

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

JOÃO PEDRO DA CRUZ ROSARIO

**Caracterização de células estromais mesenquimais multipotentes cultivadas  
na presença de uma molécula moduladora da expressão de ciclo-oxigenase-2**

SÃO CARLOS - SP

2023

JOÃO PEDRO DA CRUZ ROSARIO

**Caracterização de células estromais mesenquimais multipotentes cultivadas na presença de uma molécula moduladora da expressão de ciclo-oxigenase-2**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientadora:** Dra. Simone Kashima Haddad

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Andréa Soares Campos.

SÃO CARLOS - SP

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## **Dedicatória**

À minha mãe, família e amigos do coração  
Por todo o amor, força e incentivo que compartilhamos

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, ao cosmos, a mãe natureza e a toda energia divina que mantém viva a esperança e o amor em nossos corações.

À minha mãe, que me dá vida e constantemente emana luz sobre a minha trajetória. Eu te amo maior que o infinito.

Aos meus familiares, e em especial, meu parceiro de vida, Pedro Seraphim. Obrigado por sempre acreditarem em mim.

À Dra. Andrea Soare da Costa Fuentes, uma das professoras mais amáveis e dedicadas que tive na graduação.

À Dra. Simone Kashima Haddad, por me aceitar em seu laboratório, confiar, e fornecer suporte para toda a pesquisa desenvolvida.

Ao meu grande professor e amigo, Dr. Péricles Mendes da Costa, por todo o incentivo, atenção, paciência e carinho que teve por mim. Você é extremamente responsável pelo meu crescimento como cientista.

A todos os meus colegas de laboratório e da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial Débora, Jonathan e Juliana, que tiveram participação essencial na minha formação e tornaram meus dias felizes.

A todos os meus colegas de graduação e de vida. Pelos bons momentos, apoio, conselhos e por fazerem parte da minha história. Gustavo, João Vitor, Lucas e Maria Eduarda, obrigado pelos mais de 15 anos de amizade.

Eu amo vocês do fundo do meu coração.

## Resumo

As células estromais mesenquimais (MSC) são células-tronco utilizadas em aplicações terapêuticas devido ao seu potencial regenerativo e imunomodulador. Estas células apresentam uma atividade parácrina, que libera fatores solúveis que permitem a elas gerenciar as células do sistema imunológico. Entre a diversidade de fatores, destaca-se a prostaglandina E2, sintetizada pelas MSC após o contato com o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e o aumento da expressão da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um ensaio de qPCR de triagem em larga escala baseado no eixo TNF- $\alpha$  - COX-2, para selecionar moléculas que modulam positivamente COX-2, e os resultados apontaram para o composto natural indirubina. Logo, o objetivo foi realizar um *priming* celular para observar os efeitos da indirubina sobre as características de MSC do cordão umbilical (UC-MSC) e validar a atividade moduladora do composto sobre a COX-2. Para tanto, amostras de UC-MSC (n=3) foram condicionadas durante 72 horas em três tratamentos: condição controle, DMSO 0,25% e indirubina à 50 $\mu$ M. Para as análises de caracterização, as células foram testadas quanto a morfologia, perfil imunofenotípico, viabilidade celular e diferenciação adipogênica. Posteriormente, a modulação de COX-2 foi avaliada através da expressão proteica (*Western blot*) e gênica (qPCR). Depois, amostras foram selecionadas para um ensaio de proliferação e de imunomodulação. Por fim, foi feita uma análise qPCR da expressão de genes inflamatórios por células mononucleares do sangue periférico. Os resultados indicaram que o *priming* não altera nenhum critério de caracterização da célula, e que não há viés na viabilidade ou proliferação. A modulação gênica e proteica de COX-2 se expressou de maneira diferente entre as amostras, com a "UC-MSC 03" apresentando ganhos em ambas análises. O ensaio de co-cultivo indicou que as UC-MSC controlam a proliferação de linfócitos, mas não foi possível afirmar o ganho imunomodulatório a partir do tratamento com indirubina. E a qPCR dos genes inflamatórios indicou ganhos de expressão em alguns alvos, que podem ser utilizados em uma outra abordagem de imunomodulação.

**Palavras-chave:** Células estromais mesenquimais; Imunomodulação; *priming*; ciclo-oxigenase-2; indirubina.

## Abstract

Mesenchymal stromal cells (MSC) are stem cells used in therapeutic applications due to their regenerative and immunomodulatory potential. These cells exhibit paracrine activity, which releases soluble factors that allow them to manage immune system cells. Among the diversity of factors, prostaglandin E2 stands out, synthesized by MSC after contact with tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and increased expression of the enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2). Our research group developed a large-scale screening qPCR assay based on the TNF- $\alpha$  - COX-2 axis, to select molecules that positively modulate COX-2, and the results pointed to the natural compound indirubin. Therefore, the objective was to carry out a cellular priming to observe the effects of indirubin on the characteristics of umbilical cord MSC (UC-MSC) and to validate the modulatory activity of the compound on COX-2. For this purpose, UC-MSC samples (n=3) were conditioned for 72 hours to three treatments: control condition, 0.25% DMSO and 50 $\mu$ M indirubin. For characterization analyses, cells were tested for morphology, immunophenotypic profile, cell viability and adipogenic differentiation. Subsequently, COX-2 modulation was evaluated through protein expression (Western blot) and gene expression (qPCR). Then, samples were selected for a proliferation assay and an immunomodulation assay, performed by co-cultivating UC-MSC with peripheral blood mononuclear cells. Finally, a qPCR analysis of the expression of inflammatory genes by PBMC was performed. The results indicated that priming did not contradict any cell characterization criteria, and that there is no bias in viability or proliferation. The gene and protein modulation of COX-2 was expressed differently between the samples, with "UC-MSC 03" showing gains in both analyses. The co-culture assay indicated that the UC-MSCs control the proliferation of lymphocytes, but it was not possible to affirm the immunomodulatory gain from the treatment with indirubin. And the qPCR of the inflammatory genes indicated expression gains in some targets, which can be used in another immunomodulation approach.

**Keywords:** Mesenchymal stromal cells; Immunomodulation; priming; cyclooxygenase-2; indirubin.

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1</b> - Estrutura química da indirubina.....	17
<b>Figura 2</b> - Delineamento experimental.....	21
<b>Figura 3</b> - Caracterização morfológica das UC-MSC por microscopia de contraste de fase.....	37
<b>Figura 4</b> - Caracterização morfológica das UC-MSC por análise confocal.....	38
<b>Figura 5</b> - Análises de perfil imunofenotípico das UC-MSC.....	40
<b>Figura 6</b> - Análises de viabilidade das UC-MSC.....	42
<b>Figura 7</b> - Padrões de morfologia de UC-MSC induzida à diferenciação adipogênica em três diferentes metodologias.....	44
<b>Figura 8</b> - Expressão proteica das UC-MSC através de <i>Western blot</i> .....	46
<b>Figura 9</b> - Expressão gênica das UC-MSC pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ .....	48
<b>Figura 10</b> - Proliferação celular de duas UC-MSC.....	49
<b>Figura 11</b> - Proliferação de linfócitos T co-cultivados com a UC-MSC 01.....	51
<b>Figura 12</b> - Proliferação de linfócitos T co-cultivados com a UC-MSC 03.....	53
<b>Figura 13</b> - Expressão de genes inflamatórios em PBMC cultivados durante 0, 3 e 5 dias.....	55



## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>11</b>
1.1 Células estromais mesenquimais.....	11
1.2 Efeito imunomodulatório das células estromais mesenquimais.....	12
1.2.1 O eixo TNF- $\alpha$ - COX-2.....	13
1.3 Aplicações clínicas das células estromais mesenquimais.....	14
1.4 Limitações no uso de MSC e suplementação com plasma humano convertido em soro .....	15
1.5 Potencialização por priming .....	16
1.6 Indirubina .....	17
1.7 Hipótese.....	18
1.8 Justificativa.....	18
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo Geral .....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>3. Materiais e métodos .....</b>	<b>20</b>
3.1 Estratégia Experimental.....	20
3.2 Aspectos éticos .....	22
3.3 Cultivo das células estromais mesenquimais.....	22
3.3.1 Descongelamento .....	22
3.3.2 Expansão celular .....	23
3.3.3 Dissociação enzimática.....	23
3.3.4 Criopreservação.....	24
3.4 Estratégia de priming com indirubina.....	24
3.5 Caracterização in vitro das células estromais mesenquimais.....	25
3.5.1 Análise morfológica e de adesão ao plástico.....	25
3.5.2 Análise de viabilidade e imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	25
3.5.3 Ensaio de diferenciação em adipócitos.....	26

