrição SRYbox9 (SOX9) (Figura 3) e, portanto, se correlaciona com a expressão de SOX9 na condrogênese embrionária e *in vitro* na diferenciação de MSCs (NAKAMURA et al., 2011, 2012; BUECHLI; LAMARRE; KOCH, 2013; TAO et al., 2017).

Karlsen e colaboradores (2014), inibiram a expressão de forma transitória e estável do miRNA-140 em MSCs e condrócitos articulares *in vitro*, e observaram que nas fases diferenciação e de desdiferenciação respectivamente, levou a redução de SOX9 e da proteína agrecan, mas não dos mRNAs correspondentes, indicando que o miRNA-140 induz uma regulação positiva pós-transcricional, ou seja, o miR-140 estimula a condrogênese *in vitro* pela regulação positiva dessas moléculas no nível de proteína (KARLSEN et al., 2014). Este achado corrobora a descrição também de outros estudos da funcionalidade e desenvolvimento dos condrócitos articulares e explica a regulação positiva desse miRNA durante a diferenciação condrogênica *in vitro* de MSCs e o papel na condrogênese *in vivo*.

No microambiente osteoartrítico, o miRNA-140 tem regulação negativa significativa na sua expressão em comparação à cartilagem normal (MIYAKI et

al., 2009; TARDIF et al., 2009). A exemplo da regulação do miRNA-140 na OA, no estudo realizado por Miyaki e colaboradores (2009) foi observada a regulação negativa do miRNA-140 após o tratamento de condrócitos com IL-1 β , esse tratamento também induziu a regulação positiva da expressão de ADAMTS-5. Este fato demonstrou que a transfecção do miRNA-140 em condrócitos foi capaz de suprimir a expressão de ADAMTS-5 (enzima descrita na seção 1.2.1.) induzida por IL-1 β e aumentar a expressão de agrecan. Resultado importante, visto que o agrecan é o principal proteoglicano da cartilagem e dá a esse tecido sua capacidade de suportar cargas e resistir à compressão, e quando sujeito à diferentes graus de degradação durante a evolução da OA .

Assim, sugere-se que o miRNA-140 tem como alvo direto a agrecanase-2, tendo como uma das funções na cartilagem articular, regular os níveis de ADAMTS-5 obtendo um papel protetivo da cartilagem (MIYAKI et al., 2009, 2010; BUDD, 2016).

A administração exógena de miRNA-140 em áreas de lesão da cartilagem articular ou articulações com OA, pode prevenir ou retardar a clivagem do agrecan, através do miRNA direcionado à regulação negativa da expressão de ADAMTS-5 (Figura 3) (DESJARDIN et al., 2014; CAPORALI; KUYKENDALL; STEWART, 2015; BUDD, 2016; QIU et al., 2018; YOO et al., 2018).

Pode-se utilizar como estratégia terapêutica a utilização de miRNAs miméticos, os quais têm a mesma sequência que os miRNAs de ocorrência natural. Isso permite que o miRNA mimetize o alvo e ajuste os mRNAs que são regulados pelos miRNAs endógenos. Em geral os miRNAs miméticos têm como alvo muitos mRNAs que podem estar relacionados a mecanismos de vias celulares semelhantes. Portanto, a modulação de um único miRNA, pode resultar na regulação negativa simultânea de um amplo conjunto de alvos e assim ter um maior impacto (BUDD; NALESSO; MOBASHERI, 2018).

Desta forma, a possível administração exógena de miRNA-140 representa uma inovação no tratamento da OA equina, com potencial ação de proteção da cartilagem, regulação da homeostase articular e consequente controle da progressão da OA (SI et al., 2020).

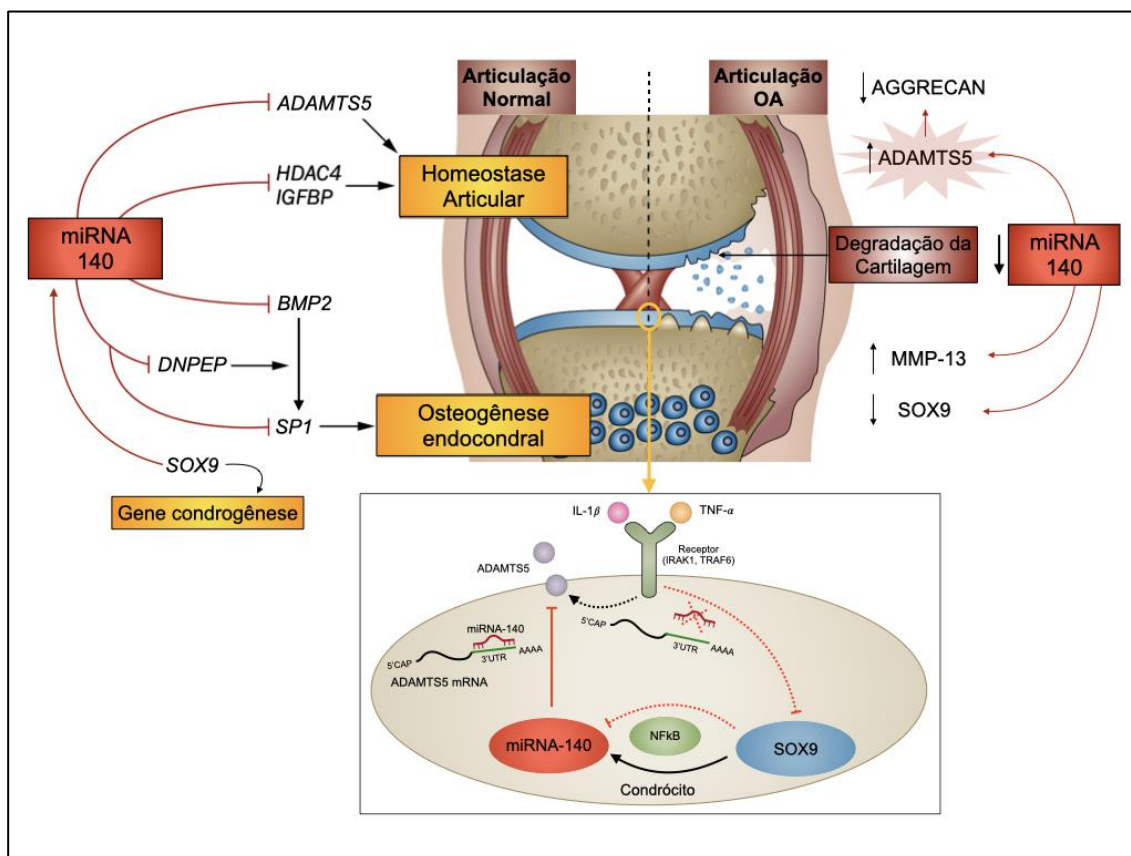


FIGURA 3. Funções do microRNA-140, atuação na osteogênese endocondral e no mecanismo da homeostase articular, mostrando estas funções em articulações normais e em articulações com osteoartrite. Um processo singular da função do miRNA-140 está ligado a repressão de diversos genes-alvo (transcritos de mRNA) no mesmo processo biológico, como na homeostase articular e ossificação endocondral. A figura em destaque representa a função do miRNA-140 durante a manutenção da homeostase articular e no processo de OA. Na manutenção da homeostase articular o miRNA-140 é ativado por SOX9 via fator de transcrição NFκB e tem como alvo o mRNA 3'UTR da ADAMTS5, isso resulta em regulação negativa dessa enzima, o que impede que esta degrade o agregan presente na cartilagem articular (linhas pretas e vermelhas contínuas). No processo de OA, esse equilíbrio articular é desregulado e a expressão de miRNA-140 é reduzida em resposta a mediadores pró-inflamatórios, sua perda prejudica o equilíbrio da homeostase da cartilagem, o que gera um *feedback* positivo da estimulação da ADAMTS5 por via desses mediadores pró-inflamatórios (IL1β e TNF-α), os quais inativam SOX9 e perpetuam a ação da ADAMTS5, que em resposta estimula a ação de IL-1beta (linhas vermelhas e pretas tracejadas) o que contribui para o aumento da degradação do agregan. Abreviaturas: OA, osteoartrite; miRNA-140, microRNA-140; ADAMTS5, Desintegrina e Metaloprotease com padrão de Trombospondina; HDAC4, gene da Histona Desacetilase; IGFBP, Proteína de ligação do Fator de Crescimento tipo Insulina; BMP2, Proteína Morfogenética Óssea 2; DNPEP, gene da Aspartil Aminopeptidase; SP1, Proteína específica 1 – fator de transcrição da BMP; SOX9, Fator de Transcrição SRYbox9; MMP-13, Metaloproteinase 13; IL-1β, Interleucina 1 beta; TNF-α, Fator de Necrose Tumoral alfa; IRAK1, Quinase 1 associada ao Receptor de IL-1; TRAF6, Receptor 6

associado a TNF; 3'UTR, *Untranslated Region* extremidade 3. Adaptado de: MIYAKI, Shigeru; ASAHARA, Hiroshi. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 9, p. 543, 2012; BUDD, Emma. MicroRNAs in osteoarthritis and chondrogenesis. 2016. Tese de Doutorado. University of Southampton.

1.3. Justificativa

Tendo em vista o potencial terapêutico das eqSMMSC na OA equina, bem como os diversos estudos já desenvolvidos, relacionados à ação parácrina das MSCs, a capacidade terapêutica dessas células pode ser explorada com a utilização das VEs por elas secretadas como carreadoras de microRNAs específicos, que atuem na homeostase articular e na condrogênese. Desta forma, pode-se conjecturar uma potencial terapia gênica, em que a medicina individualizada estará mais embasada e difundida. Além disso, ressalta-se também a possibilidade de projeção para a medicina humana, em que a atuação e expressão do miRNA-140 no ambiente articular (tecido-específico) ocorre da mesma forma, assim contribuindo para a medicina translacional e o estado da arte da OA multiespécies.

1.4. Hipótese

As eqSMMSC são capazes de secretar vesículas extracelulares expressando *eca-mir-140-5p* (microRNA-140 e *eca* - *equus caballus*). A expressão de miRNA-140 é ainda favorecida após organização tridimensional das eqSMMSC em cápsulas de hidrogel de alginato (mesmo quando submetidas ao cultivo com meio mimetizando o ambiente inflamatório da osteoartrite (Figura 6)).

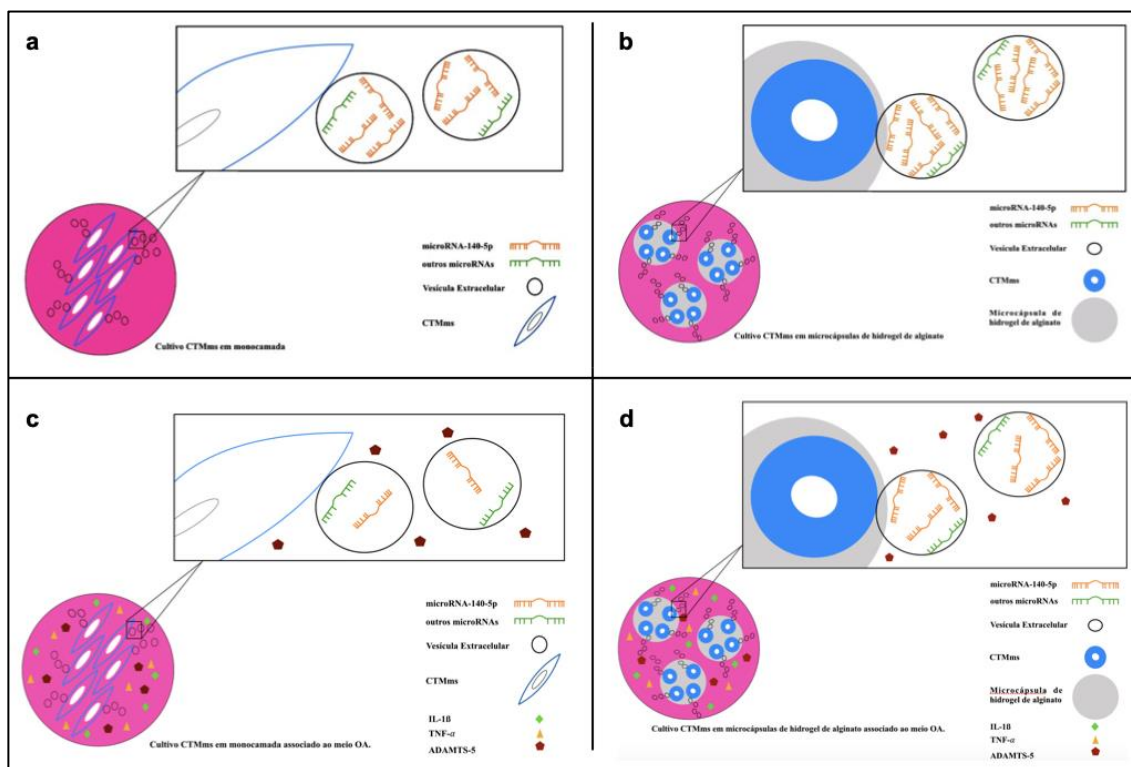


FIGURA 6. Hipótese experimental. Cultivo em monocamada de células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial (eqSMMSC) secretando vesículas extracelulares, “a”; cultivo de eqSMMSC inseridas em microcápsulas de hidrogel de alginato secretando vesículas extracelulares, “b”; Cultivo em monocamada de eqSMMSC, em meio “OA-Like” (mimetizando o ambiente osteoartrítico) e secretando vesículas extracelulares, “c”; cultivo de eqSMMSC inseridas em microcápsulas de hidrogel de alginato, em meio inflamatório “OA-Like” e secretando vesículas extracelulares, “d”. Acredita-se que as eqSMMSC são capazes de secretar vesículas extracelulares expressando *eca-mir-140-5p* devido à proximidade entre as eqSMMSC e os condrócitos no processo de embriogênese. A expressão de miRNA-140 é ainda favorecida após organização tridimensional das eqSMMSC em microcápsulas de hidrogel de alginato. Abreviaturas: eqSMMSC, células tronco derivadas de membrana sinovial; IL-1 β , Interleucina – 1 beta; TNF- α , Fator de Necrose Tumoral – alfa; ADAMTS5, Desintegrina e Metaloprotease com padrão de Trombospondina tipo 5.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é caracterizar VEs secretadas por eqSMMSC e avaliar a expressão de microRNA-140 intravesicular em dois modelos de cultivo celular, células cultivadas em monocamada e em cápsulas de hidrogel de

alginate, bem como comparar a secreção de VEs e a expressão do microRNA quando desafiadas ao ambiente de osteoartrite *in vitro*.

1.5.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar as vesículas extracelulares por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- b) Avaliar a expressão de tetraspaninas (CD9, CD63 e CD81) nas VEs;
- c) Detectar e quantificar a expressão de *eca-mir-140-5p* nas VEs, eqSMMSC pelo método de RT-qPCR, em ambos os métodos e ambientes de cultivo;
- d) Detectar e quantificar a expressão de *ADAMTS5* nas VEs pelo método de RT-qPCR, em ambos os métodos e ambientes de cultivo.

1.6. Referências¹

- AL-NEDAWI, K. et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 619–624, 2008.
- ANDERSON, D. D. et al. Post-traumatic osteoarthritis: Improved understanding and opportunities for early intervention. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 6, p. 802–809, 2011.
- BAIETTI, M. F. et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 7, p. 677–685, 2012.
- BARRACHINA, L. et al. Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential. **Stem Cells and Development**, v. 26, n. 1, p. 15–24, 2017.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009.
- BEREZIKOV, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 846–860, 2011.
- BOEUF, S. et al. Regulation of aggrecanases from the ADAMTS family and

¹ Foi utilizada a norma ABNT no programa Mendeley versão 1.19.4.