3.5.3.1	Abordagens de diferenciação.....	26
3.5.3.1.1	Primeira abordagem de cultivo.....	26
3.5.3.1.2	Segunda abordagem de cultivo.....	27
3.5.3.1.3	Terceira abordagem de cultivo.....	27
3.5.3.2	Coloração de adipócitos e revelação dos resultados.....	27
3.6	Análise de Western blot.....	28
3.6.1	Extração e quantificação de proteínas.....	28
3.6.2	Eletroforese.....	28
3.7	Análise da expressão gênica.....	29
3.7.1	Extração e quantificação de RNA.....	29
3.7.2	Síntese de DNA complementar.....	30
3.7.3	PCR quantitativa.....	31
3.8	Ensaio de proliferação.....	31
3.9	Análise de imunomodulação da proliferação de linfócitos T.....	31
3.9.1	Isolamento de PBMC por gradiente de densidade.....	31
3.9.2	Marcação com CFSE e estimulação com mitógeno.....	32
3.9.3	Co-cultivo.....	33
3.9.4	Análise de proliferação por citometria de fluxo.....	33
3.10	Análise de expressão de genes inflamatórios em PBMC estimulado com PHA.....	34
3.11	Análise dos dados.....	35
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>36</b>
4.1	Caracterização das células mesenquimais.....	36
4.1.1	Morfologia.....	36
4.1.2	Perfil imunofenotípico.....	39
4.1.3	Viabilidade celular.....	41
4.1.4	Capacidade de diferenciação.....	43
4.2	Expressão da proteína COX-2 nas linhagens de UC-MSC.....	45
4.3	Expressão gênica de COX-2 nas linhagens de UC-MSC.....	47

4.4 Proliferação celular.....	49
4.5 Potencial de imunomodulação.....	50
4.6 Expressão de genes pró-inflamatórios pelo PBMC.....	54
<b>5. Discussão.....</b>	<b>57</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>63</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>64</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Células estromais mesenquimais

As células estromais mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stromal cells*) são células tronco multipotentes que possuem capacidade de autorrenovação, diferenciação em múltiplas linhagens celulares e propriedades imunomoduladoras. Essas células desempenham um papel central na regeneração e reparo tecidual, além de apresentarem efeitos anti-inflamatórios e pró-angiogênicos. Esse conjunto único de características torna as MSC atraentes por seu potencial terapêutico nos campos da medicina regenerativa, distúrbios inflamatórios e terapia do câncer (GALIPEAU e SENSEBÉ, 2018; HAN *et al.*, 2019; TIMANER *et al.*, 2020; SHAH *et al.*, 2012).

As MSC são caracterizadas por apresentarem formato alongado e fusiforme, núcleo grande e oval, capacidade de aderência ao plástico e formação de colônias fibroblastóide (BOBIS, JAROCHA e MAJKA, 2006). Elas se distinguem de outros tipos de células pela expressão de marcadores de superfície celular, incluindo CD73, CD90 e CD105, e falta de expressão de marcadores hematopoiéticos, como CD45, CD34, CD31 e HLA-DR. Além disso, as MSC apresentam um alto índice de proliferação e são capazes de se diferenciarem *in vitro* em linhagens celulares de osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006; PITTENGER *et al.*, 1999).

Dentre os locais de isolamento, a medula óssea é considerada a fonte principal para obtenção de MSC (BM-MSC). Contudo, a obtenção de amostras desta fonte envolve um procedimento invasivo e doloroso, além de apresentar um baixo rendimento celular durante o isolamento (PITTENGER *et al.*, 1999). Assim, outros sítios anatômicos foram explorados, como a polpa dentária (TIRINO *et al.*, 2012), o tecido adiposo (BUNNELL *et al.*, 2008) e anexos fetais (placenta, líquido amniótico, e cordão umbilical) (GRAHAM e FAUZA, 2015; SHAER *et al.*, 2014).

Uma fonte alternativa que tem recebido grande atenção é o cordão umbilical humano. As células estromais mesenquimais derivadas do cordão umbilical (UC-MSC) são isoladas principalmente da geléia de Wharton, um tecido gelatinoso ao redor dos vasos umbilicais. Essas células apresentam muitas vantagens em comparação com BM-MSC e MSC de outros tecidos, principalmente por representar

uma fonte prontamente disponível, cuja coleta é indolor e não invasiva, com questões éticas mínimas, pois geralmente é descartada no nascimento (MEBARKI *et al.*, 2021). As UC-MSCs também possuem maior rendimento no isolamento e maior potencial de proliferação, além de apresentarem maior capacidade de imunomodulação, efeito anti-inflamatório e gerarem baixa imunogenicidade, o que torna sua utilização em transplantes mais segura (COULSON-THOMAS *et al.*, 2014; EL OMAR *et al.*, 2014).

## 1.2 Efeito imunomodulatório das células estromais mesenquimais

As características mais interessantes das MSC são suas propriedades biológicas, em particular sua capacidade de modular as respostas imunológicas. A imunomodulação das MSC é relatada através do contato célula-a-célula, liberação de fatores solúveis e vesículas extracelulares (MEBARKI *et al.*, 2021).

Atualmente, sabe-se que os principais benefícios da terapia com MSC são derivados dos efeitos dos fatores secretados em um mecanismo parácrino. Essas moléculas maximizam a capacidade das células do sistema imunológico migrarem para tecidos inflamados e lesionados (efeito pró-inflamatório) (FU *et al.*, 2019). Contrariamente, há moléculas que diminuem a citotoxicidade das células do sistema imunológico (efeito anti-inflamatório) dando uma chance de recuperação a um tecido lesionado por inflamação exacerbada (HARRELL *et al.*, 2019). Em ambos os casos, a MSC conduz o sistema imunológico para atuar na homeostase de um tecido alvo. Esta habilidade torna as MSC reguladoras de processos fisiológicos e patológicos, tanto locais quanto sistêmicos (KRAMPERA *et al.*, 2013; LE BLANC e MOUGIAKAKOS, 2014; UCCELLI, MORETTA e PISTOIA, 2008).

O efeito imunomodulatório e anti-inflamatório das MSC permite que estas células regulem a ativação, proliferação e função de células imunes, como células T e B, macrófagos, células dendríticas e células natural killer (NK). Para isso, ocorre a secreção de diversos fatores solúveis, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão, que são capazes de modular a atividade de células vizinhas (LE BLANC e MOUGIAKAKOS, 2014; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2009; UCCELLI, MORETTA e PISTOIA, 2008). Dentre os fatores, estão inclusos interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de hepatócitos

(HGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), e interleucinas (IL): IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (EIRO *et al.*, 2021; LE BLANC e MOUGIAKAKOS, 2014; UCCELLI, MORETTA e PISTOIA, 2008).

No contexto da imunomodulação, a regulação de células T pelas MSC é uma atividade de destaque. As MSC induzem a apoptose, a diminuição da citotoxicidade e proliferação de células T efetoras (T auxiliares ou *Thelpers*), além de aumentarem a proliferação de células T reguladoras (Tregs). Isso ocorre através da secreção de alguns fatores como indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), prostaglandina E2 (PGE-2) e fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (DUFFY *et al.*, 2011; LE BLANC e MOUGIAKAKOS, 2014). A liberação desses fatores pelas MSC pode se dar por diferentes vias, e é influenciada por condições como a idade do doador das células, o tipo de tecido do qual as células são isoladas, o microambiente celular, a atividade enzimática e a via de sinalização intracelular (KUSUMA *et al.*, 2017; PITTENGER *et al.*, 2019).

### 1.2.1 O eixo TNF- $\alpha$ - COX-2

Uma das vias de ação das MSC é o eixo TNF- $\alpha$  - COX-2. O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina produzida por células do sistema imunológico, tais como: macrófagos, células dendríticas e linfócitos T ativados. Ele é secretado em resposta a lesões ou infecções, desempenhando um papel importante na modulação de células T e na regulação da morte celular (AGGARWAL, 2003). O TNF- $\alpha$  também está associado à regulação da expressão de enzimas envolvidas na produção de prostaglandinas, como a ciclooxigenase-2 (COX-2). Dentre os compostos produzidos pela COX-2, destaca-se a prostaglandina E2 (PGE2), uma molécula que desempenha um papel fundamental na resposta inflamatória e regulação de linfócitos (KULESZA, PACZEK e BURDZINSKA, 2023).

A cascata de sinalização do TNF- $\alpha$  até a liberação de PGE2 é mediada por diversas proteínas, incluindo NF- $\kappa$ B, MAP quinases (p38, JNK e ERK) e fosfolipase A2 (PLA2). A ativação dessas proteínas resulta na produção de ácido araquidônico (AA), que é convertido em PGE2 pela COX-2. Dessa forma, o TNF- $\alpha$  aumenta a expressão de COX-2, resultando na produção de PGE2 em diversas células,

incluindo células imunes e MSC (KULESZA, PACZEK e BURDZINSKA, 2023; HERNÁNDEZ *et al.*, 2002).

Em linfócitos, os efeitos da PGE2 são mediados pela interação com os diferentes subtipos de receptores EP 1-4. Dentre os efeitos, a PGE2 induz o aumento de IL-10 em linfócitos T auxiliares favorecendo a proliferação de Tregs. Ela também atua sobre linfócitos T efetores diminuindo a secreção de citocinas de maturação IL-2 e IFN- $\gamma$  e diminui sua proliferação ao modular proteínas relacionados ao ciclo celular, como a espermina e a p59 (HARRIS *et al.* 2002, SREERAMKUMAR, FRESNO, e CUESTA, 2012).

### 1.3 Aplicações clínicas das células estromais mesenquimais

O espectro de ação das MSC, e sua diferenciação osteo-cartilaginosa, dá a estas células a capacidade de melhorar a regeneração tecidual, aumentar a angiogênese e reduzir a inflamação, o que é útil no tratamento de lesões medulares, musculoesqueléticas, doenças autoimunes e inflamatórias (FONG *et al.*, 2011; LE BLANC e MOUGIAKAKOS, 2014; LIAU *et al.*, 2020). Ela também apresenta a capacidade de diminuir a rejeição de transplantes, sendo útil em transplantes alogênicos de células-tronco hematopoiéticas (CTH) (LE BLANC *et al.*, 2004).

No contexto de transplante de CTH, há também o uso de MSC para tratar uma complicação inerente a este processo. Trata-se da doença do enxerto contra o hospedeiro (do inglês, *Graft versus Host Disease*, GvHD) (LE BLANC *et al.*, 2004). A GVHD é causada por uma reação imunológica inadequada, onde as células imunocompetentes transplantadas (células do enxerto) reconhecem as células do hospedeiro como *non-self* e as atacam. A gravidade da GVHD pode variar e afetar diferentes órgãos, como a pele, o fígado e o trato gastrointestinal. O tratamento é geralmente baseado em imunossupressão, envolvendo o uso de corticosteróides, porém 25-30% dos pacientes apresentam uma refratariedade ao tratamento, conferindo um mau prognóstico com taxa de sobrevivência de aproximadamente 2 anos (FERRARA *et al.*, 2009). Como alternativa, foi demonstrado que a infusão de MSC pode modular a resposta imunológica e reduzir a inflamação associada à GVHD, melhorando significativamente a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes (LE BLANC *et al.*, 2008). Esta é uma abordagem já utilizada na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), ligada ao Hospital das Clínicas da

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP), que infunde BM-MSC em pacientes que passaram pelo transplante de CTH.

#### **1.4 Limitações no uso de MSC e suplementação com plasma humano convertido em soro**

Apesar do grande potencial terapêutico das MSC, ainda existem desafios a serem superados na sua aplicação clínica, incluindo a padronização dos protocolos de isolamento, expansão e diferenciação das células. Fatores como a idade do doador, a quantidade de oxigênio na cultura, o tipo de meio de cultura e a presença de citocinas afetam o potencial terapêutico e viabilidade das células, bem como os processos de congelamento e descongelamento (FAN *et al.*, 2020). Além disso, para aplicações terapêuticas, como em GVHD, outra limitação é a alta quantidade de células infundidas necessárias (4 a  $6 \times 10^6$  MSC/kg do paciente), de modo a alcançar resultados terapêuticos significativos (DOTOLI *et al.*, 2017).

Levando isso em consideração, critérios de fabricação e estratégias são continuamente devolvidas para melhorar a performance de MSC em cultivo, aumentar seus níveis de produção, diminuir sua imunogenicidade e potencializar sua qualidade e propriedades terapêuticas (FAN *et al.*, 2020; SENSEBÉ, GADELORGE e FLEURY-CAPPELLESSO, 2013). Uma dessas abordagens, usada na FUNDHERP, é a suplementação de culturas celulares com uma fonte de proteínas de origem humana, o plasma humano convertido em soro (PHCS) (DOS SANTOS *et al.*, 2017).

O PHCS é obtido a partir de plasma humano coletado de doadores voluntários e passa por uma série de processos de filtração e inativação viral para garantir a segurança microbiológica. Ele auxilia a expansão celular e tem sido um substituto recorrente de outra fonte proteica, o soro fetal bovino (SFB) (GUIOTTO *et al.*, 2020). Essa substituição é interessante pois o SFB apresenta algumas desvantagens, como o elevado risco de contaminação por patógenos, a instabilidade entre os lotes, problemas éticos relacionados com o método de coleta do sangue (obtido de fetos de vacas abatidas em matadouros) e as potenciais reações imunogênicas nos pacientes, já que esta fonte advém de origem animal (BIEBACK *et al.*, 2009).



Visando melhorar a qualidade e segurança das células, o PHCS tem sido utilizado, especialmente em aplicações clínicas. Sua principal vantagem é não possuir componentes de origem animal que possam contaminar as células ou induzir respostas imunológicas indesejadas. Além disso, há uma alta disponibilidade e segurança, pois o plasma humano é obtido de bancos de sangue, passando por extensas testagens sorológicas e moleculares (DOS SANTOS *et al.*, 2017, GUIOTTO *et al.*, 2020).

### 1.5 Potencialização por *priming*

Outra estratégia utilizada para potencializar as propriedades terapêuticas da MSC é o *priming* celular. Essa técnica envolve a exposição prévia de células a tratamentos com substâncias específicas, tais como agentes químicos, compostos sintéticos e naturais, drogas e demais moléculas. O intuito é induzir uma determinada resposta celular a um estímulo futuro, potencializando uma propriedade de interesse. Essa mudança é decorrente de regulação de genes, modificações epigenéticas, ativação de vias de sinalização específicas e a modulação da resposta a estímulos ambientais (MELDRUM *et al.*, 1997; SRINIVASAN *et al.*, 2022).

Uma das principais vantagens do *priming* celular é a rapidez com que se pode obter resultados. Diferentemente de técnicas mais complexas, como a engenharia genética, o *priming* celular pode ser realizado em um curto espaço de tempo. Além da rapidez, este método também apresenta baixo custo em comparação a outras técnicas de engenharia genética ou manipulação celular. Por fim, os efeitos do *priming* celular são transientes e apresentam menos efeitos adversos do que outras técnicas, permitindo que os pesquisadores controlem melhor as condições experimentais (SRINIVASAN *et al.*, 2022).

Esta técnica tem sido muito utilizada em MSC para aprimorar seu potencial regenerativo e de modulação da resposta imune. Várias abordagens de *priming* já foram desenvolvidas em MSC utilizando citocinas, fatores de crescimento, ácidos graxos, LPS e fármacos, ou por meio de combinações de técnicas de cultivo em hipóxia, cultivo dimensional, modificação genética e o uso de biomateriais. Através destas abordagens, foi melhorada a sobrevivência e a integração das MSC em diferentes tecidos, a migração para locais lesionados, a capacidade de proliferação e

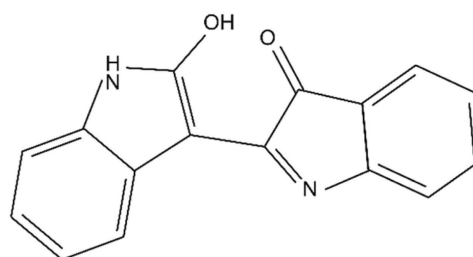
diferenciação, e a secreção de fatores anti-inflamatórios e imunomoduladores (NORONHA *et al.*, 2019).

Em nosso grupo de pesquisa, um estudo recente voltado ao *priming* de MSC, buscou selecionar compostos potencializadores da atividade imunomoduladora das MSC. A partir disso, uma candidata foi apontada, a molécula indirubina.

## 1.6 Indirubina

A indirubina (PubChem: 46386581) é um alcaloide bisindol, com fórmula molecular 3-(3-oxo-1 H-indol-2-ilideno)-1H-indol-2-ona. Possui uma estrutura plana, heterocíclica, com dois anéis aromáticos e grupos funcionais nitro e amino em sua estrutura (YANG *et al.*, 2022). Ela é um isômero avermelhado do corante índigo blue, e é extraída principalmente da planta indiana *Indigofera tinctoria*, utilizada como corante natural. Seu potencial terapêutico foi descoberto a muito tempo pelos chineses, presente no *Danggui Longhui Wan*: um mix de onze ervas utilizadas para tratar leucemia mielóide crônica (WANG *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2022).

**Figura 1:** Estrutura química da indirubina.



Fonte: Yang *et al.*, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113112>

Devido ao baixo teor de índigo nas plantas, baixa solubilidade em água e alto custo de extração e separação, a maioria dos métodos de obtenção da indirubina é sintética. Vários compostos de estrutura molecular semelhante à indirubina foram sintetizados, com maiores efeitos terapêuticos e menor citotoxicidade. Esses derivados possuem atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e IL-1 $\beta$ , além de reduzir a produção de óxido nítrico (NO) (WANG *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2022). Essas interações podem ser úteis no tratamento de algumas condições, como a artrite reumatóide (HUANG *et al.*, 2017).

## 1.7 Hipótese

Como o nicho inflamatório desempenha um papel fundamental no desencadeamento das funções reparadoras e imunomoduladoras das MSC, o *priming* das MSC com moléculas bioativas tem sido proposto como uma forma de promover o potencial terapêutico destas células. Nossa hipótese é de que a indirubina é um composto que exerce efeito modulador sobre o eixo TNF- $\alpha$  - COX-2 em amostras de UC-MS

## 1.8 Justificativa

Em decorrência do uso terapêutico das MSC, nosso grupo de pesquisa desenvolve estudos com o objetivo de potencializar a atividade anti-inflamatória dessas células. Uma das formas de promover o potencial terapêutico das MSC é por meio do *priming* celular. Para tanto, foi realizado um ensaio de triagem em larga escala (HTS) de 707 compostos previamente aprovados pelo *Food and Drug Association* (FDA) frente a uma amostra de UC-MS isolada e caracterizada.

O ensaio buscou selecionar compostos que mimetizam TNF- $\alpha$  durante três dias de tratamento, de maneira a modular o eixo TNF $\alpha$  - COX-2. Primeiramente, os compostos foram selecionados com base na baixa toxicidade para a célula. Adicionalmente, foi feita uma seleção daqueles que apresentaram acréscimo da expressão gênica (qPCR) e proteica (*Western blot*) de COX-2.