- aggrecan neoepitope formation during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. **European Cells and Materials**, v. 23, p. 320–332, 2012.
- BOLUKBASI, M. F. et al. MiR-1289 and “zipcode”-like sequence enrich mRNAs in microvesicles. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 1, n. 2, p. e10, 2012.
- BROMMER, H. et al. Quantification and age-related distribution of articular cartilage degeneration in the equine fetlock joint. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 7, p. 697–701, 2003.
- BUDD, E. MicroRNAs in Osteoarthritis and Chondrogenesis. **2016**, n. August, 2016. Disponível em: <https://eprints.soton.ac.uk/407447/1/Emma_Budd_PhD_THESIS_08_09_2016_MicroRNAs_in_OA_Chondrogenesis_Pdf.pdf>.
- BUDD, E.; NALESSO, G.; MOBASHERI, A. Extracellular genomic biomarkers of osteoarthritis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 1, p. 55–74, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1415757>>.
- BUECHLI, M. E.; LAMARRE, J.; KOCH, T. G. MicroRNA-140 Expression During Chondrogenic Differentiation of Equine Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 8, p. 1288–1296, 15 abr. 2013. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2012.0411>>.
- CAMUSSI, G. et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. **Kidney International**, v. 78, n. 9, p. 838–848, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.278>>.
- CAPLAN, A. I. **Mesenchymal stem cells: Time to change the name! Stem Cells Translational Medicine**, 2017. .
- CAPORALI, E. H. G.; KUYKENDALL, T.; STEWART, M. C. Complete sequencing and characterization of equine aggrecan. **Vet Comp Orthop Traumatol**, n. 2, p. 79–87, 2015.
- CARVALHO, A. M. et al. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, n. 5, p. 635–638, 2014.
- CASSANO, J. M. et al. The immunomodulatory function of equine MSCs is enhanced by priming through an inflammatory microenvironment or TLR3 ligand. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 195, n. October 2017, p. 33–39, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.10.003>>.

CASSANO, J. M. et al. Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018b.

CHAIROUNGDUAN, A. et al. Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 6, p. 1079–1091, 2010.

CHEN, Y. et al. Exosomes derived from mature chondrocytes facilitate subcutaneous stable ectopic chondrogenesis of cartilage progenitor cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2018.

COLLINO, F. et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, 2010.

COLOMBO, M. et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 24, p. 5553–5565, 2013.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 255–289, 2014.

CRIVELLI, B. et al. Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 262, n. June, p. 104–117, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.023>>.

CRIVELLI, B. et al. Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 262, n. June, p. 104–117, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.023>>.

DEREGIBUS, M. C. et al. Charge-based precipitation of extracellular vesicles. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 5, p. 1359–1366, 2016.

DESJARDIN, C. et al. Next-generation sequencing identifies equine cartilage and subchondral bone miRNAs and suggests their involvement in osteochondrosis physiopathology. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014.

DUAN, L. et al. Recent progress on the role of miR-140 in cartilage matrix remodelling and its implications for osteoarthritis treatment. **Arthritis Research**

and Therapy, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2020.

EDGAR, J. R.; EDEN, E. R.; FUTTER, C. E. Hrs- and CD63-Dependent Competing Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles. **Traffic**, v. 15, n. 2, p. 197–211, 2014.

FOSANG, A. J. et al. ADAMTS-5: The story so far. **European Cells and Materials**, v. 15, p. 11–26, 2008.

FRISBIE, D. D. et al. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. **Gene Therapy**, v. 9, n. 1, p. 12–20, 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/3301608.pdf>>.

GIBBINGS, D. J. et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 1143–1149, 2009.

GLASSON, S. S. et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. **Nature**, v. 434, p. 644, 31 mar. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature03369>>.

GOÑI, F. M.; ALONSO, A. Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, n. 1, p. 169–177, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.002>>.

GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - A review. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 1, p. 51–69, 2006.

GOULD, S. J.; RAPOSO, G. As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, 2013.

HE, L. et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2020.

HRISTOV, M. et al. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2761–2766, 2004.

HU, N. et al. Chondrogenic induction of human osteoarthritic cartilage-derived mesenchymal stem cells activates mineralization and hypertrophic and osteogenic gene expression through a mechanomiR. **Arthritis Research and Therapy**, v. 21,

n. 1, p. 1–14, 2019.

HWANG, W. L. et al. Tumor stem-like cell-derived exosomal RNAs prime neutrophils for facilitating tumorigenesis of colon cancer. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2019.

ILIOPOULOS, D. et al. Integrative MicroRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, 2008.

IRION, U.; ST JOHNSTON, D. bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. **Nature**, v. 445, n. 7127, p. 554–558, 2007.

JOHNSON, C. I.; ARGYLE, D. J.; CLEMENTS, D. N. In vitro models for the study of osteoarthritis. **Veterinary Journal**, v. 209, p. 40–49, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.07.011>>.

JOHNSON, S. A.; FRISBIE, D. D. Cartilage Therapy and Repair in Equine Athletes. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 26, n. 3, p. 155–165, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.oto.2016.06.005>>.

JOHNSTONE, R. M. et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 19, p. 9412–9420, 1987.

KAHLERT, C. et al. Identification of doublestranded genomic dna spanning all chromosomes with mutated KRAS and P53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 7, p. 3869–3875, 2014.

KAJIMOTO, T. et al. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. **Nature Communications**, v. 4, 2013.

KALRA, H.; DRUMMEN, G. P. C.; MATHIVANAN, S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, 2016.

KARLSEN, T. A. et al. MicroRNA-140 targets RALA and regulates chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by translational enhancement of SOX9 and ACAN. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 3, p. 290–304, 2014.

KARLSEN, T. A. et al. microRNA-140 Inhibits Inflammation and Stimulates Chondrogenesis in a Model of Interleukin 1 β -induced Osteoarthritis. **Molecular**

Therapy - Nucleic Acids, v. 5, n. July, p. e373, 2016.

KLUMPERMAN, J.; RAPOSO, G. The complex ultrastructure of the endolysosomal system. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, 2014.

KLYMIUK, M. C. et al. Exosomes isolation and identification from equine mesenchymal stem cells. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2019.

KOBAYASHI, H. et al. Transcriptional induction of ADAMTS5 protein by nuclear factor- κ B (NF- κ B) family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 40, p. 28620–28629, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.452169>>.

KOSAKA, N. et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 23, p. 17442–17452, 2010.

KOWAL, J. et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 8, p. E968–E977, 2016.

KRAUS, V. B. et al. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 8, p. 1233–1241, 2015.

KUYINU, E. L. et al. Animal models of osteoarthritis: Classification, update, and measurement of outcomes. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 11, n. 1, p. 1–27, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13018-016-0346-5>>.

LACOURT, M. et al. Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 6, p. 572–583, 2012.

LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 853–858, 2001.

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. MicroRNAs of Equine Amniotic Mesenchymal Cell-derived Microvesicles and Their Involvement in Anti-inflammatory Processes. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 1, p. 45–54, 2018a.

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. **Different culture times affect MicroRNA cargo in**

equine amniotic mesenchymal cells and their microvesicles**Tissue Engineering - Part C: Methods**, 2018b. .

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Priming with inflammatory cytokines is not a prerequisite to increase immune-suppressive effects and responsiveness of equine amniotic mesenchymal stromal cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2020.

LÄSSER, C.; ELDH, M.; LÖTVALL, J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. **Journal of Visualized Experiments**, n. 59, p. 1–6, 2012.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LEE, R.; FEINBAUM, R.; AMBROS, V. The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, p. 843–854, 1993.

LI, Z. et al. Tracing GFP-labeled WJMSCs in vivo using a chronic salpingitis model: An animal experiment. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2017.

LIU, S. et al. Connexin43 mediated delivery of ADAMTS5 targeting siRNAs from mesenchymal stem cells to synovial fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–15, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LO CICERO, A.; STAHL, P. D.; RAPOSO, G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: For good or for bad. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 35, p. 69–77, 2015.

LOESER, R. Age-Related Changes in the Mus. **Clin Geriatr Med.**, v. 26, n. 3, p. 371–386, 2010.

MATEESCU, B. et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - An ISEV position paper. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 6, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1286095>>.

MCILWRAITH, C. W. Current concepts in equine degenerative joint disease. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 180, p. 239–250,

1982.

MCILWRAITH, C. W. et al. Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 3, p. 823–831, 2018.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. **Bone & Joint Research**, v. 1, n. 11, p. 297–309, 2012.

MCKENZIE, A. J. et al. KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. **Cell Reports**, v. 15, n. 5, p. 978–987, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.085>>.

MINCIACCHI, V. R.; FREEMAN, M. R.; DI VIZIO, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 40, p. 41–51, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.010>>.

MIYAKI, S. et al. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 9, p. 2723–2730, 2009.

MIYAKI, S. et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. **Genes and Development**, v. 24, n. 11, p. 1173–1185, 2010.

MIYAKI, S.; ASAHARA, H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 9, p. 543–552, 2012.

MOBASHERI, A. et al. Osteoarthritis Year in Review 2016: biomarkers (biochemical markers). **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, n. 2, p. 199–208, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2016.12.016>>.

MOLLOY, M. G.; MOLLOY, C. B. Contact sport and osteoarthritis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 4, p. 275–277, 2011.

MULCAHY, L. A.; PINK, R. C.; CARTER, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2014.

NAKAMURA, Y. et al. Chondrocyte-Specific MicroRNA-140 Regulates Endochondral Bone Development and Targets Dnpep To Modulate Bone Morphogenetic Protein Signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 14, p. 3019–3028, 2011.

NAKAMURA, Y. et al. Sox9 is upstream of microRNA-140 in cartilage. **Applied**

Biochemistry and Biotechnology, v. 166, n. 1, p. 64–71, 2012.

NESIC, D. et al. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease.

Advanced Drug Delivery Reviews, v. 58, n. 2, p. 300–322, 2006.

NOLTE'T HOEN, E. N. M. et al. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 18, p. 9272–9285, 2012.

PARK, K. S. et al. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2019.

PATEL, G. K. et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

PEGTEL, D. M. et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 14, p. 6328–6333, 2010.

PEREZ-HERNANDEZ, D. et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 17, p. 11649–11661, 2013.

PERRINI, C. et al. Microvesicles secreted from equine amniotic-derived cells and their potential role in reducing inflammation in endometrial cells in an in-vitro model. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0429-6>>.

PICCIN, A.; MURPHY, W. G.; SMITH, O. P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. **Blood Reviews**, v. 21, n. 3, p. 157–171, 2007.

QIU, G. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles affect disease outcomes via transfer of microRNAs. **Stem cell research & therapy**, v. 9, n. 1, p. 320, 2018.

RAGNI, E. et al. Inflammatory priming enhances mesenchymal stromal cell secretome potential as a clinical product for regenerative medicine approaches through secreted factors and EV-miRNAs: the example of joint disease. **Stem cell**

research & therapy, v. 11, n. 1, p. 165, 2020.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

RATAJCZAK, J. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **Leukemia**, v. 20, n. 5, p. 847–856, 2006.

RIBITSCH, I. et al. Large Animal Models in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: To Do or Not to Do. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. August, p. 1–28, 2020.

RIGGS, C. M. Osteochondral injury and joint disease in the athletic horse. **Equine Veterinary Education**, v. 18, n. 2, p. 100–112, 2006.

SANDY, J. D. et al. Human genome-wide expression analysis reorients the study of inflammatory mediators and biomechanics in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 11, p. 1939–1945, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.027>>.

SANTOS, V. H. Dos et al. Evaluation of alginate hydrogel encapsulated mesenchymal stem cell migration in horses. **Research in Veterinary Science**, v. 124, n. February, p. 38–45, 2019.

SANTOS, V. H. et al. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 114, 27 dez. 2018. Disponível em: <<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1425-0>>.

SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 11, p. 625–635, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.159>>.

SHEN, B. et al. Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 51, p. 44162–44176, 2011.

SHURTLEFF, M. J. et al. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. **eLife**, v. 5, n. AUGUST, p. 1–23, 2016.

SI, H. bo et al. miR-140 Attenuates the Progression of Early-Stage Osteoarthritis

by Retarding Chondrocyte Senescence. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 19, n. 37, p. 15–30, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.10.032>>.

STUFFERS, S. et al. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. **Traffic**, v. 10, n. 7, p. 925–937, 2009.

SUN, L.; WANG, X.; KAPLAN, D. L. A 3D cartilage - Inflammatory cell culture system for the modeling of human osteoarthritis. **Biomaterials**, v. 32, n. 24, p. 5581–5589, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.028>>.

SYLVESTER, J. et al. Interleukin-1 induction of aggrecanase gene expression in human articular chondrocytes is mediated by mitogen-activated protein kinases. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 563–574, 2012.

TAO, S. C. et al. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. **Theranostics**, v. 7, n. 1, p. 180–195, 2017.

TARDIF, G. et al. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2009.

TENG, Y. et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

THAKUR, B. K. et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. **Cell Research**, v. 24, n. 6, p. 766–769, 2014.

THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, 2018.

TRAJKOVIC, K. et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. **Science**, v. 319, n. 5867, p. 1244–1247, 2008.

TREIBER, T.; TREIBER, N.; MEISTER, G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 5–20, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>>.

- VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654–659, 2007.
- VAN DER KOLK, J. H.; PACHOLEWSKA, A.; GERBER, V. **The role of microRNAs in equine medicine: a review** *Veterinary Quarterly*, 2015. .
- VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 213–228, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.125>>.
- VIÑUELA-BERNI, V. et al. Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 180, n. 3, p. 442–451, 2015.
- WESTACOTT, C. I. et al. Tumor necrosis factor alpha can contribute to focal loss of cartilage in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 8, n. 3, p. 213–221, 2000.
- WILLMS, E. et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–12, 2016.
- YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 2015, p. 1–60, 2015.
- YANG, J. M.; GOULD, S. J. The cis-acting signals that target proteins to exosomes and microvesicles. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 1, p. 277–282, 2013.
- YIN, C. M. et al. Dysregulation of both miR-140-3p and miR-140-5p in synovial fluid correlate with osteoarthritis severity. **Bone and Joint Research**, v. 6, n. 11, p. 612–618, 2017.
- YOO, K. W. et al. Large-Scale preparation of extracellular vesicles enriched with specific microRNA. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 24, n. 11, p. 637–644, 2018.
- YTREHUS, B.; CARLSON, C. S.; EKMAN, S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 4, p. 429–448, 2007.
- YU, C.; CHEN, W. P.; WANG, X. H. MicroRNA in osteoarthritis. **Journal of International Medical Research**, v. 39, n. 1, p. 1–9, 2011.

ZECH, D. et al. Tumor-exosomes and leukocyte activation: An ambivalent crosstalk. **Cell Communication and Signaling**, v. 10, p. 1–17, 2012.

ZHANG, D. et al. Enrichment of selective miRNAs in exosomes and delivery of exosomal miRNAs in vitro and in vivo. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 312, n. 1, p. L110–L121, 2016a.

ZHANG, S. et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 12, p. 2135–2140, 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2016.06.022>>.

Capítulo 2

Este trabalho, será submetido ao periódico *Stem Cell Research & Therapy* (fator de impacto 2019 - JCR 5.116), revista indexada pela editora BioMed Central. Guias para submissão de artigos:

<https://stemcellres.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research>

<https://stemcellres.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript#preparing+figures>

2.1. Artigo Científico

Vesículas extracelulares expressam microRNA-140 na regulação da sinalização parácrina exercida por células-tronco derivadas de membrana sinovial equina em ambiente inflamatório *in vitro*

João Pedro Hübbe Pfeifer^a, Célio J. da Costa Fernandes^b, Gustavo Santos Rosa^a, Fernanda de Castro Stievani^a, Emanuel Vitor Pereira Apolonio^a, Mariana Correa Rossi^a, Willian Fernando Zambuzzi^c, Ana Liz Garcia Alves^a.

^a Laboratório de Medicina Regenerativa, Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

^b Laboratório de Biologia Celular e do Exercício, Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade de Campinas - UNICAMP, Limeira, São Paulo, Brasil.

^c Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular, Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Instituto de Biologia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

- **Introdução:** A função parácrina das células-tronco (MSCs) é desempenhada também pelas vesículas extracelulares (VEs). Assim, as VEs têm impacto funcional nas células-alvo e nos mecanismos de controle de enfermidades por meio da entrega de microRNAs. A exemplo, na osteoartrite, em que a

homeostase articular é regulada pelo microRNA-140, o qual sofre regulação negativa na sua expressão em comparação à cartilagem normal. Isto se dá, pelo alvo de inibição do microRNA-140 que é o mRNA da enzima ADAMTS-5 que age na clivagem no agrecan e sinaliza para outras proteínas pró-inflamatórias. O objetivo do estudo foi isolar e caracterizar VEs secretadas por células-tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina (eqSMMSCs) em cultivo celular expostas à ambiente inflamatório *in vitro*, além de analisar a expressão do microRNA-140 em VEs e células e o ADAMTS5 em VEs.

• **Métodos:** Quatro grupos experimentais foram definidos. Grupos controle, um cultivo de eqSMMSCs em monocamada (2D) e um cultivo de eqSMMSCs tridimensional (3D). Grupos expostos ao meio inflamatório, também divididos em monocamada (2D-OA) e tridimensional (3D-OA), porém foram expostos ao meio de cultivo simulando o ambiente inflamatório da osteoartrite “OA-Like” (IL-1 β e TNF- α). Amostras dos meios de cultivo de todos os grupos foram coletadas após 24, 72 e 120 horas de incubação para isolamento e caracterização de VEs. O isolamento de VEs foi realizado com kit comercial pelo método de precipitação. Já para caracterização foi realizada análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e expressão de mRNA das tetraspaninas CD9, CD63 e CD81. Também foi realizada a análise da expressão do microRNA-140 em VEs e células por RT-qPCR e do mRNA da ADAMTS5 também por RT-qPCR nas VEs. Para análise dos ensaios de expressão do microRNA, expressão gênica, concentração e tamanho das VEs, os dados passaram por um teste de normalidade (Shapiro Wilk). Em seguida foram realizadas múltiplas comparações através da análise de variância (One-way) ou Kruskal Wallis. Para as análises de duplas comparações foi aplicado Teste-T ou Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%. A análise de correlação foi realizada pelo teste de correlação de Pearson, analisando os valores do coeficiente de correlação de Pearson (P).

• **Resultados:** As VEs foram isoladas e caracterizadas em todos os grupos e momentos experimentais. A expressão do microRNA-140 nas células, o grupo 3D-OA teve maior expressão em relação aos demais grupos nos momentos 24 h: 2D (P = 0,0001), 3D (P < 0,0001) e 2D-OA (P < 0,0001); e 72 h: a ambos os controles (P < 0,0001) e ao 2D-OA (P < 0,0001); no momento 120 h, houve maior

expressão do grupo 3D versus 2D-OA ($P = 0,0005$) e versus 3D-OA ($P < 0,0001$). Já a expressão do microRNA-140 nas VEs, destaca-se no momento 72 h, o grupo 3D teve maior expressão em relação aos demais, 2D ($P < 0,0001$), 2D-OA ($P < 0,0001$) e 3D-OA ($P < 0,0001$) e no momento 120 h, a maior expressão do 2D-OA em relação aos demais 3D ($P < 0,0001$), 2D ($P < 0,0001$) e 3D-OA ($P < 0,0001$). Na análise da expressão do mRNA ADAMTS5, pode-se destacar o momento 120 h, onde o grupo 3D-OA obteve maior expressão em relação aos controles 2D ($P = 0,0006^{***}$) e 3D ($P = 0,0004^{***}$).

• **Conclusão:** Os dados obtidos apontaram que o modelo e as técnicas utilizadas foram eficazes para o isolamento e caracterização das VEs e para a identificação da expressão de microRNA nos diferentes grupos e momentos. A expressão do microRNA-140 em resposta ao ambiente inflamatório é desempenhada por eqSMMSCs, sendo que, em células 3D demonstrou-se ser rápida e em VEs oriundas de células cultivadas em 2D tardia.

• **Palavras-chave:** exossomos, microRNA, osteoartrite, proloterapia, nanotecnologia

Introdução

Nos dias atuais, diversos estudos já descreveram as variadas funções e ações inerentes às células-tronco mesenquimais (MSCs), e, além, do potencial já conhecido, como secretoras de fatores parácrinos e diferenciação celular para o tecido afetado [1–3], as MSCs possuem grande capacidade para serem utilizadas como fontes produtoras de fatores bioativos para auxiliar na atenuação ou reparação de enfermidades [4–7].

Dentre os mecanismos exercidos pelas MSCs, a função parácrina é desempenhada também por vesículas extracelulares (VEs) que são liberadas pelas células no meio extracelular, estas têm sido consideradas como fontes de transporte dos componentes funcionais da ação parácrina das MSCs [5,8,9]. Assim, as MSCs e suas VEs secretadas retêm grande potencial como “*drug delivery*” de nova geração, graças à sua capacidade de encapsular moléculas terapêuticas e ao seu tropismo fisiológico para alcançar os locais afetados [10].

Relacionado ao conteúdo transportado das VEs estão os microRNAs, considerados pequenos RNAs não codificantes endógenos, que têm íntima função na expressão de diversos genes a fim de manter a regulação celular em homeostase [11]. Exemplificando, como as células utilizam as VEs para transporte de microRNAs e assim atuam na comunicação celular, estes manifestam efeitos de interferência nos mRNAs das células receptoras [12,13]. Isto significa, que as VEs têm impacto funcional nas células-alvo e por consequência em mecanismos de controle de enfermidades por meio da entrega de microRNAs, tanto em humanos, quanto em equinos [5,6,14].

Na face das enfermidades musculoesqueléticas, as descobertas científicas nos modelos experimentais animais além de serem utilizadas nos próprios animais, podem ser projetadas de um modo translacional para a medicina humana. Uma vez que equinos [15] e ovinos são considerados modelos experimentais ortopédicos para as enfermidades musculoesqueléticas de humanos, principalmente quando relacionado a osteoartrite (OA), devido a ocorrência natural desta enfermidade nestas espécies [16,17].

O desenvolvimento da OA é multifatorial e de grande ocorrência nas espécies humana e equina [18]. No âmbito molecular, quando o ambiente de OA está instalado, alguns microRNAs, como o microRNA-140, sofrem regulação negativa, tornando o microambiente articular propício à progressão e perpetuação desta enfermidade [11,19,20].

O microRNA-140 tem função direta na manutenção da homeostase articular [21], sendo que sua expressão e função são tecido-específica em diferentes espécies, como equinos, humanos e camundongos [22–26]. No microambiente osteoartrítico, o microRNA-140 tem regulação negativa significativa na sua expressão em comparação à cartilagem normal [22,27], dado o aumento da expressão do seu mRNA alvo a ADAMTS5 [28].

ADAMTS5 é o gene (mRNA) precursor para síntese da enzima agrecanase-2 ou ADAMTS-5 (tipo de desintegrina e metaloprotease [do tipo reprotisina] com padrão de trombospondina - família das agrecanases e metaloproteínas), esta promove sinalização para outras enzimas e proteínas inflamatórias, como a IL-1 β , que contribuem para degradação da cartilagem articular [29,30]. Tal enzima age, especificamente na clivagem do

agrecan, o qual tem como função manter as ligações da rede de colágeno que formam a matriz extracelular da cartilagem, e assim induzem a regulação anômala da homeostase articular [31].

A exemplo da regulação do microRNA-140 na OA, no estudo de Miyaki e colaboradores (2009) foi demonstrado a regulação negativa dos níveis de microRNA-140 após o tratamento de condrócitos com IL-1 β , este tratamento também induziu a regulação positiva da expressão gênica de ADAMTS5. Também foi demonstrado neste estudo que a transfecção de microRNA-140 em condrócitos é capaz de suprimir a expressão de ADAMTS5 induzida por IL-1 β e aumentar a expressão de agrecan [22].

Assim, sugere-se que o miRNA-140 tenha como alvo direto a ADAMTS5, possuindo, dentre outras funções na cartilagem articular, regular os níveis de ADAMTS5 com a finalidade de obter um papel protetivo da cartilagem [26,28,32–35].

Somada às funções já conhecidas das MSCs, a biotecnologia de encapsulamento celular pode ser incorporada à terapia da OA a fim de explorar este potencial das MSCs. O arcabouço ou *scaffold* de hidrogel de alginato proporciona um ambiente tridimensional para as MSCs, que mimetiza a matriz biológica natural para melhor função e proliferação celular [36]. Outro papel importante do hidrogel de alginato verificado é a influência na indução da diferenciação condrogênica em células-tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina (eqSMMSC) [36,37].

Visando utilizar-se de biotecnologias aplicáveis a diferentes espécies, o objetivo deste estudo foi caracterizar VEs secretadas por eqSMMSCs e avaliar a expressão de microRNA-140 transportado nas VEs em dois modelos de cultivo celular, além de comparar a secreção de VEs e a expressão do microRNA quando expostas ao ambiente de osteoartrite *in vitro*.

Métodos

Este estudo foi conduzido conforme as diretrizes da Comissão de Ética e Utilização Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e aprovado sob

protocolo 0187/2019. Bem como seguiu as recomendações para estudos com VEs, segundo a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares [38].

Desenho Experimental

Foram definidos quatro grupos experimentais, sendo dois grupos-controle e dois expostos ao meio inflamatório. Os grupos-controle foram formados por um cultivo de eqSMMSCs em monocamada (2D), e um cultivo de eqSMMSCs inseridas em cápsulas de hidrogel de alginato (3D), submetidos ao meio de cultivo convencional. Já os dois grupos subsequentes, expostos ao meio inflamatório, foram expostos ao meio de cultivo simulando o ambiente inflamatório da osteoartrite, aqui denominado de “OA-Like” (suplementado com IL-1 β e TNF- α). O terceiro grupo consistiu em cultivo de eqSMMSCs em monocamada (2D-OA), e o quarto grupo foi definido pelo cultivo de eqSMMSCs inseridas em cápsulas de hidrogel de alginato (3D-OA).

As eqSMMSCs foram plaqueadas e cultivadas em monocamada até atingirem 80% de confluência. As eqSMMSCs do cultivo tridimensional foram inseridas nas cápsulas e passaram por um período de adaptação de 12 h. Os meios dos respectivos grupos foram inseridos imediatamente após este período.

Amostras dos meios de cultivo de todos os grupos foram coletadas após 24, 72 e 120 horas de incubação. Após coleta do meio, foi realizado processamento de isolamento das VEs, armazenamento de meio condicionado e processamento das células para análises subsequentes (Figura 1).

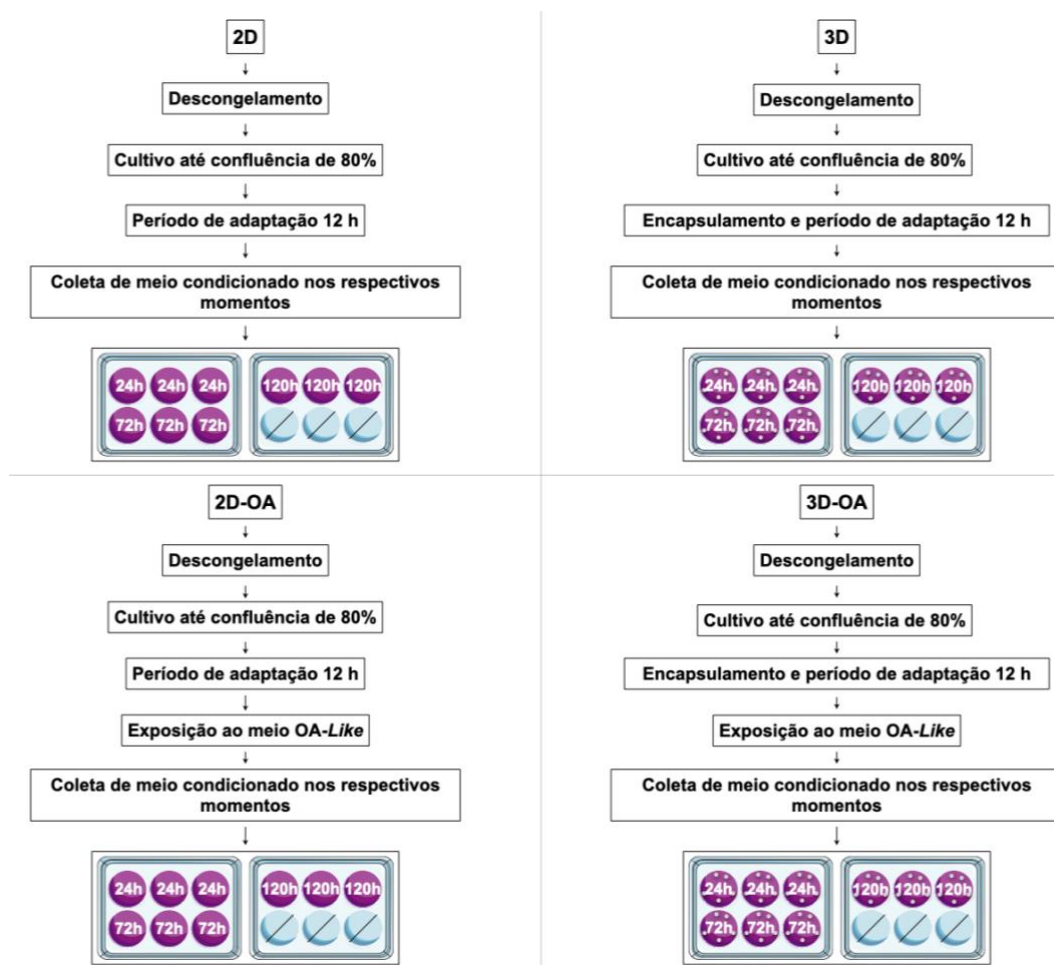


FIGURA 1. Desenho de estudo. Os cultivos de células-tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial (eqSMMSC) foram divididos em quatro grupos. Grupo 2D e Grupo 3D submetidos ao meio convencional; Grupo 2D-OA e Grupo 3D-OA submetidos ao meio inflamatório (10 ng/mL de IL-1 β e 0,25 ng/mL de TNF- α). Os tempos experimentais definidos foram 24, 72 e 120 horas para isolamento de vesículas extracelulares (VEs). As VEs foram caracterizadas quanto a morfologia, tamanho e concentração e expressão de tetraspaninas. E foi realizada a análise da expressão do microRNA-140 nas eqSMMSCs e VEs e expressão de ADAMTS5 nas VEs.

Depleção das Vesículas Extracelulares no Soro Fetal Bovino e na Solução Tampão

O SFB (#12657029, Gibco, Grand Island, NY, USA) foi filtrado (0,22 μ m) e ultracentrifugado, a fim de retirar as VEs presentes na composição do mesmo. Para tal, foi utilizada uma ultracentrífuga Sorvall Ultra Pro 80 (DuPont, Wilmington, DE, USA), com o rotor T865 Sorvall (DuPont, Wilmington, DE,

EUA) para tubos de 30 mL. O protocolo utilizado foi de 30.000 x g, *overnight*, a 4°C. Após a ultracentrifugação o SFB livre de VEs (denominado SFBvefree, a fim de facilitar o texto), foi congelado em freezer -20°C para posterior utilização.

Encapsulação das eqSMMSCs e Cultivo Experimental

As eqSMMSCs cultivadas em monocamada para encapsulamento foram tripsinizadas (#25200072. Trypsin-EDTA 0,25%, Gibco, Grand Island, NY, EUA) contadas e lavadas com PBS 7,4 pH para retirar resquícios de tripsina. Após, as eqSMMSCs na concentração de $7,2 \times 10^6$ foram ressuspensas em 1 mL de alginato sódico 1,5% (#W201502. Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Deste volume, foram retirados 0,84 mL com aproximadamente 5×10^6 células em uma seringa de 10 mL e acoplada a uma bomba de infusão. As cápsulas foram solidificadas em Cloreto de Cálcio (CaCl_2) 1,2M por 20 minutos, e assim perfazendo um total de 100 cápsulas, cada uma contendo 5×10^4 células.