A partir desta estratégia, a droga indirubina foi selecionada como potencial moduladora de COX-2 em UC-MS, após testes com uma única amostra. No entanto, não foi avaliada a interferência da molécula sobre as características das UC-MS. Deste modo, o presente estudo investigou o efeito modulador e a influência da indirubina nas características de três amostras de UC-MS.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da indirubina sobre a viabilidade celular e os critérios de caracterização das células estromais mesenquimais derivadas do cordão umbilical (UC-MSc). Adicionalmente, verificar se após o tratamento com indirubina há a potencialização da expressão da enzima COX-2 e influência na proliferação e funcionalidade imunomoduladora de UC-MSc *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar amostras de UC-MSc (n=3) em relação a morfologia e viabilidade após *priming* com indirubina;
- Analisar o perfil imunofenotípico das células na presença e ausência do composto;
- Comparar três abordagens de diferenciação, induzindo a formação de adipócitos após o *priming*;
- Avaliar a expressão gênica e proteica do eixo COX-2 - TNF- $\alpha$  nas linhagens de UC-MSc;
- Observar a proliferação das linhagens selecionadas após o tratamento com indirubina;
- Avaliar a capacidade das UC-MSc de imunomodular a proliferação de linfócitos através de co-cultivo;
- Estabelecer um perfil de expressão gênica de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com mitógeno e compará-lo na condição de ausência e presença de co-cultivo.

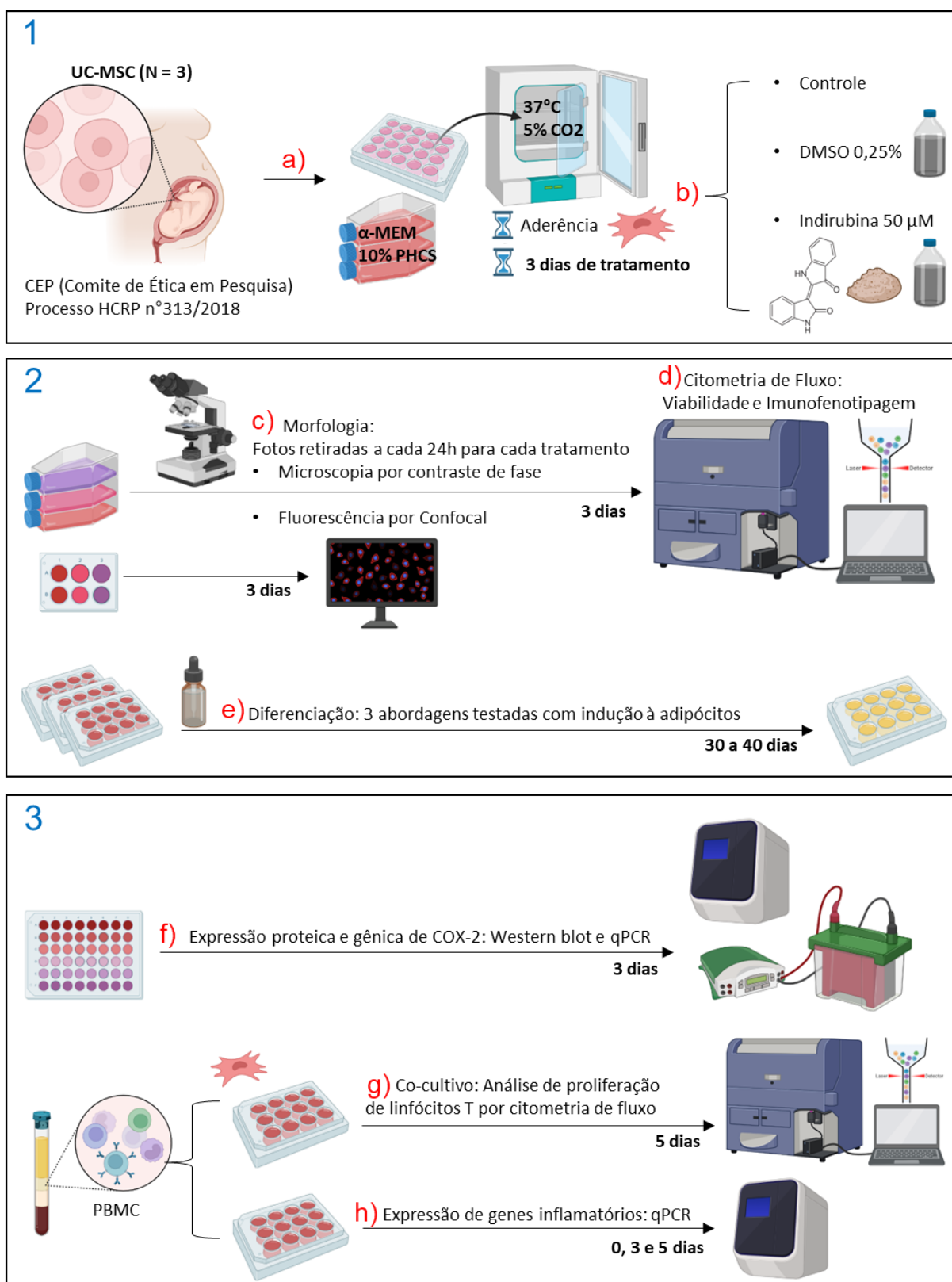
### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1 Estratégia Experimental**

Para execução desta proposta, seguimos a seguinte estratégia: Primeiramente, três linhagens de UC-MSC previamente isoladas e caracterizadas foram tratadas com indirubina e avaliadas quanto morfologia, perfil imunofenotípico e viabilidade, além da testagem de diferentes abordagens de diferenciação. Em seguida, as linhagens foram avaliadas quanto à modulação do eixo TNF- $\alpha$  - COX-2 a nível de expressão gênica e proteica.

Posteriormente, a partir das UC-MSC que apresentaram modulação, foi avaliada a capacidade de proliferação e o efeito imunomodulador anti-inflamatório, após a estratégia de condicionamento com o composto. A Figura 2 ilustra o delineamento experimental.

Figura 2 - Delineamento experimental.



O quadro (1) mostra a obtenção das três amostras (N=3) de células tronco estromais mesenquimais (UC-MSc), sua estratégia de cultivo (a) e de tratamento (b). O meio de cultura utilizado foi o *minimal essential medium* ( $\alpha$ -MEM) suplementado com 10% de plasma humano convertido em soro (PHCS),

e as células foram mantidas em condição de normóxia (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>). Foi realizada sua expansão e tratamento ao longo de três dias, em condição apenas com o meio padrão (controle), meio suplementado com 0,25% de dimetilsulfóxido (DMSO) e meio suplementado com 50 µM do composto indirubina. Já o quadro (2) indica a etapa de caracterização das UC-MSC: A morfologia e aderência ao plástico foi avaliada diariamente por microscopia de contraste de fase e análise de fluorescência confocal (c); A viabilidade e imunofenotipagem foram avaliadas por citometria de fluxo (d); As abordagens de diferenciação se deram pela indução da adipogênese entre 30 a 40 dias (e). Por fim, o quadro (3) indica os últimos experimentos, com a validação gênica e proteica de COX-2 através de qPCR e *Western blot* (f) e do uso de células mononucleares do sangue periférico (PBMC): Para um ensaio de co-cultivo que avaliou a proliferação de linfócitos T através de citometria de fluxo (g) e para a avaliação da expressão de genes pró-inflamatórios através de qPCR (h). Fonte: Próprio autor, feito através do *Software Biorender*.

### **3.2 Aspectos éticos**

Para a execução deste trabalho foram utilizadas amostras de UC-MSC humanas (n=3), isoladas e caracterizadas no projeto principal “Identificação e caracterização funcional de compostos sintéticos indutores do efeito imunomodulador em células estromais mesenquimais”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC-FMRP sob o processo HCRP 313/2018. Este material biológico foi obtido de voluntários saudáveis após consentimento livre e esclarecido.

### **3.3 Cultivo das células estromais mesenquimais**

#### **3.3.1 Descongelamento**

Para o descongelamento, a amostra foi retirada do tanque de nitrogênio e em seguida descongelada em banho maria a 37 °C. Em seguida, todo o volume de suspensão celular foi transferido para um tubo cônico tipo Falcon de 15 mL. Para diminuir citotoxicidade do DMSO, diluiu-se o volume em dez vezes (DMSO a 1%) utilizando meio de cultura “*minimum essential medium*” (α-MEM) (*Gibco*) suplementado com 1% penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL (*Gibco*). Posteriormente, a suspensão celular obtida seguiu para a centrifugação a 300 x g por 5 minutos (*Eppendorf Centrifuge 5810/5810 R*). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em meio de cultura, e plaqueado para cultivo.

### 3.3.2 Expansão celular

As células foram colocadas em garrafas de cultivo celular com superfície média de 75 cm<sup>2</sup> (T-75) ou 175 cm<sup>2</sup> (T-175) (*CELLSTAR*) contendo meio de cultura  $\alpha$ -MEM (*Gibco*) suplementado com 10% de PHCS e 1% de penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000  $\mu$ g/mL (*Gibco*) ( $\alpha$ -MEM 10% PHCS). O volume em mL de meio de cultura utilizado foi o equivalente a 20% da área da garrafa utilizada.