Após a confecção das cápsulas, estas foram inseridas nos poços de cultivo de uma placa de seis poços, 05 cápsulas por poço, totalizando $2,5 \times 10^5$ células por poço, de acordo com cada grupo e momento experimental.

Todas as células dos grupos experimentais foram lavadas com PBS pH 7,4, a fim de retirar os resquícios de meio convencional (2D e 2D-OA) e CaCl_2 (3D e 3D-OA), e passaram por um período de adaptação ao meio de cultivo por 12h, contendo DMEM-F12/Glutamax + 10% SFBvefree + 1% antibiótico-antimicótico (penicilina + estreptomicina + anfotericina B).

Meios de cultivo utilizados na fase experimental: Grupos controles: DMEM-F12/Glutamax + 10% SFBvefree + 1% antibiótico-antimicótico (#10565018, #12657011, #15240062, respectivamente. Gibco, Grand Island, NY, EUA). Grupos expostos ao meio inflamatório OA-Like: DMEM-F12/Glutamax + 10% SFBvefree + 1% antibiótico-antimicótico + 10 ng/mL IL-1 β [39] (#PHC0814. Gibco, Grand Island, NY, EUA) e 0,25 ng/mL TNF- α [40] (#PHC3015L. Gibco, Grand Island, NY, EUA).

Isolamento das Vesículas Extracelulares

O protocolo de isolamento das VEs foi realizado conforme o indicado pelo fabricante do kit de isolamento: *Total Exosome Isolation (from cell culture media)* (#44783559, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

As amostras de meio foram centrifugadas a 2.000 x g / 30 min. / 4°C. Após, os sobrenadantes foram aliquotados em novos tubos (RNase free) e adicionado a proporção de 0,5:1 mL de kit de isolamento. As amostras foram homogeneizadas em *vortex* e incubadas *overnight* a 4°C em placa de agitação.

Após o período de *overnight*, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g / 1 h / 4°C. Subsequente à centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e as VEs – pequeno *pellet* formado – foram ressuspensas em 200 µL de PBS. Após homogeneização, as amostras foram criopreservadas em freezer -80°C para posterior análise.

Caracterização Vesículas Extracelulares

As VEs foram caracterizadas conforme morfologia, concentração/tamanho e expressão de tetraspaninas. Para a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), as amostras e VEs foram fixadas em grades de níquel [41] e foi utilizado Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips CM200, 160 kV, filamento LaB6. A concentração e tamanho médio de VEs, foi determinada pela análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) com o equipamento NanoSight (NS300, Malvern Panalytical, Inglaterra). Já a expressão das tetraspaninas CD9, CD63 e CD81, foi analisada por RT-qPCR descrito na seção expressão gênica.

Expressão de microRNA

Para a análise quantitativa da expressão de microRNA-140 em VEs e em eqSMMSCs, foi realizado ensaio de RT-qPCR e todos os processos foram realizados seguindo as instruções dos fabricantes. A extração total do

microRNA foi realizada com *miRNeasy Mini kit* (#217004, Qiagen, Germantown, MD, USA). Para realizar o ensaio de RT-qPCR, foi preparada a transcrição reversa cDNA de cada amostra com *TaqMan MicroRNA Assay Reverse Transcription kit* (#4366596, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e para detecção do miRNA-140 foi preparado o mix de reação com *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (#4444556, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) adicionado da sonda *TaqMan microRNA Assay (mmu-mir-140-5p*, sequência comercial homóloga a sequência do microRNA-140 equino, *eca-mir-140-5p* [24], confirmado pelo mirbase.org) (#assayID001187, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O gene U6 snRNA *TaqMan microRNA Assay* (#assayID001973, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), foi utilizado como controle interno para normalização das diferenças entre cada amostra e os dados obtidos analisados pelo método $2^{\Delta\Delta C_T}$ [42]. Todos os passos foram realizados utilizando o equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Expressão Gênica

Para análise quantitativa da expressão gênica das tetraspaninas CD9, CD63, CD81 e da enzima ADAMTS-5 nas VEs, foi realizado ensaio de RT-qPCR em *pool* das triplicatas biológicas de cada grupo e nos respectivos momentos. Os *primers* utilizados foram sintetizados pela Exxtend Biotecnologia (Paulinia, SP, BRA) e estão descritos na Tabela 1. Para o ensaio de RT-PCR foi realizada a extração total de RNA das VEs utilizando Qiazol do *miRNeasy Mini kit* (#217004, Qiagen, Germantown, MD, USA). Para realizar o ensaio de RT-qPCR foi preparada a transcrição reversa cDNA com *High-Capacity cDNA reverse transcription kit* (#4368813 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

O gene GAPDH foi utilizado como controle interno para normalização das diferenças entre cada amostra, e os dados obtidos foram analisados pelo método $2^{\Delta\Delta C_T}$ [42]. Todos os passos foram realizados utilizando o equipamento de RT-qPCR QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

309

310

311

TABELA 1. Sequências de *primers* utilizados para expressão gênica como alvos e controle interno para normalização e a condição dos ciclos (45) da reação de RT-PCR.

Gene	Primer	Sequencias 5'-3'	Condições da reação
CD9	Forward	CAAGCTTCACAACGAAGCCC	95°C - 03s; 55°C - 08s; 72°C - 20s.
	Reverse	GCGCCGATGATGTGGAATTT	
CD63	Forward	GTTCTTCTGCTGGCCTTTTGC	
	Reverse	CTGAGTGACATTGACGCAGC	
CD81	Forward	CCTGCCTGGTGATCCTGTTT	
	Reverse	GGCGATCTGGTCCTTGTTGA	
ADAMTS5	Forward	TAGAGGCATGGCTTGTCTGTG	
	Reverse	AAGGTGTGGTAGAAGGCGTG	
GAPDH	Forward	TCAGCCATCGCCAAGATTGT	
	Reverse	CCCGACGTCTTCCTCAAACA	

312

313

Análise Estatística

314

315

316

317

318

319

320

321

322

Para análise dos ensaios de expressão do microRNA, expressão gênica, concentração e tamanho das VEs, os dados passaram por um teste de normalidade (Shapiro Wilk). Em seguida foram realizadas múltiplas comparações através da análise de variância (One-way) ou Kruskall Wallis. Para as análises de duplas comparações foi aplicado Teste-T ou Mann-Whitney. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. Os dados apresentados em tabelas e gráficos estão representados como a média±SEM.

323

324

325

326

327

A análise de correlação dos valores obtidos a partir do microRNA das células e vesículas extracelulares foi realizada pelo teste de correlação de Pearson, analisando os valores do coeficiente de correlação de Pearson (P), seguido de uma regressão linear, de avaliação da qualidade do ajuste pela obtenção do R quadrado.

328

329

330

Na descrição dos valores de P nas legendas das figuras, entende-se que: $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$ e $P \leq 0,0001^{****}$. Os valores absolutos estão descritos no corpo do texto.

Os gráficos, as análises descritivas, bem como as comparações foram realizadas pelo software GraphPad Prism v.9 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Resultados

Características morfológicas das eqSMMSCs em cultivo

Durante a fase experimental de cultivo celular, pôde-se observar expressiva alteração entre os cultivos celulares (Figura 2). No grupo 2D, em todos os momentos as células mantiveram-se em morfologia tipo fibroblastoide e em alta confluência. Em contrapartida, as células do grupo 2D-OA, apresentaram perda da morfologia fibroblastoide com retração das protrusões de filópodes após 24 h, tornando-se cuboide com confluência diminuída nos momentos subsequentes, indicando morte celular. Já no grupo 3D as células permaneceram dentro das cápsulas de hidrogel após 24 h, apresentando migração para a placa e morfologia fibroblastoide, enquanto em 120 h verificou-se alta migração e/ou proliferação das células já aderidas à placa. Comparado ao 3D e também ao 2D-OA, o grupo 3D-OA apresentou comportamento semelhante ao seu grupo controle 3D em todos os momentos, e com maior confluência de células que migraram e/ou proliferaram. Quando comparado ao grupo 2D-OA, os cultivos celulares dos demais grupos não apresentaram o mesmo sofrimento celular como o apresentado no grupo 2D-OA.

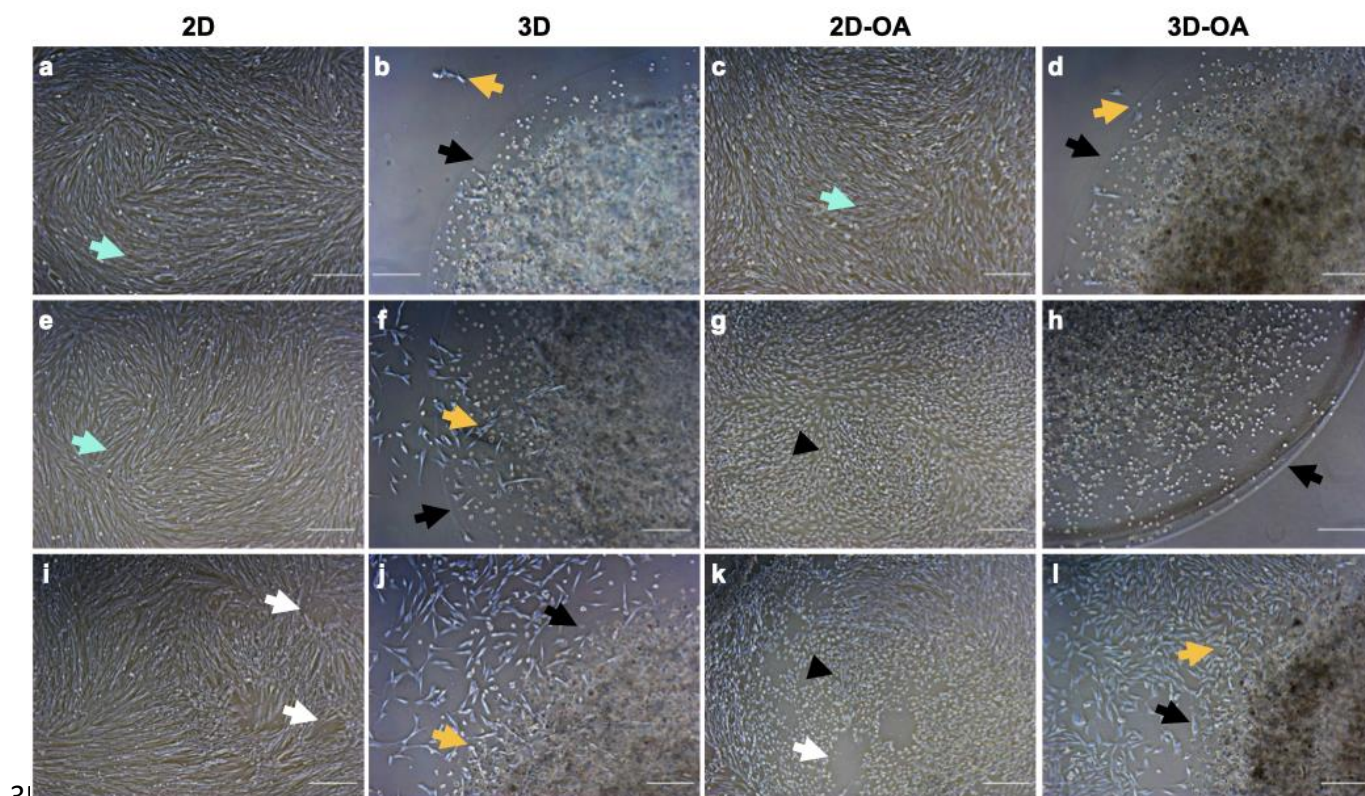


FIGURA 2. Comparação entre os cultivos nos respectivos momentos de coleta de meio condicionado. **a-d** 24 h, **e-h** 72 h e **i-l** 120 h. As setas verdes em a, c, e, apontam eqSMMSCs com morfologia tipo fibroblastoide. As setas pretas em b, d, f, g, h, j, l indicam a borda da cápsula de hidrogel de alginato. Setas amarelas apontam células com morfologia fibroblastoide que migraram para placa em b-d, e em f, g, h, j, l células que migraram e/ou proliferaram aderidas à placa, bem como eqSMMSCs aderidas sob a cápsula. As setas brancas em i e k indicam áreas de eqSMMSCs repelidas, dada a alta confluência. As cabeças de setas pretas apontam células com perda da morfologia fibroblastoide em g e k. Aumento de 5X e as barras representam 200 μ m.

Isolamento das Vesículas Extracelulares

O método utilizado para isolar VEs por precipitação (polietilenoglicol) com kit comercial possibilitou obter VEs de todos os grupos e momentos de cultivo, conforme observado na MET (Figura 3). Na análise de rastreamento de nanopartículas (Figura 4c), os dados obtidos relativos à concentração (partículas por mL e partículas por frame) e tamanho das VEs estão apresentados por média $\pm$ erro padrão da média (média $\pm$ SEM) na Tabela 2. Também, na análise estatística da diferença da concentração de partículas /

mL e tamanho em nanômetros (nm) entre grupos, pode-se observar que houve variação nos diferentes momentos e entre os modelos de cultivos.

A concentração de VEs (Figura 4a) nas primeiras 24 h foi superior nos grupos tridimensionais, porém houve diferença significativa apenas entre os grupos bidimensionais 2D e 2D-OA ($P = 0,0089^{**}$). Também houve diferença significativa entre os grupos expostos ao meio inflamatório 3D-OA e 2D-OA ($P = 0,0118^{*}$).

Após 72 h, os grupos-controle tiveram as suas concentrações de VEs reduzidas em relação aos grupos expostos ao meio inflamatório, sendo o grupo 3D-OA de maior concentração frente aos demais e apresentando valores significativos, 2D ($P = 0,0097^{**}$), 3D ($P = 0,0005^{***}$) e 2D-OA ($P = 0,0225^{*}$).

No último momento experimental, 120 h, houve aumento da concentração de VEs do grupo controle 2D em relação ao momento anterior, com diferença para o grupo controle 3D ($P = 0,0007^{***}$); já o grupo 3D-OA obteve maior concentração de VEs neste momento do que os demais grupos e em todos os momentos, com diferença significativa para com os grupos expostos ao meio inflamatório 2D ($P = 0,0002^{***}$) e aproximadamente o dobro que 3D ($P < 0,0001^{****}$).

Na comparação entre tamanhos de VEs nos diferentes grupos e momentos (Figura 4b), pode-se verificar que ao longo do período experimental o tamanho médio de VEs foi superior nos grupos controle em relação aos expostos ao meio inflamatório. Apenas no momento inicial, 24 h, o grupo 2D-OA foi superior aos grupos 3D ($P = 0,0063^{**}$) e 3D-OA ($P = 0,0240^{*}$), também houve diferença entre os grupos 3D e 3D-OA com $P = 0,0321$. No momento seguinte, 72 h, o grupo 2D apresentou aumento do tamanho médio de VEs em relação aos demais com diferenças significativas (3D $P = 0,0113^{*}$; 2D-OA $P = 0,0071^{**}$; 3D-OA $P = 0,0019^{**}$).

Ao final do período experimental, 120 h, houve as maiores diferenças entre os grupos, sendo que o grupo controle 2D manteve o maior tamanho de VEs frente aos demais (3D $P = 0,0185^{*}$; 2D-OA $P = 0,0011^{**}$; 3D-OA $P = 0,0003^{***}$). O grupo 3D apresentou diferença entre os grupos 2D-OA ($P = 0,0248^{*}$) e 3D-OA ($P = 0,0019^{**}$); e entre os grupos expostos ao meio

inflamatório o grupo 2D-OA apresentou maior tamanho de VEs do que 3D-OA ($P = 0,0001^{***}$), neste momento o grupo 3D-OA apresentou o menor tamanho de VEs entre os grupos.