As garrafas foram mantidas em estufa (*Forma Steri-Cult CO<sub>2</sub> Incubator 3308*) a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de atmosfera úmida (condição de normóxia), sendo monitoradas por microscopia de contraste de fase. Após atingirem confluência próxima a 95%, a cultura seguiu para a etapa de dissociação enzimática.

### 3.3.3 Dissociação enzimática

O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com *phosphate buffered saline* (PBS) 1x estéril. Em seguida, com auxílio de uma solução de tripsina 0,05% e EDTA 0.53 mM (*Gibco*) foi feita a dissociação enzimática, a partir da adição de um volume igual a  $\frac{1}{3}$  do volume de meio de cultura que estava presente. Esta solução agiu durante 5 minutos em condição de normóxia. Em seguida, a garrafa foi agitada levemente para soltar o restante das células aderidas, e então meio de cultura suplementado foi adicionado para diluir o agente enzimático em 4 vezes, inibindo sua ação. Posteriormente, todo o volume foi recolhido e transferido para um tubo tipo Falcon de 50 mL, e então centrifugado a 300 x *g* durante 5 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado, e o *pellet* celular ressuspendido entre 2 a 5 mL de meio  $\alpha$ -MEM, dependendo de seu tamanho.

Para estimar a quantidade de células recuperadas, utilizou-se corante Azul de Tripán (*Sigma Aldrich*) (0,4 g/mL). Uma alíquota de 10  $\mu$ L da suspensão celular foi diluída cinco vezes em 40  $\mu$ L de azul de tripan. Desta diluição, 10  $\mu$ L foram colocados na câmara de Neubauer (*Boeco Germany*), e observados em microscópio óptico. As células viáveis foram contadas como aquelas refringentes e de morfologia esférica, sendo a contagem delimitada pelos quatro quadrantes periféricos da câmara.

Então, foi determinado a densidade celular: A contagem total é dividida pelo número de quadrantes (x4), multiplicada pelo fator de correção da câmara (10<sup>4</sup>),



multiplicada pelo fator de diluição em Tripan (x5) e multiplicada pela quantidade em mL em que o *pellet* foi diluído. Com a densidade aferida, foi possível recuperar quantidades específicas de células, que foram usadas em experimentos, em novas expansões e/ou congeladas e arquivadas no biobanco.

### 3.3.4 Criopreservação

As amostras de UC-MSC foram expandidas até a quinta passagem. Para preservá-las utilizou-se solução de criopreservação composta por 70% de PHCS, 20% de hidroxietilamido a 6% (*Voluven*®) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (*CryoPur*™). A densidade celular armazenada foi entre 1 a 5 x 10<sup>6</sup> células por vial criopreservante, cada um com 1 mL de volume final. O protocolo de congelamento seguido era um *slow freezing* (DUAN, LOPEZ e HICOK, 2018), em que as amostras são congeladas a -80 °C *overnight*, e depois realocadas para um tanque de nitrogênio líquido com temperatura constante de -196 °C.

### 3.4 Estratégia de *priming* com indirubina

O *priming* das UC-MSC foi desenvolvido com base nos resultados obtidos em um estudo anterior do grupo, a tese de doutorado intitulada “Identificação e caracterização funcional de compostos sintéticos indutores do efeito imunomodulador em células estromais mesenquimais” (dados não publicados), que realizou um ensaio de triagem em larga escala testando compostos durante 72 horas em concentrações de 50 µM.

Para tanto, no presente estudo, as células foram tratadas por três dias em condição de normóxia com meio α-MEM 10% PHCS suplementado com 50 µM de indirubina (*Sigma Aldrich* - PHL89716) para modulação positiva de COX-2. Pelo fato da indirubina ser diluída em DMSO, este composto também foi utilizado como um tratamento à parte (controle negativo), de modo que as células foram tratadas com α-MEM 10% PHCS suplementado com DMSO 0,25%. Para condição controle, as UC-MSC foram cultivadas somente com α-MEM 10% PHCS.

### 3.5 Caracterização *in vitro* das células estromais mesenquimais

#### 3.5.1 Análise morfológica e de adesão ao plástico

Para avaliar a capacidade de adesão ao plástico e morfologia, as UC-MSC foram fotografadas em microscopia eletrônica e confocal. As UC-MSC em cultura foram observadas regularmente com o auxílio de um microscópio de contraste de fase (*Olympus Ix71*), e imagens foram registradas diariamente utilizando uma câmera integrada ao equipamento e o *software CellSens Standard*.

Para a análise por imunofluorescência, as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (*Knittel Glase*) depositadas ao fundo de uma placa de cultura celular de 24 poços. Cada poço continha 1 mL de meio de cultivo suplementado com as três condições de tratamentos supracitadas e  $1,7 \times 10^5$  células. Passadas 72 horas, os poços foram lavados 3 vezes com 500  $\mu$ L de PBS 1x, e as células fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% (*EM Sciences*) por 15 minutos à temperatura ambiente (TA). As células foram novamente lavadas, e incubadas com glicina 0,1M durante 20 minutos à TA. Em seguida, foram permeabilizadas com 0,1% de Triton x-100 (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos à TA. Após três lavagens as lamínulas foram incubadas, durante 1 hora, em solução de PBS 1x com 10  $\mu$ L de marcador Alexa Fluor 488 *Phalloidin* (*Invitrogen*) na concentração 2,5:100 e 10  $\mu$ L de marcador *DAPI-Hydrochloride* (*Cayman Chemical*) na concentração 0,8:1000. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas mais 1 vez com PBS 1x e colocadas sobre lâminas de vidro contendo 10  $\mu$ L de *Fluoromount G* (*EM Sciences*). Após a fixação, cada lamínula foi fotografada em 4 pontos fixos por um microscópio confocal (*LSM 710 Laser scanning microscope*), e as imagens foram montadas pelo *software Image J*.

#### 3.5.2 Análise de viabilidade e imunofenotipagem por citometria de fluxo

Para esta análise foram plaqueadas  $1,7 \times 10^5$  células em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> para cada uma das três condições de tratamento propostas. Após 72h de cultivo, as MSC foram colhidas e a suspensão obtida foi fracionada uniformemente em tubos de citometria de poliestireno (*BD Trucount Tubes*).

Para a marcação foi feito um mix de anticorpos monoclonais contendo CD45, CD14, CD105, CD90, CD73, CD34, CD19 e HLA-DR, conjugados à fluoróforos FITC, PE e APC (*BD Pharmigen*). Os tubos contendo os anticorpos foram incubados à TA durante 15 minutos e protegidos da luz. Posteriormente, cada tubo foi lavado com 2 mL de PBS 1x e centrifugado a 600 x g por 3 minutos (*Thermo IEC Centra CL2 Centrifuge*). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 200 µL de PBS 1x contendo 0,02% de corante *DAPI-Hydrochloride* (*Cayman Chemical*) e analisadas em um citômetro de fluxo (*BD FACSymphony A1*), utilizando o software *FACSDiva v9.02* para gerar os dados.

### **3.5.3 Ensaios de diferenciação em adipócitos**

Este ensaio foi realizado em três diferentes abordagens descritas abaixo, apenas com a UC-MS 03. Todas elas foram feitas direcionando a diferenciação das células em adipócitos. Para tanto, utilizou-se o seguinte meio indutor: meio de cultivo  $\alpha$ -MEM com 10% PHSCS suplementado com 3,44 mM de insulina (*Sigma Aldrich*), 0,2 mM de indometacina (*Sigma Aldrich*) e 0,2 mM de dexametasona (*Sigma Aldrich*). Independente da abordagem, os experimentos duraram em torno de 30 a 40 dias, e a cada 3 dias eram feitas trocas dos meios por novos em iguais condições.

#### **3.5.3.1 Abordagens de diferenciação**

##### **3.5.3.1.1 Primeira abordagem de cultivo**

Para esta abordagem (Abordagem 1) as células foram semeadas em placas de 24 poços com inóculo inicial de  $2 \times 10^4$  células em 1 mL de meio. Neste caso, iniciou-se o cultivo com as três condições experimentais: Controle, DMSO 0,25% e Indirubina 50 µM. No entanto, cada condição foi feita utilizando meio indutor de diferenciação supra citado. Depois de 72 horas, foi feita a primeira troca de meio, e os tratamentos foram substituídos por somente meio indutor de diferenciação, e seguiu-se assim por 30 a 40 dias.

### 3.5.3.1.2 Segunda abordagem de cultivo

A segunda abordagem (Abordagem 2) foi semelhante à primeira. No entanto, nas primeiras 72 horas foi feito apenas o *priming* das UC-MSC com Controle, DMSO 0,25% e Indirubina 50  $\mu$ M utilizando meio meio cultivo  $\alpha$ -MEM com 10% PHCS. A partir da primeira troca de meio foi adicionado somente o meio indutor de diferenciação.

### 3.5.3.1.3 Terceira abordagem de cultivo

A terceira abordagem (Abordagem 3) consistiu em primeiramente realizar os tratamentos Controle, DMSO 0,25% e Indirubina 50  $\mu$ M das células em garrafas 25  $\text{cm}^2$  (T-25) com inóculo inicial de  $1,7 \times 10^5$  células em 5 mL de meio  $\alpha$ -MEM com 10% PHCS. Passadas 72 horas, as células foram colhidas enzimaticamente, contadas, e plaqueadas em placas de 24 poços como descrito acima. Deste ponto em diante usou-se somente meio indutor de diferenciação.