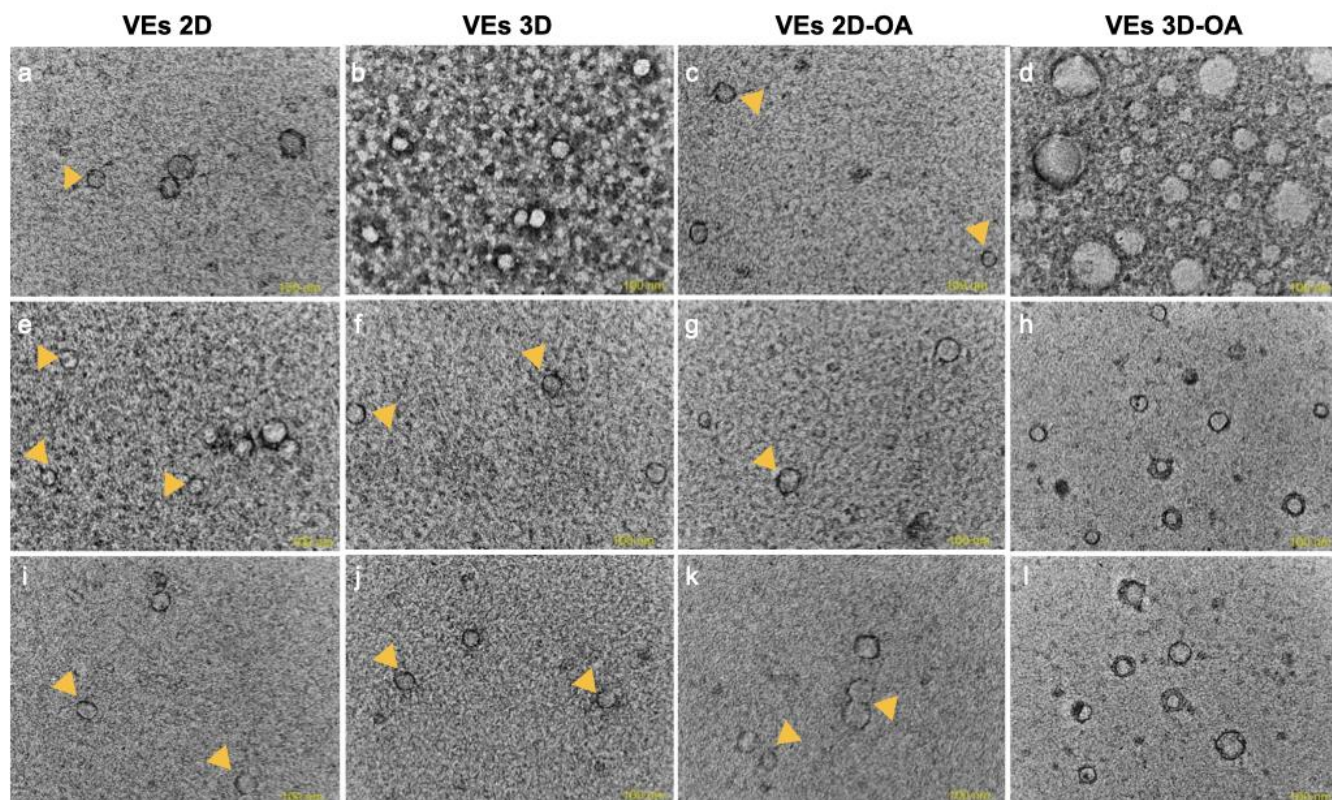


FIGURA 3. Microscopia Eletrônica de Transmissão. As imagens representadas correspondem **a-d**: 24 h, **e-h**: 72 h, **i-l**: 120 h. Pode-se observar VEs em todos os momentos experimentais. As cabeças de setas amarelas apontam pequenas VEs. Também é possível observar a dupla camada lipídica em VEs em a, d, g, h, k, l. Todas as escalas estão em 100 nm.

427 **TABELA 2.** Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), da concentração média de
 428 partículas por mL, partículas por *frame* e tamanho médio das VEs nos diferentes grupos e
 429 modelos de cultivo. Dados apresentados em média±SEM.

	Concentração						Tamanho (nm)		
	Partículas / mL			Partículas / frame			24 h	72 h	120 h
	24 h	72 h	120 h	24 h	72 h	120 h			
2D	1,24E+11±5,13 E+09	9,03E+10±9,73 E+09	1,27E+11±1,45 E+09	62,97±2,54	45,77±4,88	75,12±6,8	181±10	272±9,64	268±9,27
3D	1,64E+11±1E+ 09	9,35E+10±3,78 E+09	8,24E+10±4,4E +09	83,2±0,45	47,43±1,93	41,83±2,23	160±0,65	198±13,6	219±8,71
2D-OA	8,14E+10±7,33 E+09	1,03E+11±9,02 E+10	8,64E+10±7,03 E+09	41,3±3,72	52,2±4,5	59,17±7,97	214±8,71	196,1±11,6	188±2,09
3D-OA	1,46E+11±1,28 E+10	1,36E+11±1,53 E+09	1,79E+11±3,93 E+09	74,13±6,43	69,03±0,71	91,03±2	175±4,41	167±10,8	155±1,01

430

431

432

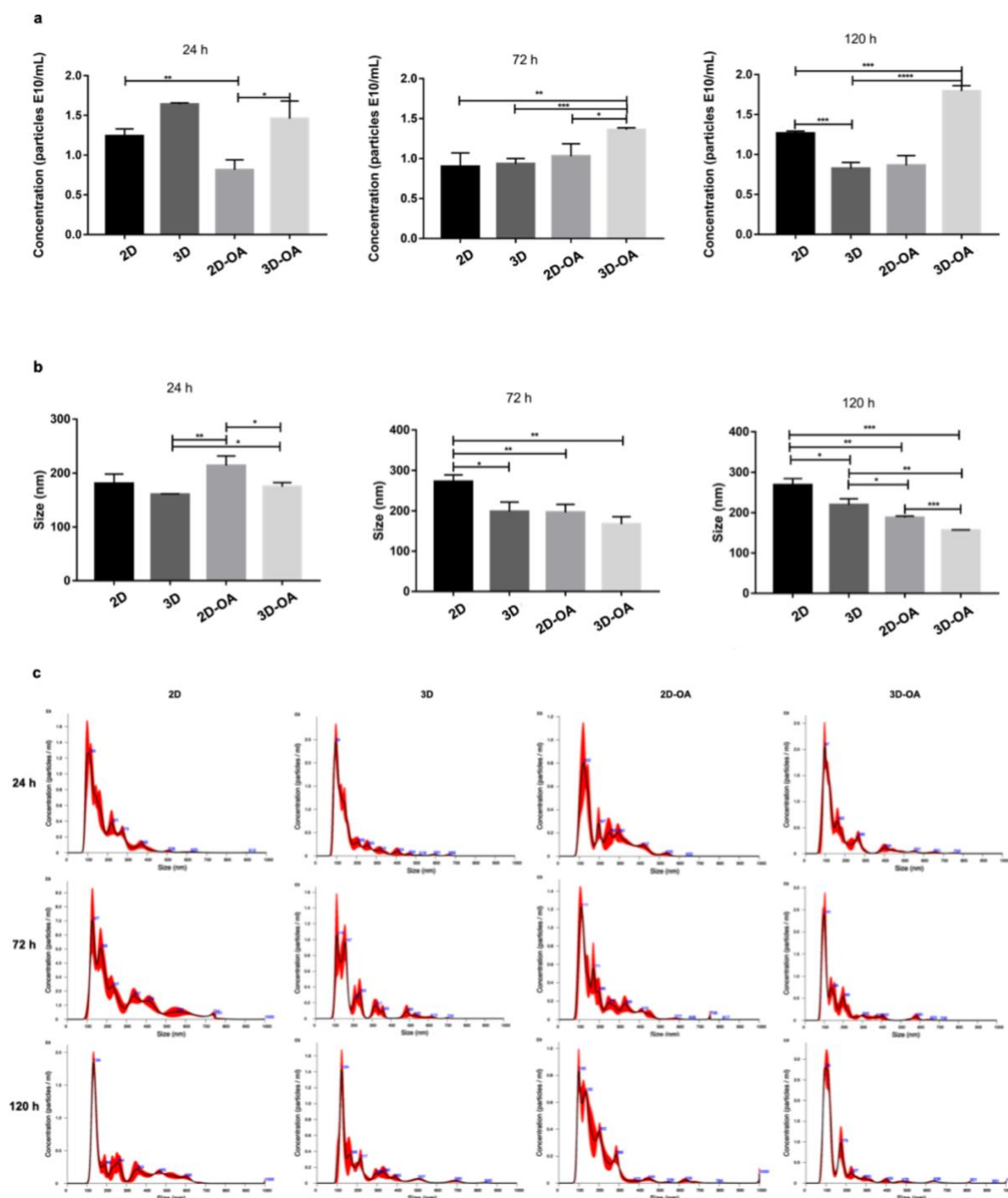


FIGURA 4. Análise da concentração e tamanho médios de VEs pelo NTA. Em **a** observa-se as diferenças de concentração de partículas dentre os grupos nos momentos experimentais. Em 24 h, observar-se diferença de concentração de VEs entre os grupos 2D vs. 2D-OA** e entre 3D-OA vs. 2D-OA*; em 72 h, o grupo 3D-OA apresentou diferença para os demais grupos (2D**; 3D***; 2D-OA*); em 120 h houve diferença entre 2D vs. 3D***, 3D-OA vs. 2D*** e 3D-OA vs. 3D****. Em **b** está apresentada as diferenças de tamanho de VEs entre os grupos. Em 24 h, houve diferença entre 3D-OA vs. 3D*, 2D-OA vs. 3D** e 2D-OA vs.

3D-OA*; em 72 h, o grupo 2D apresentou diferenças com os demais grupos (3D*; 2D-OA**;
3D-OA**); em 120 h, manteve-se a diferença do grupo 2D com os demais grupos (3D*, 2D-
OA**, 3D-OA***), e o grupo 3D obteve diferença comparado ao 2D-OA* e 3D-OA**, também
houve diferença entre 2D-OA vs. 3D-OA***. Em **c**, pode-se observar os gráficos do NTA das
concentrações e tamanhos médios de VEs entre os grupos nos três momentos experimentais.
Valores de P: $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$ e $P \leq 0,0001^{****}$.

Caracterização por Expressão Gênica das VEs

A expressão relativa de mRNA das tetraspaninas CD9, CD63 e CD81 *versus* controle de normalização (GAPDH) nas VEs foi observada em todos os grupos e nos diferentes momentos, permitindo a caracterização de VEs. No entanto, esta expressão variou entre os grupos e os momentos (Figura 5), indicando que as VEs apresentaram o mRNA para as tetraspaninas analisadas e não necessariamente as proteínas de membrana expressas.

Nas primeiras 24 h pode-se observar a maior expressão de CD9 em 3D-OA em relação aos outros grupos, sendo 69 vezes mais expresso que 2D ($P = 0,0001^{***}$), 59,7 vezes mais expresso que 3D ($P = 0,0003^{***}$) e 56,5 vezes em relação ao também grupo exposto ao meio inflamatório 2D-OA ($P = 0,0005^{***}$). No momento 72 h não houve diferença da expressão de CD9 entre os grupos. Do mesmo modo, no momento 120 h, o grupo 2D manteve a expressão de CD9, enquanto os outros grupos diminuíram esta expressão.

As diferenças observadas foram entre 2D e os demais grupos, que foi 0,98 vezes superior ao grupo 3D ($P = 0,0004^{***}$), 0,9 vezes superior ao 2D-OA ($P = 0,0006^{***}$) e com menor diferença, mas ainda significativa, de 0,4 vezes ao 3D-OA ($P = 0,0396^*$).

Quando avaliada a expressão de CD63 nas VEs, nas primeiras 24 h pôde-se observar maior expressão em 2D, o qual apresentou o dobro da expressão do grupo exposto ao meio inflamatório 2D-OA ($P = 0,0292^*$), além disso, entre os grupos tridimensionais, 3D-OA e 3D, observou-se maior expressão no grupo 3D-OA, porém, não foi significativa. Em seguida, no momento 72 h a expressão de CD63 manteve-se a mesma em 2D, já os demais grupos tiveram redução aproximada de 0,8 vezes da expressão de CD63 em relação ao grupo 2D, sendo 3D ($P = 0,0260^*$), 2D-OA ($P = 0,0372^*$) e 3D-OA ($P = 0,0348^*$).

Entretanto, houve uma inversão da expressão relativa de CD63 no momento 120 h, com aumento da expressão de CD63 no grupo 3D-OA, sendo aproximadamente nove vezes superior ($P < 0,0001^{****}$) em relação aos demais grupos, os quais reduziram as suas expressões de CD63 em relação aos momentos anteriores.

Na avaliação do CD81, nas primeiras 24 h a expressão foi maior nos grupos expostos ao meio inflamatório em relação aos grupos controles, 2D-OA foi 3,6 vezes superior ao 2D ($P = 0,0071^{**}$) e quatro vezes maior que o grupo 3D ($P = 0,0035^{**}$), já o grupo 3D-OA foi 9,5 vezes maior que o grupo 3D ($P < 0,0001^{****}$) e nove vezes em relação ao 2D ($P < 0,0001^{****}$) e entre ambos os grupos expostos ao meio inflamatório, o grupo 3D-OA foi 5,4 vezes superior ao 2D-OA ($P = 0,0006^{***}$). A partir do momento 72 h há o aumento da expressão de CD81 nos grupos controles e a redução nos grupos expostos ao meio inflamatório, sendo o grupo 2D aproximadamente o dobro do grupo exposto ao meio inflamatório 2D-OA ($P = 0,0025^{**}$) e 3D-OA ($P = 0,0042^{**}$), e o grupo controle 3D foi 0,6 vez superior ao 2D-OA ($P = 0,0451$). No último momento, 120 h, a expressão de CD81 em 2D se manteve superior em relação aos demais grupos, sendo 0,6 vez maior do que 3D ($P = 0,0019^{**}$), 0,8 vez superior ao 2D-OA ($P = 0,0003^{***}$) e aproximadamente 0,5 vez maior que o grupo 3D-OA ($P = 0,0112^{*}$), também neste momento nota-se elevação dos níveis de expressão dos grupos expostos ao meio inflamatório, sendo o grupo 3D-OA 0,3 vez superior ao 2D-OA ($P = 0,0455^{*}$).

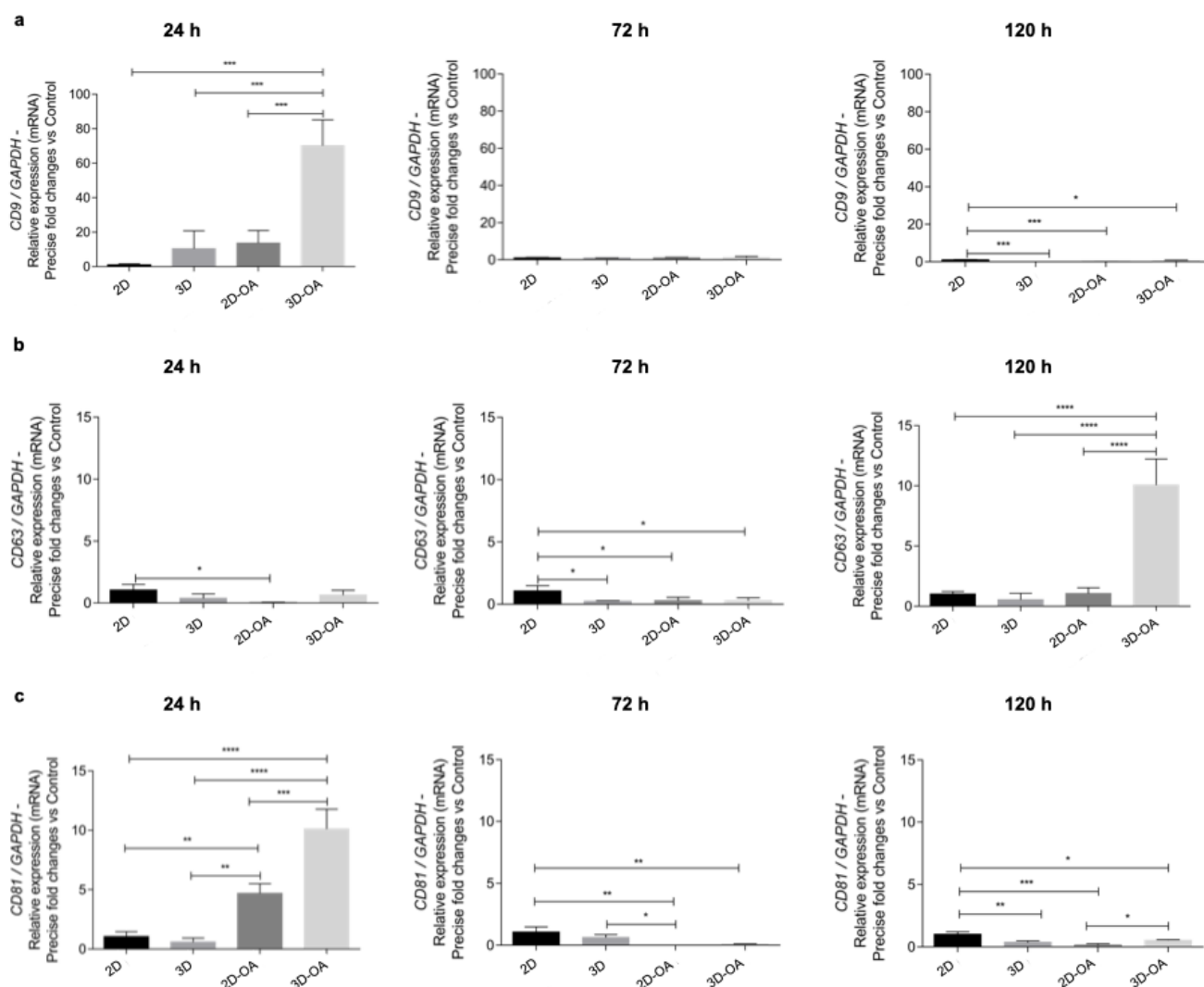


FIGURA 5. Caracterização das VEs pela expressão gênica relativa das tetraspaninas CD9, CD63 e CD81 com o gene GAPDH para normalização. Em **a**, a expressão de CD9 nas primeiras 24 h o grupo 3D-OA foi maior em relação aos demais grupos (2D***, 3D*** e 2D-OA***); em 120 h, foi observada diferença entre 2D e os demais grupos (3D***, 2D-OA***, 3D-OA*), e diferença entre 3D-OA vs. 3D* e 3D-OA vs. 2D-OA*. Em **b**, foi observada diferença na expressão de CD63 em 24 h entre 2D vs. 2D-OA*; em 72 h a expressão de CD63 manteve-se em 2D com diferenças aos grupos 3D*, 2D-OA* e 3D-OA*; em 120 h, houve aumento da expressão de CD63 no grupo 3D-OA em relação aos demais (****). Em **c**, a expressão de CD81 nas primeiras 24 h apresentou-se da seguinte maneira: 2D-OA vs. 2D**, 2D-OA vs. 3D**, 3D-OA vs. 3D****, 3D-OA vs. 2D****, 3D-OA vs. 2D-OA***; em 72 h houve aumento da expressão nos grupos controles em relação aos grupos expostos ao meio inflamatório, 2D vs. 2D-OA**, 2D vs. 3D-OA** e entre 3D vs. 2D-OA*; em 120 h, o grupo 2D apresentou diferença para os demais grupos: 3D**, 2D-OA*** e 3D-OA*, além da diferença 3D-OA vs. 2D-OA*. Valores de P: P ≤ 0,05*, P ≤ 0,01**, P ≤ 0,001*** e P ≤ 0,0001****.

Sinalização da Expressão do microRNA-140 entre eqSMMSC e VEs

A sinalização parácrina da expressão do microRNA-140 entre as eqSMMSCs e VEs pôde ser observada em todos os grupos e em diferentes níveis entre os momentos experimentais, com destaque para expressão relativa do microRNA-140 nos grupos 3D, 3D-OA e 2D-OA. A expressão do microRNA-140 nas eqSMMSCs variou ao longo do período experimental, com expressão nove vezes maior do grupo 3D-OA em relação aos grupos controles 2D ($P = 0,0001$) e 3D ($P < 0,0001$) e 8,5 vezes em relação do grupo exposto ao meio inflamatório 2D-OA ($P < 0,0001$) nas primeiras 24 h.

Esta relação de maior expressão do grupo 3D-OA com os demais grupos se manteve no momento seguinte, 72 h, sendo 13,5 vezes superior à ambos os controles ($P < 0,0001$) e 14 vezes ao 2D-OA ($P < 0,0001$).

Porém, no momento 120 h, houve diminuição da expressão em todos os grupos, com elevada expressão do grupo 3D em relação aos demais, sendo 1,6 vezes maior ao grupo controle 2D ($P = 0,0014$), e em relação aos grupos expostos ao meio inflamatório foi 1,8 vezes ao 2D-OA ($P = 0,0005$) e 2,2 vezes ao 3D-OA ($P < 0,0001$), o qual teve a menor expressão dentre todos os grupos neste momento (Figura 6a).

A expressão relativa do microRNA-140 nas VEs se mostrou diferente da expressão celular, com variação entre os grupos e nos momentos experimentais. A expressão foi menor nas VEs em comparação às células nas 24 h iniciais, entre os grupos, a menor expressão foi no grupo controle 3D, sendo 0,7 vezes menor em relação aos grupos 2D ($P = 0,0174$) e 2D-OA ($P = 0,0187$). No momento seguinte, 72 h, os grupos 2D e 2D-OA tiveram sutil elevação da expressão do microRNA-140 e redução no grupo 3D-OA, porém, o grupo 3D teve aumento significativo da expressão em relação aos demais, sendo 11,9 vezes maior do que 2D ($P < 0,0001$), 12 vezes superior ao grupo exposto ao meio inflamatório 2D-OA ($P < 0,0001$) e 12,7 vezes que o grupo 3D-OA ($P < 0,0001$). Já no momento final, 120 h, houve novamente alteração da expressão do microRNA-140 entre os grupos, com redução da expressão no grupo controle 3D e aumento significativo da expressão no grupo exposto ao meio inflamatório 2D-OA, sendo este 15,2 vezes superior ao 3D ($P <$

0,0001), comparado ao seu grupo controle 2D foi 19,5 vezes superior ($P < 0,0001$) e em relação ao também grupo exposto ao meio inflamatório 3D-OA sendo 19,7 vezes superior ($P < 0,0001$), o qual teve a menor expressão dentre os grupos (Figura 6b).

Os dados da expressão do microRNA-140 entre as eqSMMSCs e VEs dos respectivos grupos e nos diferentes momentos foram analisados, utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson (P) (Figura 7). No momento 24 h houve correlação negativa dos valores de expressão do microRNA-140, sendo inversamente proporcional entre os grupos 2D (VEs *versus* Células $P = 0,851$), 3D (VEs *versus* Células $P = 0,958$), 2D-OA (VEs *versus* Células $P = 0,823$). Já nos demais grupos e momentos, apenas verificou-se a correlação positiva do grupo 3D-OA no momento 72 h e 120 h ($P = 0,616$ e $P = 0,791$, respectivamente), podendo-se observar a redução da expressão do microRNA-140 em células e VEs deste grupo em ambos os momentos.

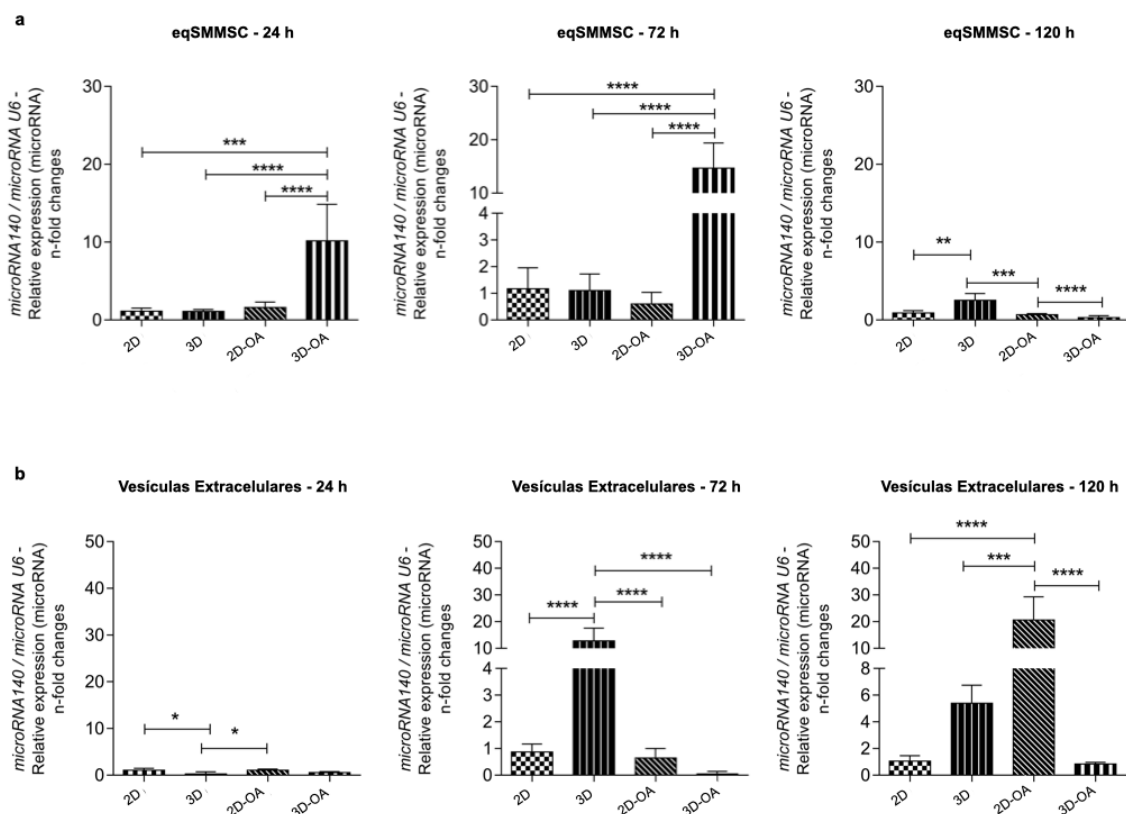


FIGURA 6. Análise da expressão relativa do microRNA-140 em eqSMMSCs e VEs. Em **a** a expressão nas eqSMMSCs, em 24 h, a expressão foi superior no grupo 3D-OA em relação

aos grupos 2D***, 3D**** e 2D-OA****; em 72 h, o grupo 3D-OA continuou superior à 2D****, 3D**** e 2D-OA****; no momento 120 h, houve maior expressão do grupo 3D em relação aos demais 2D**, 2D-OA*** e 3D-OA****. Em **b**, observa-se a expressão nas VEs, em 24 h, a menor expressão foi no grupo controle 3D em relação aos grupos 2D* e 2D-OA*; em 72 h, o grupo 3D teve aumento significativo da expressão em relação aos demais, 2D****, 2D-OA**** e 3D-OA****; em 120 h, há o aumento significativo da expressão no grupo exposto ao meio inflamatório 2D-OA, sendo superior aos demais 3D***, 2D**** e 3D-AO****. Valores de P: $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$ e $P \leq 0,0001^{****}$.

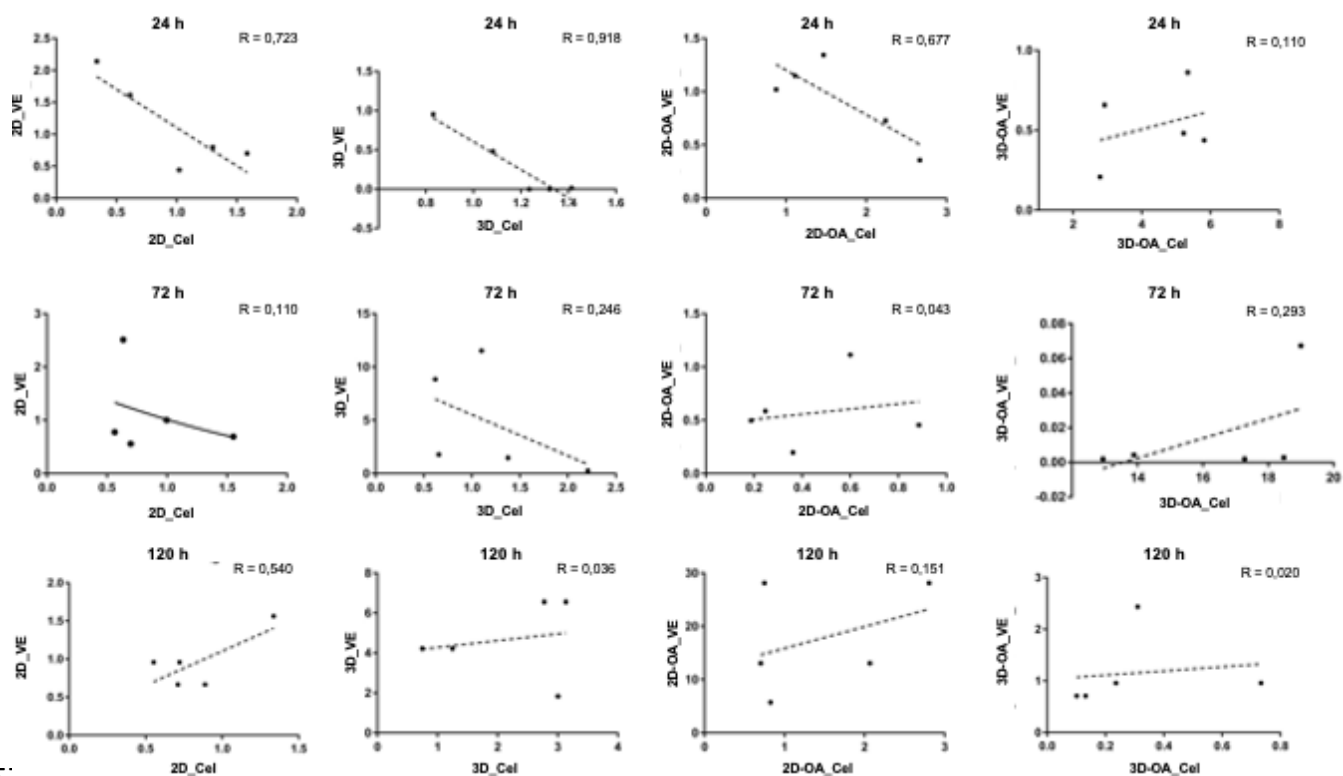


FIGURA 7. Análise do coeficiente de correlação dos dados da expressão do microRNA-140 entre as eqSMMSCs e VEs dos respectivos grupos e nos diferentes momentos. No momento 24 h houve correlação negativa dos valores de expressão do microRNA-140, sendo inversamente proporcional entre os grupos 2D (VEs vs. Células $P = -0,851$), 3D (VEs vs. Células $P = -0,958$), 2D-OA (VEs vs. Células $P = -0,823$). Já nos demais grupos e momentos, apenas verificou-se a correlação positiva do grupo 3D-OA no momento 72 h e 120 h ($P = 0,616$ e $P = 0,791$, respectivamente), podendo-se observar a redução da expressão do micro-RNA-140 em células e VEs deste grupo em ambos os momentos. R quadrado – Relativo à dispersão dos dados e qualidade do N amostral. P - Coeficiente de correlação de Pearson.

Expressão gênica de ADAMTS5 nas VEs

Na análise de expressão relativa do gene ADAMTS5 em VEs, pode-se observar a expressão inicial nos grupos controle e uma baixa expressão no grupo exposto ao meio inflamatório 3D. Esta expressão foi alterada nos momentos seguintes em que os grupos expostos ao meio inflamatório elevaram as expressões de ADAMTS5, enquanto os grupos controle reduziram esta expressão a níveis baixos.