### 3.5.3.2 Coloração de adipócitos e revelação dos resultados

Observado o aparecimento de vesículas de adipócitos, através do microscópio *Olympus Ix71*, o meio dos poços foi descartado e estes lavados com 500  $\mu$ L de PBS 1x três vezes. Posteriormente, cada poço foi incubado com 300  $\mu$ L de PFA 4% (*EM Sciences*) durante 1 hora à TA.

O PFA foi então retirado e os poços lavados com 500  $\mu$ L de água deionizada por três vezes. Em seguida, foi adicionado 300  $\mu$ L de isopropanol 60% por 5 minutos. O isopropanol foi retirado e uma solução de corante *Oil Red* (*Sigma Aldrich*) 60% preparada em água deionizada foi adicionada, agindo durante 1 hora.

Posteriormente, os poços foram novamente lavados três vezes com água deionizada, e 300  $\mu$ L de solução de corante hematoxilina (*Sigma Aldrich*) foi adicionada, agindo por 5 minutos. Por fim, os poços foram lavados três vezes com 500  $\mu$ L de água deionizada e depois seguiram para visualização em microscópio utilizando campo claro (*Olympus Ix71*). Foram adquiridas fotos de cada tratamento.

### 3.6 Análise de *Western blot*

#### 3.6.1 Extração e quantificação de proteínas

Para validar os achados da triagem em larga escala, feita anteriormente pelo laboratório, as UM-MSK foram plaqueadas em 9 diferentes tratamentos em uma placa de 48 poços: Meio de cultura com a droga indirubina em 50  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ; 12,5  $\mu\text{M}$ ; 6,2  $\mu\text{M}$ ; 3,1  $\mu\text{M}$ ; e 0,8  $\mu\text{M}$ ; Meio com DMSO 025% e condição controle. Em cada poço foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de meio correspondente. Após 72 horas, o meio de cultura foi retirada, as monocamadas foram lavadas com PBS 1X e iniciou-se a extração de proteínas utilizando 75  $\mu\text{L}$  de tampão RIPA (*Sigma Life Science*) suplementado com 10% de inibidor de protease e 1% de inibidor de fosfatase. Então, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 4 °C e 18.000 x g, e os sobrenadantes proteicos foram recolhidos.

Para a quantificação proteica, utilizou-se o método de Bradford. A partir dos sobrenadantes, foram feitas duas diluições em água deionizada em 80  $\mu\text{L}$  de volume final, 1:20 e 1:50. As diluições de cada tratamento foram feitas em triplicata amostral, utilizando uma placa óptica de 96 poços. Na mesma placa, foi montada uma curva de diluição usando água deionizada e proteína bovina sérica (ABS) com concentração conhecida (2 mg/mL). Posteriormente, 200  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford (*Bio-Rad*) foi aplicado por poço, agindo por 5 minutos a TA. A absorbância dos poços foi calculada utilizando o espectrofotômetro *SpectraMax M5* e o software *SpectraMax V.S (Molecular Devices LLC)*. Então, as concentrações das proteínas foram aferidas com base na equação da reta da curva de ABS gerada, com o auxílio do Excel.

#### 3.6.2 Eletroforese

A partir das concentrações das proteínas purificadas, uma mesma massa foi obtida de todas. Estas massas variavam de 15 a 25  $\mu\text{g}$  dependendo do experimento. Elas então foram misturadas, na proporção de 3:1, com solução de NuPAGE (*Life Technologies*) suplementado com 20% de  $\beta$ -mercaptoetanol (*Sigma Aldrich*), em eppendorfs de 1,5  $\mu\text{L}$ . As amostras foram então aquecidas a 95 °C por 10 min, sendo posteriormente aplicadas e separadas em um gel SDS-PAGE de

poliacrilamida 10% (*Mini-PROTEAN TGX Gels*). Este gel foi colocado dentro de uma cuba eletrolítica (*Bio-Rad*), e sobre o sistema foi colocado um tampão de corrida e aplicada uma voltagem entre 40 a 80 Volts, através da fonte de energia *PowerPac HV* (*Bio-Rad*). Com o fim da corrida eletrolítica, o gel foi realocado para um sistema com tampão de transferência, que permitiu a migração das bandas proteicas para uma membrana de PVDF 0,45  $\mu\text{M}$  (*GE Healthcare*). Nesta etapa, foi aplicada uma voltagem de 35 Volts por 80 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada por 1 hora em 5 mL de solução de tampão TBS-T com 3% de *blotting-grade blocker* (*Bio-Rad*). Após isso, com base em um marcador de peso molecular (*Bio-Rad*), a membrana foi cortada um pouco acima da faixa em que estavam as proteínas de 50 quilodaltons (kDA). Essa etapa ocorreu pois houve a marcação paralela de duas proteínas alvos, usando anticorpos específicos diluídos em TBS-T: anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) 1:20.000 (*Abcam*), na faixa de 37 kDA; anti-COX-2 1:1000 (*Abcam*), na faixa de 69 kDA; Cada parte foi incubada paralelamente em overnight com seu anticorpos correspondente, à 4 °C e sob leve agitação.

No dia seguinte, a sondagem foi interrompida lavando cuidadosamente as duas partes das membrana com 5 mL de TBS-T, a cada 5 minutos, até 4 vezes. Posteriormente, uma solução contendo o anticorpo secundário, anti-*rabbit* (*Abcam*), foi adicionada sob ambas as partes durante 90 minutos. Depois, o mesmo processo de lavagem se repetiu. Por fim, eles foram dispostos sob um suporte, e ao longo de toda a extensão foi aplicada 1 mL de um mix de um kit de revelação contendo tampão de peróxido estabilizado e intensificador de luminol 1:1 (*Thermo Fisher*). Depois de 3 minutos, as partes são encaixadas sobre um suporte e colocadas dentro do fotodocumentador *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* e analisada pelo software *Image Lab* (*Bio-Rad*).

### **3.7 Análise da expressão gênica**

#### **3.7.1 Extração e quantificação de RNA**

Para a obtenção de RNA as UC-MSC foram cultivadas nos tratamentos supracitados, cada um repetido em triplicata. Depois de 72 horas de cultivo, o RNA foi extraído utilizando o kit *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*).

Para a extração, as monocamadas de cada condição foram coletadas utilizando 350  $\mu\text{L}$  de tampão RLT suplementado com 1%  $\beta$ -mercaptoetanol (*Sigma Aldrich*). Posteriormente, adicionou-se sobre o material coletado 350  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e em seguida homogeneizou-se por breve vórtex. O volume de 700  $\mu\text{L}$  resultante foi adicionado nas colunas e posteriormente centrifugado a 8000 x *g* por 15 segundos, sendo o filtrado descartado.

Para a lavagem da coluna, adicionou-se primeiramente 700  $\mu\text{L}$  de tampão RW1 e seguiu-se para uma nova centrifugação 8000 x *g* por 15 segundos. Posteriormente, foram feitas duas etapas de lavagem com 500  $\mu\text{L}$  de tampão RPE a 8000 x *g* por 15 segundos e 2 minutos, respectivamente. Para a etapa de secagem, a coluna foi passada para um novo tubo de coleta e foi feita uma centrifugação a 8000 x *g* por 1 minuto. Por fim, os tubos de coleta foram substituídos por tubos de 1,5 mL com tampa, e 50  $\mu\text{L}$  de água RNase *free* foi adicionada em cada coluna. A última centrifugação ocorreu por 1 minuto a 8000 x *g*, permitindo a recuperação do material genético.

Com os RNAs purificados, foi feita a quantificação utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop* (*Thermo Scientific*).

### 3.7.2 Síntese de DNA complementar

Cada amostra de RNA purificado foi posteriormente transcrito em DNA complementar (cDNA) sintetizado. Para isso, foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Life Technologies*). Primeiramente foi montado o mix de reação. Para cada amostra foi considerado um mix de reação contendo 2  $\mu\text{L}$  de tampão RT 10 X; 0,8  $\mu\text{L}$  de mix de dNTP 25 X (100 mM); 2  $\mu\text{L}$  de *random primers* 10 X e 1  $\mu\text{L}$  de enzima *MultScribe Reverse Transcriptase*. O *input* de RNA total foi de 250 ng e o volume final foi de 20  $\mu\text{L}$ .

Os parâmetros de ciclagem indicados pelo kit foram: 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 120 minutos e 85 °C durante 5 minutos. Após a ciclagem, a placa foi envolvida com papel alumínio e guardada sob -20 °C.



### 3.7.3 PCR quantitativa

Para a análise de qPCR, foram utilizadas duas sondas de hidrólise: COX-2 (gene alvo - *Abcam* Hs00153133\_m1) (*Thermo Fisher Scientific*) e B2M (gene endógeno - *Abcam* Hs00187842\_m1) (*Thermo Fisher Scientific*). Para a reação utilizou-se o *TaqMan™ Universal PCR Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific*) e utilizando o equipamento *QuantStudio™ 6 and 7 flex* (*Thermo Fisher Scientific*).

Primeiramente foram montados os mix de reação, para os dois genes alvos. Para um volume final de 10 µL, foi adicionado a cada mix 5 µL de *Taqman Universal Master Mix*; 2,5 µL de água RNase free; e 0,5 de sua sonda específica 40X. Posteriormente, 2 µL de cada cDNA 1:10, previamente diluídos. Todas as reações foram montadas em triplicata.