No momento inicial, 24 h, onde os grupos controles tiveram maior expressão em relação aos demais, esta diferença foi aproximadamente o dobro entre os grupos 2D e 2D-OA ($P = 0,0362^*$) e entre 3D e 2D-OA ($P = 0,0298^*$).

Após, no momento seguinte, 72 h, a expressão de ADAMTS5 manteve-se em 2D, mas observou-se redução em 3D e expressivo aumento no grupo exposto ao meio inflamatório 3D-OA, o qual foi 2 vezes superior ao grupo 3D ($P = 0,0051^{**}$) e 2,3 vezes ao também grupo exposto ao meio inflamatório 2D-OA ($P = 0,0027^{**}$).

No último momento experimental, 120 h, houve redução da expressão nos grupos controles e acentuado aumento nos grupos expostos ao meio inflamatório, sendo o grupo 3D-OA superior aos demais e discreta superioridade do grupo 2D-OA em relação aos controles; neste momento, o grupo 3D-OA foi 6,4 vezes superior ao também grupo exposto ao meio inflamatório 2D-OA ($P = 0,0136^*$), 10,5 vezes em relação ao grupo 2D ($P = 0,0006^{***}$) e obteve 11 vezes maior expressão em relação ao grupo 3D ($P = 0,0004^{***}$).

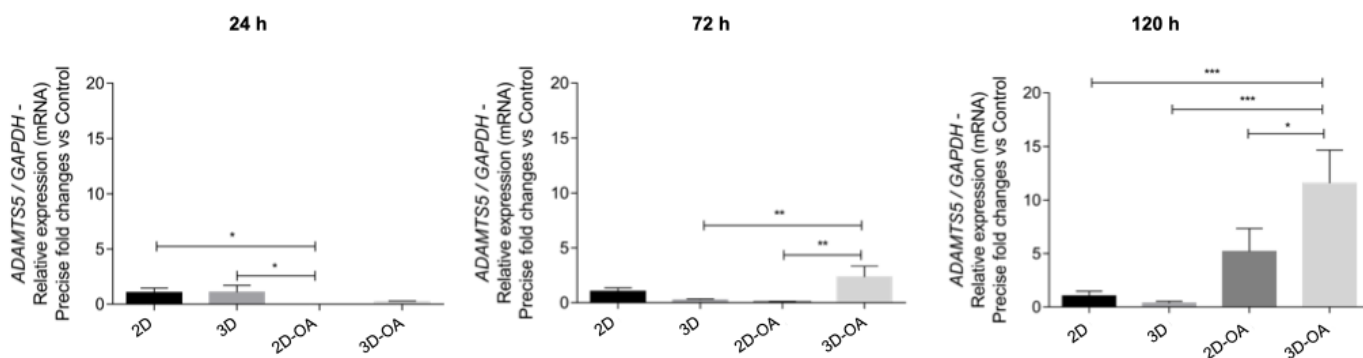


FIGURA 8. Análise da expressão gênica relativa da ADAMTS5 em VEs. Nas 24 h iniciais há maior expressão nos grupos controles em relação aos grupos expostos ao meio inflamatório, sendo 2D vs. 2D-OA* e 3D vs. 2D-OA*; em 72 h, houve importante aumento da expressão no grupo exposto ao meio inflamatório 3D-OA em relação ao grupo 3D** e ao grupo 2D-OA**; em 120 h, o grupo 3D-OA foi superior ao grupo 2D-OA* e teve expressiva superioridade em relação ao grupo 2D*** e 3D***. Valores de P: $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$ e $P \leq 0,0001^{****}$.

Discussão

Muitos fatores estão envolvidos na análise da liberação de VEs e a carga que estão transportando durante a sinalização parácrina. Como exemplo, são citados o ambiente, o meio e o modelo de cultivo celular (2D ou 3D).

Visto que o grupo de células 3D-OA não demonstrou sofrimento celular, ou seja, as células não apresentaram alteração de metabolismo, morfologia e redução da confluência celular ao longo do período experimental, diferente do grupo 2D-OA. Assim inferimos que tenha havido adaptação celular ao ambiente inflamatório. Este mecanismo pode ser justificado pelas células do grupo 3D-OA estarem no ambiente tridimensional, o que torna o ambiente mais próximo do natural e fazendo-se favorável para expressarem sua ação parácrina, e dessa forma o *scaffold* servir como uma barreira física às proteínas inflamatórias [43,44].

Pode-se justificar a esta adaptação ao ambiente, o contato indireto da células com as citocinas pró-inflamatórias, onde as células acabam por realizar o *priming* e se adaptam ao ambiente inflamatório, mecanismo adaptativo observado em análises *in vitro* do comportamento de células-tronco e condrócitos submetidos ao ambiente simulado de OA [45–47]. Outro possível mecanismo protetivo observado, é de que o alginato utilizado como *scaffold* nas 3D-OA possua capacidade de interação com moléculas de baixo peso molecular, como citocinas pró-inflamatórias [44]. Assim, absorvendo e atenuando a concentração das citocinas presentes no meio OA-Like e, por consequência, reduzindo os efeitos deletérios às eqSMMSCs.

A variação da concentração das VEs nos grupos, encontrada nos diferentes grupos, pode estar associada a diversos fatores, como à adaptação ao

scaffold nos grupos 3D, a alta confluência celular nos grupos 2D e a influência do meio OA-Like. Ressalta-se que as VEs são consideradas o veículo de comunicação intercelular [48–50], logo as VEs secretadas no espaço extracelular podem ser internalizadas e processadas pelas células adjacentes, influenciando na concentração de VEs isoladas em cada momento experimental, dado o ambiente experimental fechado, *in vitro*. Como observado em nosso estudo, os grupos 3Ds apresentaram maior concentração de VEs em comparação aos grupos 2D inicialmente, resultado semelhante ao de modelo 3D em esferoides *versus* 2D utilizado para estudo *in vitro* de células-tronco derivadas câncer colo-retal em murinos [51].

Também, os fatores utilizados no meio OA-Like (IL-1 β e TNF- α) devem ter influenciado o aumento da concentração de VEs no grupo 3D-OA em relação aos demais ao final do período experimental. Pois, no trabalho de Viñuela-Berni et al. foi demonstrado o aumento das VEs circulantes (sangue e urina) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatoide, e estas VEs estimularam liberação de TNF- α e IL-1 *in vitro* [52]. Logo, podemos sugerir que ao utilizarmos estas citocinas como modelo de OA *in vitro*, promovemos o aumento da concentração de VEs ao longo do tempo. O mesmo foi verificado no estudo de Ragni et al., [6] que ao exporem células-tronco derivadas de tecido adiposo à IFN- γ , observaram maior concentração de VEs em relação ao controle sem exposição.

Além disso, o aumento da concentração de VEs observada no grupo 2D ao final do período experimental pode ser relacionada à alta confluência celular em relação a área de cultivo, diferente da diminuição observada no grupo 3D em que células continuavam encapsuladas e aquelas aderidas à placa apresentavam-se em baixa confluência. E, quando comparamos o grupo 2D ao 2D-OA, o grupo controle apresentou maior concentração de VEs, visto que este grupo não demonstrou sofrimento celular como o 2D-OA. O sofrimento celular observado no 2D-OA pode estar relacionado à dose das citocinas utilizadas no meio OA-Like, apesar de utilizarmos a menor dose descrita para TNF- α (0,25 ng/mL) [40] e a dose geralmente utilizada para IL-1 β (10 ng/mL) [39]. Entretanto, a associação destas citocinas é considerada ideal para o modelo de OA *in vitro* [53].

Outro ponto importante que está associado à concentração e ao tamanho heterogêneo das VEs isoladas no experimento é o método de isolamento por precipitação (PEG). É sabido que o método considerado padrão ouro de isolamento de VEs em pesquisas com células-tronco é por ultracentrifugação, seguida da utilização de *kits* comerciais baseados em métodos de precipitação [7]. Em trabalhos que caracterizaram VEs derivadas de células-tronco humanas e equinas [54,55] foi verificado que o método de isolamento por precipitação é superior ao método de ultracentrifugação na recuperação total de VEs de pequenos volumes de meio na análise de NTA.

Quanto ao tamanho das VEs foi verificado que o método de precipitação tem tendência a formar agregados de VEs próximos a uma única VE quando detectadas pelo laser na análise de NTA, pressupondo maiores tamanhos de VEs [55]. Resultado este verificado na média de tamanho em nosso estudo e similar ao estudo de Patel et al., os quais analisaram diferentes métodos de isolamento de VEs, sendo que o *kit* comercial de precipitação por PEG, apresentou valores próximos ao deste estudo [56]. Assim, os resultados de tamanho médio de VEs obtidos em triplicatas no NTA, não refletem o observado na MET, pois as VEs observadas possuem tamanho próximo a 100 nm, sugerindo então que agregados de VEs possam ter influenciado na aferição do tamanho médio total de VEs na análise de NTA.

Ainda relacionada à caracterização das VEs, a análise de proteínas transmembrana como as tetraspaninas CD9, CD63 e CD81, é uma importante ferramenta para determinar a produção de VEs [38]. Estas tetraspaninas estão ligadas à biogênese das VEs. CD9 e CD81 estão associadas à seleção de cargas a serem transportadas em VEs, fazendo esta regulação da seleção endossômica independente da via maquinaria de ESCRT [57]. A CD63, está associada a formação de VEs, as quais também podem ser formadas a partir da via independente de ESCRT. Isto foi demonstrado na caracterização de vesículas intraluminais (endossoma multivesicular), as quais expressaram CD63 quando formadas após o esgotamento dos componentes dos quatro complexos ESCRT [58].

A Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares, indica que para analisar estas proteínas, seja realizado ensaios de ELISA, colorimetria ou

citometria de fluxo (*Beads* ou citometro capaz de analisar nanopartículas) [38]. Porém, estes são ensaios de alto custo e os equipamentos necessários são extremamente específicos e/ou de difícil acesso. Por este motivo realizamos um ensaio menos específico e de menor precisão do que a análise proteica, pois ao realizar a análise de expressão gênica, mRNA, destas proteínas, pudemos apenas inferir que haja a expressão proteica em nossas amostras de VEs.

A expressão relativa das tetraspaninas foi heterogênea, pois variou entre os grupos e nos diferentes momentos. A expressão de CD9 e CD81 foi maior no meio inflamatório dos grupos 2D-OA e 3D-OA no momento inicial e estabilizou ao final do período experimental, o que sugere que a exposição ao meio OA-*Like*, induziu a maior seleção de cargas para essas VEs resultando na modulação do ambiente pelas eqSMMSCs. Já, com relação à expressão do CD63, a qual está ligada biogênese das VEs, teve significativa expressão no grupo 3D-OA no último momento experimental, esta expressão pode estar relacionada ao menor tamanho de VEs apresentada por este grupo na análise de NTA nos momentos experimentais. Este dado corrobora o estudo de Edgar et al. [59], no qual observaram que a expressão de CD63 pode estar ligada a formação de pequenas vesículas intraluminais (futuros exossomos – VEs).

A expressão do microRNA-140 nas eqSMMSCs e nas VEs nos diferentes modelos de cultivo e nos momentos experimentais, representa a sinalização parácrina desempenhada pelas células nos ambientes distintos a que foram expostas. O microRNA-140 está ligado à manutenção da homeostase articular [22,26–28,32,33]. Yin e colaboradores [26], analisaram a expressão relativa (*n fold change*) de miR-140-5p em líquido sinovial humano, divididos em grupos controle (1,08) e pacientes acometidos por osteoartrite leve (0,36), moderada (0,173) e grave (0,036), assim demonstrando que quanto maior a gravidade da OA, menor a regulação do microRNA-140. A partir destes resultados pôde-se ter por base os níveis de expressão do microRNA-140 no ambiente *in vivo* e compará-los às expressões encontradas neste estudo.

Em nosso estudo, a expressão relativa do micro-RNA-140 nas eqSMMSCs, no grupo 3D-OA, foi em 24 h nove e em 72 h 14 vezes superior aos demais. Sendo que no momento 120 h o grupo 3D-OA reduziu a sua expressão e o

grupo 3D apresentou leve aumento da expressão em relação aos demais e aos momentos anteriores. A maior expressão do microRNA-140 nas eqSMMSCs do grupo 3D 120 h e nas VEs no momento 72 h, pode ser justificada pela adaptação das células ao ambiente tridimensional e devido ao longo do período de cultivo. Este tipo de expressão incomum foi observada em cultivo de células-tronco amnióticas, as quais à partir de 96 h de cultivo, apresentaram perfil de microRNA alterado indicando transição fenotípica pela adaptação ao ambiente de cultivo e senescência [60]. Outro fator que pode estar envolvido na expressão do microRNA-140 no grupo 3D, também relacionado ao estudo anterior, porém não analisado neste estudo, está ligado à condrogênese, demonstrado por estudos utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* com a espécie humana, equina e *Rattus norvegicus*. O miRNA-140 mostrou-se ser ativado pelo Fator de Transcrição SRYbox9 (SOX9) e, portanto, se correlacionou com a expressão de SOX9 na condrogênese embrionária e *in vitro* na diferenciação de MSCs [23,24,33,61]. Ainda, a diferenciação condrogênica pode ser potencializada pelo ambiente 3D, conforme observado em estudo analisando o cultivo de eqSMMSCs em cápsulas de hidrogel da alginato [36].

Os resultados dos grupos controles sugerem que as células mantiveram os níveis de expressão próximo ao normal, o que corresponde ao resultado encontrado por Yin et al. [26] em articulações híbridas. E, indica que a alta expressão positiva no grupo 3D-OA, seja em resposta das células-tronco ao ambiente osteoartrítico nos momentos iniciais, visto que este grupo estabilizou a expressão do microRNA-140 para níveis normais ao final do período experimental. Por outro lado, as células do grupo 2D-OA, apresentaram baixa expressão do microRNA-140 nas células, podendo ter havido influência do contato direto das células ao meio OA-Like e estas terem sofrido com o ambiente, como descrito anteriormente.

Contudo, a expressão microRNA-140 em VEs nos grupos expostos ao meio inflamatório foi baixa no grupo 3D-OA, indicando que as células produziram o microRNA-140, porém pouco foi transportado via VEs. Já o grupo 2D-OA, apresentou alta expressão do microRNA-140 nas VEs no momento 120 h, indicando que possa ter havido uma resposta tardia deste grupo, dado o

sofrimento celular apresentado. O resultado de que ambos os grupos expostos ao meio inflamatório expressaram microRNA-140 nas eqSMMSCs e VEs, vai de encontro ao conceito de que este microRNA atua na manutenção da homeostase em ambientes inflamatórios, como a OA, e/ou na resposta das eqSMMSCs a fim de buscar a modulação/reparação destes ambientes.

Os dados de nosso estudo, na observação da tentativa das eqSMMSCs 2D e 3D em regular o ambiente inflamatório exposto por si, confronta o resultado de Miyaki et al., [22] os quais observaram a regulação negativa do microRNA-140 após o tratamento de condrócitos com IL-1 β , esse tratamento também induziu a regulação positiva da expressão de ADAMTS-5. Porém neste mesmo estudo, foi verificado que a transfecção do miRNA-140 em condrócitos foi capaz de suprimir a expressão de ADAMTS-5 induzida por IL-1 β . O efeito protetivo das cápsulas de hidrogel e a expressão do microRNA-140 pelo grupo 3D-OA foi semelhante ao obtido em outro estudo, realizado por He et al., [34] no qual foi observado a ação positiva de “exossomos” secretados por células-tronco derivadas de medula óssea na reparação de cartilagem em modelos de OA *in vitro* (cultivo de condrócitos tratados com IL-1 β). Nos condrócitos que internalizaram exossomos por endocitose o tratamento atenuou de maneira significativa o efeito inibitório da IL-1 β na proliferação e migração dos condrócitos. Este efeito também foi observado no grupo 3D-OA, onde o cultivo tridimensional das eqSCMMSCs não foi influenciado pelo meio OA-*Like*.