### 3.8 Ensaio de proliferação

As UC-MSC que obtiveram resultados positivos na modulação do eixo TNF- $\alpha$  - COX-2 foram analisadas quanto a proliferação nas três condições de tratamento: condição controle, meio com DMSO 0,25% e meio com indirubina 50 µM. Para isso,  $1,7 \times 10^5$  células foram plaqueadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, em triplicata. Após 72 horas, as UC-MSC foram recolhidas enzimaticamente, marcadas com azul de tripan e contadas em uma câmara de Neubauer.

### 3.9 Análise de imunomodulação da proliferação de linfócitos T

As UC-MSCs que apresentaram acréscimo na expressão de COX-2 também foram testadas quanto a capacidade de imunomodular populações de linfócitos estimulados por mitógenos.

#### 3.9.1 Isolamento de PBMC por gradiente de densidade

Para o isolamento de PBMC partiu-se de 50 mL de sangue periférico humano. Primeiramente, o sangue foi diluído 1:1 em PBS 1x. Posteriormente, alíquotas dessa diluição foram adicionadas delicadamente sobre volume equivalente de



Ficoll-Paque (*GE Healthcare*) em tubos de falcons de 50 mL. Os tubos foram posteriormente centrifugados durante 35 minutos sem frenagem, a 1400 x g e 24 °C.

Ao fim da centrifugação, o anel de células mononucleares isolado foi coletado com uma pipeta pasteur e passado para um novo tubo de 50 mL para lavagem com PBS 1x. Para tanto, os tubos foram centrifugados a 300 x g por 10 minutos. O pellet formado foi diluído em 2 mL de PBS 1x, e uma alíquota de 60 µL foi coletada para contagem no equipamento *Sysmex KX-21N (Sysmex Corporation)*.

### **3.9.2 Marcação com CFSE e estimulação com mitógeno**

Previamente a marcação com CFSE, uma alíquota da suspensão foi coletada e ressuspendida em RPMI-1640 (*Gibco*) suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL (*Gibco*) (RPMI 10% SFB). Esta alíquota foi denominada “PBMC não marcada” e foi feita na densidade celular de  $0,5 \times 10^6$  células/mL.

O restante das PBMC seguiram para a etapa de marcação. Para tanto, elas foram alíquotadas em tubos de 50 mL e misturadas com 5 µM de 5,6-carboxyfluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) (*Invitrogen*). No processo de marcação as células foram incubadas por 20 minutos a 37 °C, sendo que a cada 5 minutos ocorreu uma etapa de homogeneização breve em vórtex.

Passada a incubação, adicionou-se 3 partes de meio RPMI 10% SFB para interromper a marcação e lavar as células. Depois de 5 minutos em repouso, as células foram centrifugadas a 300 x g durante 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células marcadas foram ressuspendidas em RPMI 10% SFB. Foi realizada uma nova contagem e duas novas suspensões celulares foram feitas.

A primeira foi denominada de “PBMC marcada e não estimulada” e foi composta somente de células marcadas com CFSE. A segunda, “PBMC marcada e estimulada” foi feita a partir das células marcadas com CFSE e que posteriormente receberam RPMI + 10% SFB suplementado com 1 µg/mL de mitógeno fitohemaglutina (PHA) (*Sigma-Aldrich*). Ambas as suspensões foram feitas com densidade celular de  $0,5 \times 10^6$  células/mL.

### 3.9.3 Co-cultivo

Previamente ao isolamento de PBMC (96 horas), a UC-MSC foi plaqueada em placas de 24 poços em duas proporções:  $2,5 \times 10^4$  e  $5 \times 10^4$  células/poço. Após um dia do plaqueamento, estas proporções foram submetidas a três condições de tratamento: condição controle, meio com DMSO 0,25% e meio com indirubina 50  $\mu$ M. As UC-MSC em suas duas proporções foram cultivadas nestes tratamentos por 72 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados delicadamente com PBS 1X. Feito a lavagem, a suspensão de “PBMC marcado e estimulado” foi distribuído sobre as monocamadas de UC-MSC no volume de 1 mL por poço. Desta forma, o co-cultivo ocorreu nas seguintes proporções: (i)  $5 \times 10^6$  de PBMC marcado e estimulado sobre uma monocamada de  $2,5 \times 10^4$  UC-MSC (1:20); (ii)  $5 \times 10^6$  de PBMC marcado e estimulado sobre uma monocamada de  $5 \times 10^4$  UC-MSC (1:10).

Como controle experimental positivo para a proliferação, uma fração da suspensão “PBMC marcado e estimulado” foi plaqueada em poço sem monocamadas de UC-MSC.

Como controle experimental de marcação com CFSE, frações da suspensão “PBMC Não marcada” e “PBMC marcada” também foram plaqueadas em poços sem monocamadas de UC-MSC.

As placas de co-cultivo e controle experimental foram incubadas em estufa por cinco dias.

### 3.9.4 Análise de proliferação por citometria de fluxo

Depois de 5 dias de co-cultivo, os PBMC foram colhidos das placas e transferidos para tubos de citometria (*BD Trucount Tubes*). Em cada tubo foi adicionado 15  $\mu$ L de mix de anticorpos contendo: anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 distribuídos nas fluorescências (*BD Pharmigen*).

Posteriormente os tubos foram incubados no escuro à TA por 15 minutos, centrifugados a  $600 \times g$  por 3 minutos (*Thermo IEC Centra CL2 Centrifuge*) e o sobrenadante foi descartado. Os pellets foram ressuspensos em 200  $\mu$ L de PBS 1x (*Cayman Chemical*) e as células analisadas em um citômetro de fluxo (*BD FACSymphony A1*), utilizando o *software FACSDiva v9.02*.

### 3.10 Análise de expressão de genes inflamatórios em PBMC estimulado com PHA

Nesta análise, populações de PBMC foram isoladas a partir do procedimento de Ficoll-Paque (*GE Healthcare*) como descrito acima. As células isoladas foram cultivadas em placas de 24 poços por 5 dias em meio RPMI 10% SFB suplementado com 1,5 µg/mL de PHA. O RNA destas células foi então extraído utilizando o kit *RNeasy Mini Kit (Qiagen)*, no dia do isolamento (dia 0), e posteriormente no terceiro (dia 3) e quinto dia de cultivo (dia 5).

Para o dia 0,  $5 \times 10^6$  células obtidas foram ressuspensas em 350 µL de tampão de coleta do *kit* composto RLT + 1% de β-mercaptoetanol (*Sigma Aldrich*). Para os dias 3 e 5, as PBMC foram colhidas e centrifugadas a 1400 x g por 10 minutos. O pellet resultante foi ressuspensado no mesmo tampão de coleta descrito acima. A extração e purificação de RNA total foi realizada como descrito no item 3.7.1.

A expressão gênica dos três pontos de coleta (Dia 0, 3 e 5) para mediadores inflamatórios foi feita utilizando o kit *GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System*. Cada amostra foi analisada em duplicata em relação aos seguintes genes alvo: IL-18 (Hs01038788\_m1), IL-8 (Hs00174103\_m1), IL-6 (Hs00985639\_m1), IL-4 (Hs00174122\_m1), CXCL-12 (Quimiocina 12 do motivo C-X-C) (Hs00171022\_m1), IFN-γ (Hs00989291\_m1) e TNF-α (Hs00174128\_m1) e também em relação aos endógenos: GAPDH (4326317E) e B2M (Hs00187842\_m1).

Considerando 10 µL de volume final, cada reação continha: 5 µL de *GoTaq Probe qPCR Master Mix* com dNTP; 0,2 µL de *GoScript RT Mix for 1-Step RT-qPCR*; 0,5 µL de *random primers*; 1,3 µL de água RNase free; e 0,5 de sonda específica por gene. Em cada poço foi colocado 7,5 µL de mix específico e 2,5 µL de amostra de RNA total. Posteriormente, a placa de PCR foi selada e levada ao equipamento *ABI 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems)*. Os parâmetros de ciclagem foram 1 ciclo por 15 minutos à 45 °C, 1 ciclo por 2 minutos à 95 °C, 40 ciclos por 15 segundos a 95 °C e 40 ciclos por 1 minuto a 60 °C.

### 3.11 Análise dos dados

Na análise estatística foi realizada a comparação das médias obtidas por meio de testes não paramétricos e não pareados, ou seja, sem considerar a distribuição normal. Logo, para a comparação de três ou mais amostras, foi utilizado teste de Kruskal-Wallis (com pós teste de Dunn), e para duas amostras, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As análises foram feitas com o auxílio do *software GraphPad Prism 6*, considerando o nível de significância igual a 0,05. Os dados das análises quantitativas foram apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão.