Em nosso trabalho também foi realizada a análise da expressão gênica da ADAMTS5, que é alvo de inibição exercida pelo microRNA-140 nas VEs em diferentes grupos e momentos experimentais. Interessante que ambos os grupos controles expressaram ADAMTS5 na fase inicial do experimento, embora esta análise não tenha sido realizada nos grupos de eqSMMSCs, mas por estar presente em VEs indica que as células também expressaram este gene. A expressão da ADAMTS5 em condrócitos hígidos é oito vezes maior do que e em células-tronco derivadas de medula óssea em fase inicial de diferenciação condrogênica, as quais também expressam este gene, porém em fases mais avançadas de diferenciação esta expressão é reduzida [62]. Também, a enzima ADAMTS-5 é expressa de forma constitutiva e induzível, dependendo da espécie - em condrócitos humanos e fibroblastos sinoviais -

812 tipo de célula ou condições experimentais [63]. A razão desta expressão
813 verificada ainda não está clara, uma vez que foi reduzida nos momentos
814 tardios.

815 A expressão de ADAMTS5 em ambos os grupos expostos ao meio
816 inflamatório de VEs, mostrou-se de forma discreta, inicialmente e de maior
817 significância no momento 72 h e 120 h no grupo 3D-OA. Estas expressões
818 podem estar ligadas às razões já mencionadas, mas é provável que tenha
819 sido estimulado devido à exposição das células ao meio OA-Like (IL-1 β +
820 TNF- α) por maior tempo. A ADAMTS5 é regulada positivamente por indução
821 de IL-1 β em experimentos *in vitro* e *in vivo* e acredita-se que possa ser
822 parcialmente devido à regulação da transcrição das agrecanases,
823 [28,32,34,62,64,65].

824 Até onde é do conhecimento dos autores, este é primeiro trabalho a
825 caracterizar VEs e descrever a expressão de microRNA-140 em células-
826 tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina intracelular e
827 no transporte de VEs, utilizando método de cultivo tridimensional e simulando
828 ambiente inflamatório osteoartrítico *in vitro*. Desta forma, corroboramos ao
829 estado da arte no entendimento do papel das células-tronco mesenquimais no
830 tratamento da OA.

831 832 **Conclusão**

833 Os dados obtidos neste estudo, apontaram que o modelo e as técnicas
834 utilizadas foram eficazes para o isolamento e caracterização das VEs e para
835 a identificação da expressão de microRNA nos diferentes grupos e momentos.
836 O meio inflamatório OA-Like utilizado influenciou a morfologia celular no
837 cultivo em monocamada ao longo do período experimental. A expressão do
838 microRNA-140 em resposta ao ambiente inflamatório é desempenhada por
839 eqSMMSCs, sendo que, em células 3D demonstrou-se ser rápida e em VEs
840 oriundas de células cultivadas em 2D tardia. Enfatizamos, a necessidade de
841 novos estudos que compreendam a análise de microRNAs em diferentes
842 graus de OA naturalmente desenvolvida, bem como os microRNAs expressos
843 pelas MSCs/VEs.

844

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio ao projeto à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES e CAPES PRINT) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo: 312421/2018-4). Ao Profº Dr. Willian F. Zambuzzi (coordenador do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular - LaBIO, Instituto de Biociências, Departamento de Química e Bioquímica - UNESP) por ceder o equipamento de qPCR para a utilização e os insumos necessários para realização da expressão gênica.

Contribuição dos autores

(1) Todos os autores estiveram envolvidos na concepção e desenho do estudo, ou aquisição de dados, ou análise e interpretação dos dados.

(2) Todos os autores contribuíram na redação do artigo ou na revisão crítica de conteúdo intelectual importante.

(3) Todos os autores deram sua aprovação final ao manuscrito a ser submetido.

Contribuições adicionais:

- Concepção e desenho de estudo: JPHP and ALGA;
- Aquisição dos dados: JPHP, CJCF, GSR, FCS, EVPA, MCR; WFZ;
- Análise dos dados e interpretação: JPHP, ALGA;
- Elaboração do artigo: JPHP, ALGA;
- Análise Estatística: MCR, CJCF;
- Obtenção de fundos: ALGA.
- Revisão crítica do conteúdo intelectual importante e aprovação final do artigo: todos os autores.

Fontes de financiamento

Este estudo teve apoio financeiro de duas bolsas de pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2019/05558-6 (bolsa de doutorado) e 2017/14460-4 (Auxílio Regular).

Conflito de interesses

Todos os autores declararam que não possuem conflito de interesses.

Referências

1. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Transl. Med.* 2017. p. 1445–51.
2. Li Z, Zhang Z, Ming WK, Chen X, Xiao XM. Tracing GFP-labeled WJMSCs in vivo using a chronic salpingitis model: An animal experiment. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2017;8:1–11.
3. Carvalho AM, Yamada ALM, Golim MA, Álvarez LEC, Hussni CA, Alves ALG. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine Vet J.* 2014;46:635–8.
4. Cassano JM, Schnabel L V., Goodale MB, Fortier LA. The immunomodulatory function of equine MSCs is enhanced by priming through an inflammatory microenvironment or TLR3 ligand. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. Elsevier; 2018;195:33–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.10.003>
5. Lange-Consiglio A, Lazzari B, Perrini C, Pizzi F, Stella A, Cremonesi F, et al. MicroRNAs of Equine Amniotic Mesenchymal Cell-derived Microvesicles and Their Involvement in Anti-inflammatory Processes. *Cell Transplant.* 2018;27:45–54.
6. Ragni E, Perucca Orfei C, De Luca P, Mondadori C, Viganò M, Colombini A, et al. Inflammatory priming enhances mesenchymal stromal cell secretome potential as a clinical product for regenerative medicine approaches through secreted factors and EV-miRNAs: the example of joint disease. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2020;11:165.
7. Park KS, Bandeira E, Shelke G V., Lässer C, Lötval J. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2019;10:1–15.
8. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney*

- Int [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2010;78:838–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.278>
9. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006;20:847–56.
10. Crivelli B, Chlapanidas T, Perteghella S, Lucarelli E, Pascucci L, Brini AT, et al. Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system. *J Control Release* [Internet]. Elsevier; 2017;262:104–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.023>
11. Miyaki S, Asahara H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 2012;8:543–52.
12. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, Van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, Lindenberg JL, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:6328–33.
13. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010;285:17442–52.
14. Qiu G, Zheng G, Ge M, Wang J, Huang R, Shu Q, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles affect disease outcomes via transfer of microRNAs. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2018;9:320.
15. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res*. 2012;1:297–309.
16. Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, Laurencin CT. Animal models of osteoarthritis: Classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res* [Internet]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research; 2016;11:1–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13018-016-0346-5>
17. Ribitsch I, Baptista PM, Lange-Consiglio A, Melotti L, Patruno M, Jenner F, et al. Large Animal Models in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: To Do or Not to Do. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:1–28.
18. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, McIlwraith CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther* [Internet]. 2002;9:12–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/3301608.pdf>

- 943 19. Mobasheri A, Bay-Jensen AC, van Spil WE, Larkin J, Levesque MC.
 944 Osteoarthritis Year in Review 2016: biomarkers (biochemical markers).
 945 Osteoarthr Cartil [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;25:199–208. Available from:
 946 <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2016.12.016>
- 947 20. Budd E, Nalesso G, Mobasheri A. Extracellular genomic biomarkers of
 948 osteoarthritis. Expert Rev Mol Diagn [Internet]. Taylor & Francis; 2018;18:55–74.
 949 Available from: <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1415757>
- 950 21. Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, Tsezou A. Integrative MicroRNA and
 951 proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative
 952 metabolic and inflammatory networks. PLoS One. 2008;3.
- 953 22. Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, Inoue A, et al.
 954 MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and
 955 modulates interleukin-1 responses. Arthritis Rheum. 2009;60:2723–30.
- 956 23. Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T, Kobayashi T. Chondrocyte-Specific
 957 MicroRNA-140 Regulates Endochondral Bone Development and Targets Dnpep
 958 To Modulate Bone Morphogenetic Protein Signaling. Mol Cell Biol.
 959 2011;31:3019–28.
- 960 24. Buechli ME, LaMarre J, Koch TG. MicroRNA-140 Expression During
 961 Chondrogenic Differentiation of Equine Cord Blood-Derived Mesenchymal
 962 Stromal Cells. Stem Cells Dev [Internet]. 2013;22:1288–96. Available from:
 963 <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2012.0411>
- 964 25. van der Kolk JH, Pacholewska A, Gerber V. The role of microRNAs in equine
 965 medicine: a review. Vet. Q. 2015. p. 88–96.
- 966 26. Yin CM, Suen WCW, Lin S, Wu XM, Li G, Pan XH. Dysregulation of both miR-
 967 140-3p and miR-140-5p in synovial fluid correlate with osteoarthritis severity.
 968 Bone Jt Res. 2017;6:612–8.
- 969 27. Tardif G, Hum D, Pelletier JP, Duval N, Martel-Pelletier J. Regulation of the
 970 IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human
 971 osteoarthritic chondrocytes. BMC Musculoskelet Disord. 2009;10:1–11.
- 972 28. Miyaki S, Sato T, Inoue A, Otsuki S, Ito Y, Yokoyama S, et al. MicroRNA-140
 973 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. Genes Dev.
 974 2010;24:1173–85.
- 975 29. Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, Chung U II, Kawaguchi H.

- Transcriptional induction of ADAMTS5 protein by nuclear factor- κ B (NF- κ B) family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem* [Internet]. © 2013 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology.; 2013;288:28620–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.452169>
30. Sandy JD, Chan DD, Trevino RL, Wimmer MA, Plaas A. Human genome-wide expression analysis reorients the study of inflammatory mediators and biomechanics in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;23:1939–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.027>
31. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma H-L, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* [Internet]. Macmillan Magazines Ltd.; 2005;434:644. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature03369>
32. Karlsen TA, de Souza GA, Ødegaard B, Engebretsen L, Brinchmann JE. microRNA-140 Inhibits Inflammation and Stimulates Chondrogenesis in a Model of Interleukin 1 β -induced Osteoarthritis. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2016;5:e373.
33. Tao SC, Yuan T, Zhang YL, Yin WJ, Guo SC, Zhang CQ. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics*. 2017;7:180–95.
34. He L, He T, Xing J, Zhou Q, Fan L, Liu C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2020;11:1–15.
35. Duan L, Liang Y, Xu X, Xiao Y, Wang D. Recent progress on the role of miR-140 in cartilage matrix remodelling and its implications for osteoarthritis treatment. *Arthritis Res Ther. Arthritis Research & Therapy*; 2020;22:1–9.
36. Santos VH, Pfeifer JPH, de Souza JB, Milani BHG, de Oliveira RA, Assis MG, et al. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. *BMC Vet Res* [Internet]. BMC Veterinary Research; 2018;14:114. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1425-0>
37. Santos VH Dos, Pfeifer JPH, Souza JB De, Stievani FDC, Hussni CA, Golim

- MDA, et al. Evaluation of alginate hydrogel encapsulated mesenchymal stem cell migration in horses. *Res Vet Sci*. 2019;124:38–45.
38. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7.
39. Sylvester J, El Mabrouk M, Ahmad R, Chaudry A, Zafarullah M. Interleukin-1 induction of aggrecanase gene expression in human articular chondrocytes is mediated by mitogen-activated protein kinases. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30:563–74.
40. Westacott CI, Barakat AF, Wood L, Perry MJ, Neison P, Bisbinas I, et al. Tumor necrosis factor alpha can contribute to focal loss of cartilage in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2000;8:213–21.
41. Lässer C, Eldh M, Lötval J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*. 2012;1–6.
42. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*. 2001;25:402–8.
43. Sun L, Wang X, Kaplan DL. A 3D cartilage - Inflammatory cell culture system for the modeling of human osteoarthritis. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32:5581–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.028>
44. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37:106–26.
45. Cassano JM, Schnabel L V., Goodale MB, Fortier LA. Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2018;9:1–13.
46. Lange-Consiglio A, Romele P, Magatti M, Silini A, Idda A, Martino NA, et al. Priming with inflammatory cytokines is not a prerequisite to increase immune-suppressive effects and responsiveness of equine amniotic mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2020;11:1–14.
47. Barrachina L, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Albareda J, Prades M,

- et al. Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential. *Stem Cells Dev.* 2017;26:15–24.
48. Zech D, Rana S, Büchler MW, Zöller M. Tumor-exosomes and leukocyte activation: An ambivalent crosstalk. *Cell Commun Signal.* 2012;10:1–17.
49. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:1–14.
50. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2018;19:213–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
51. Hwang WL, Lan HY, Cheng WC, Huang SC, Yang MH. Tumor stem-like cell-derived exosomal RNAs prime neutrophils for facilitating tumorigenesis of colon cancer. *J Hematol Oncol. Journal of Hematology & Oncology*; 2019;12:1–17.
52. Viñuela-Berni V, Doníz-Padilla L, Figueroa-Vega N, Portillo-Salazar H, Abud-Mendoza C, Baranda L, et al. Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease. *Clin Exp Immunol.* 2015;180:442–51.
53. Johnson CI, Argyle DJ, Clements DN. In vitro models for the study of osteoarthritis. *Vet J* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;209:40–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.07.011>
54. Deregibus MC, Figliolini F, D'Antico S, Manzini PM, Pasquino C, De Lena M, et al. Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *Int J Mol Med.* 2016;38:1359–66.
55. Klymiuk MC, Balz N, Elashry MI, Heimann M, Wensch S, Arnhold S. Exosomes isolation and identification from equine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res. BMC Veterinary Research*; 2019;15:1–9.
56. Patel GK, Khan MA, Zubair H, Srivastava SK, Khushman M, Singh S, et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci Rep.* 2019;9:1–10.
57. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol.* 2010;190:1079–91.

- 1075 58. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome
1076 biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 2009;10:925–37.
- 1077 59. Edgar JR, Eden ER, Futter CE. Hrs- and CD63-Dependent Competing
1078 Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles. *Traffic*.
1079 2014;15:197–211.
- 1080 60. Lange-Consiglio A, Lazzari B, Pizzi F, Stella A, Girani A, Quintè A, et al.
1081 Different culture times affect MicroRNA cargo in equine amniotic mesenchymal
1082 cells and their microvesicles. *Tissue Eng. - Part C Methods*. 2018. p. 596–604.
- 1083 61. Nakamura Y, He X, Kato H, Wakitani S, Kobayashi T, Watanabe S, et al.
1084 Sox9 is upstream of microRNA-140 in cartilage. *Appl Biochem Biotechnol*.
1085 2012;166:64–71.
- 1086 62. Boeuf S, Graf F, Fischer J, Moradi B, Little CB, Richter W. Regulation of
1087 aggrecanases from the ADAMTS family and aggrecan neoepitope formation
1088 during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Eur Cells*
1089 *Mater*. 2012;23:320–32.
- 1090 63. Fosang AJ, Rogerson FM, East CJ, Stanton H. ADAMTS-5: The story so far.
1091 *Eur Cells Mater*. 2008;15:11–26.
- 1092 64. Liu S, Nigam C, Koh EY, Stains JP. Connexin43 mediated delivery of
1093 ADAMTS5 targeting siRNAs from mesenchymal stem cells to synovial
1094 fibroblasts. *PLoS One*. 2015;10:1–15.
- 1095 65. Hu N, Gao Y, Jayasuriya CT, Liu W, Du H, Ding J, et al. Chondrogenic
1096 induction of human osteoarthritic cartilage-derived mesenchymal stem cells
1097 activates mineralization and hypertrophic and osteogenic gene expression
1098 through a mechanomiR. *Arthritis Res Ther. Arthritis Research & Therapy*;
1099 2019;21:1–14.
- 1100