## **4. Resultados**

### **4.1 Caracterização das células mesenquimais**

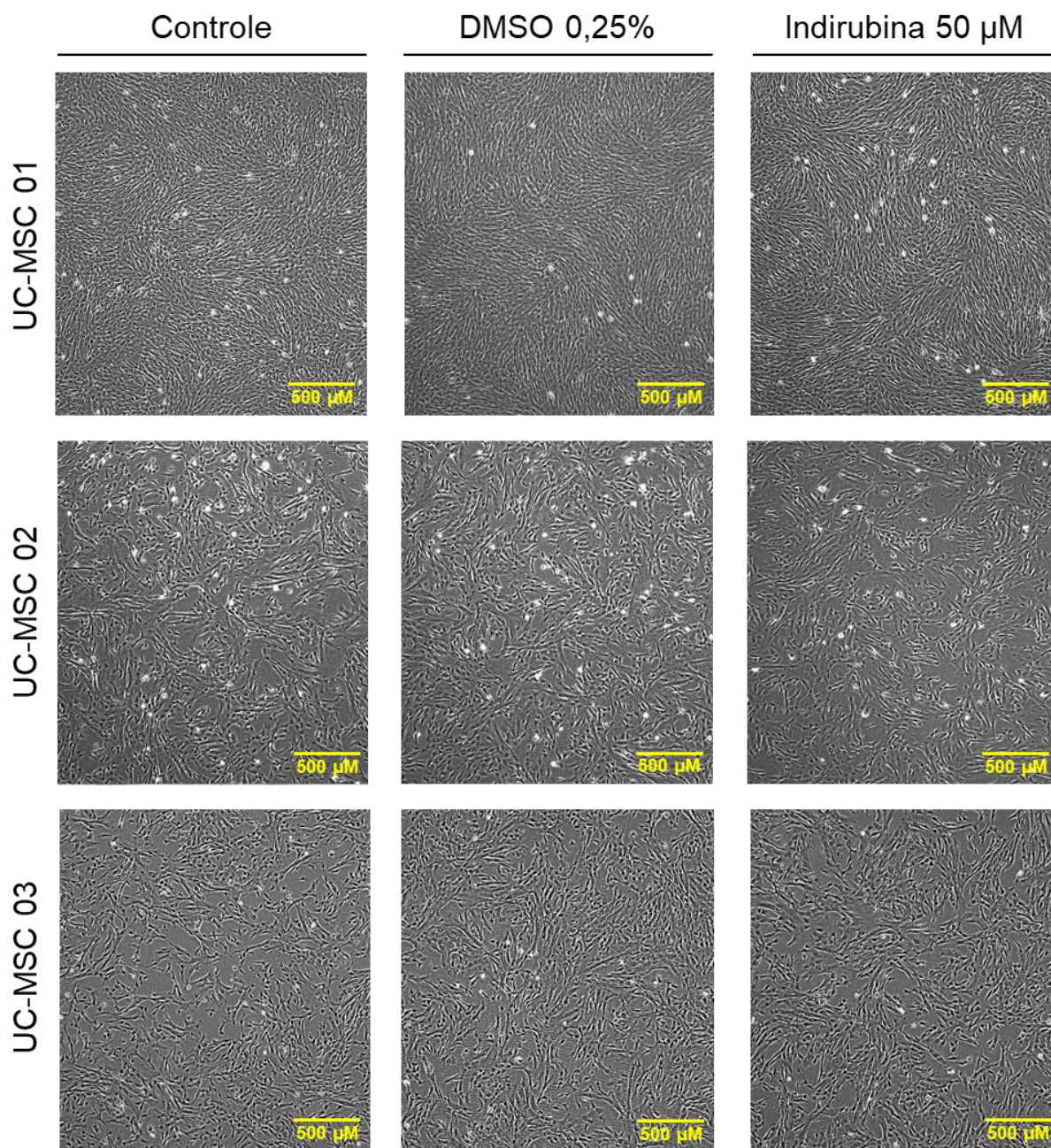
#### **4.1.1 Morfologia**

Não houve alterações morfológicas entre os tratamentos preconizados para as três UC-MSC avaliadas. Em todas as análises, as células apresentaram padrões típicos de mesenquimais, como morfologia fibroblastóide, alongada e fusiforme, núcleo oval e central, e capacidade de adesão ao plástico, conforme visto na Figura 2 e destacado na Figura 3.

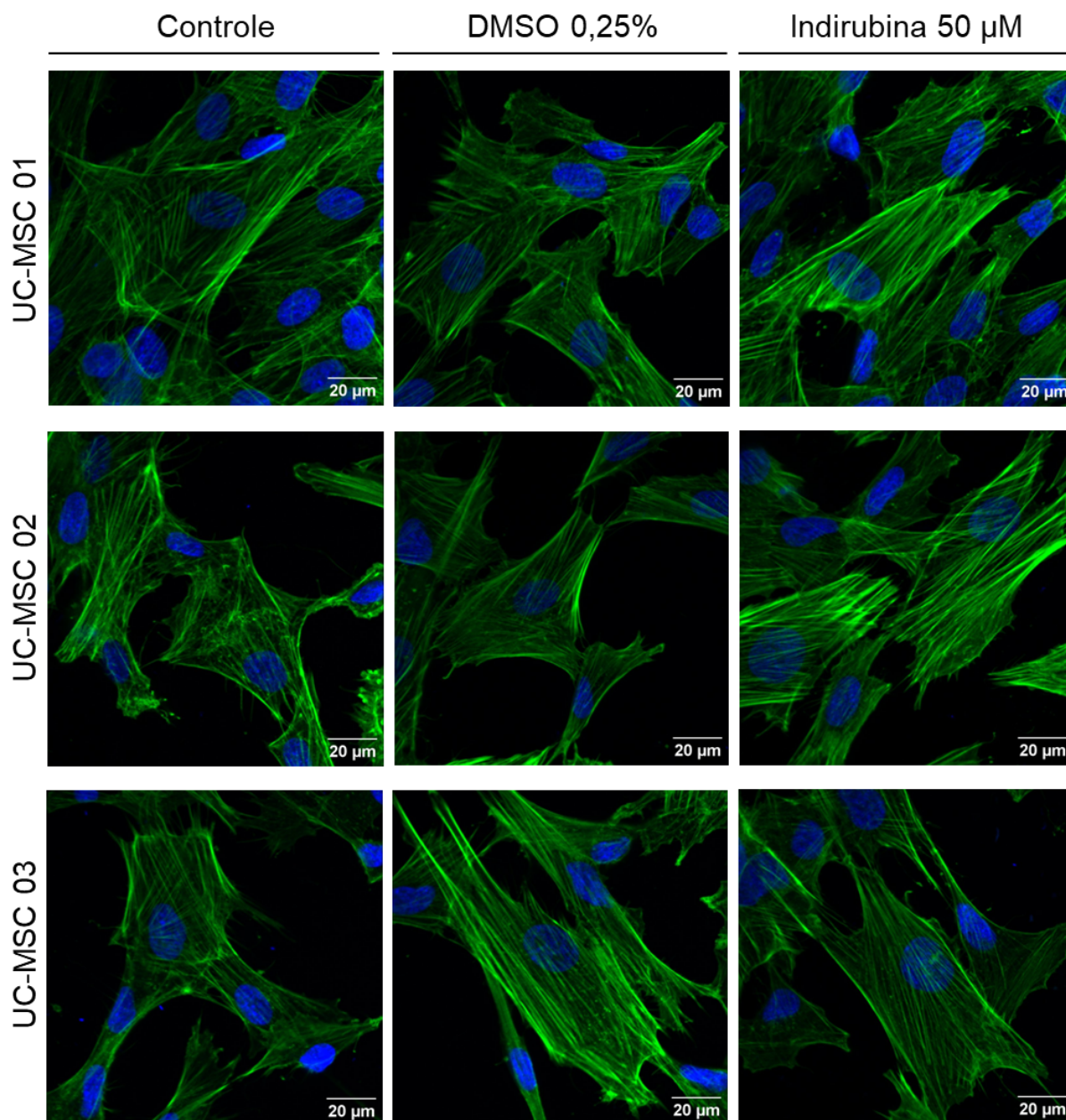
Em comparação com as outras amostras, a Figura 2 mostra que a UC-MSC 01 apresentou uma capacidade de expansão celular mais rápida, notada pela alta confluência.



**Figura 3:** Caracterização morfológica das UC-MSC por microscopia de contraste de fase.



Análise morfológica por microscopia de contraste de fase foi realizada para três amostras de células tronco mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC 01, UC-MSC 02 e UC-MSC 03), cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de PHCS, divididas em três condições experimentais (Controle, DMSO 0,25% e Indirubina 50  $\mu$ M). Foram semeadas  $1,7 \times 10^5$  células em 5 mL de meio, em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>. Após três dias de expansão, as imagens foram adquiridas utilizando um aumento de 40X. As barras de escala representam 500  $\mu$ M. Fonte: Próprio autor.

**Figura 4:** Caracterização morfológica das UC-MSC por análise confocal.

A análise de fluorescência confocal foi realizada para três amostras de células tronco mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC 01, UC-MSC 02 e UC-MSC 03), cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de PHCS, divididas em três condições experimentais (Controle, DMSO 0,25% e Indirubina 50  $\mu$ M). Foram semeadas  $1,8 \times 10^4$  células em 1 mL de meio, em placas de 24 poços. Após três dias de expansão, as imagens foram adquiridas utilizando um aumento de 100X. As barras de escala representam 20  $\mu$ m. Fonte: Próprio autor.



#### 4.1.2 Perfil imunofenotípico

O perfil imunofenotípico das três UC-MSC, em todos os tratamentos, foram similares e se enquadraram dentro dos critérios de caracterização de uma célula mesenquimal.

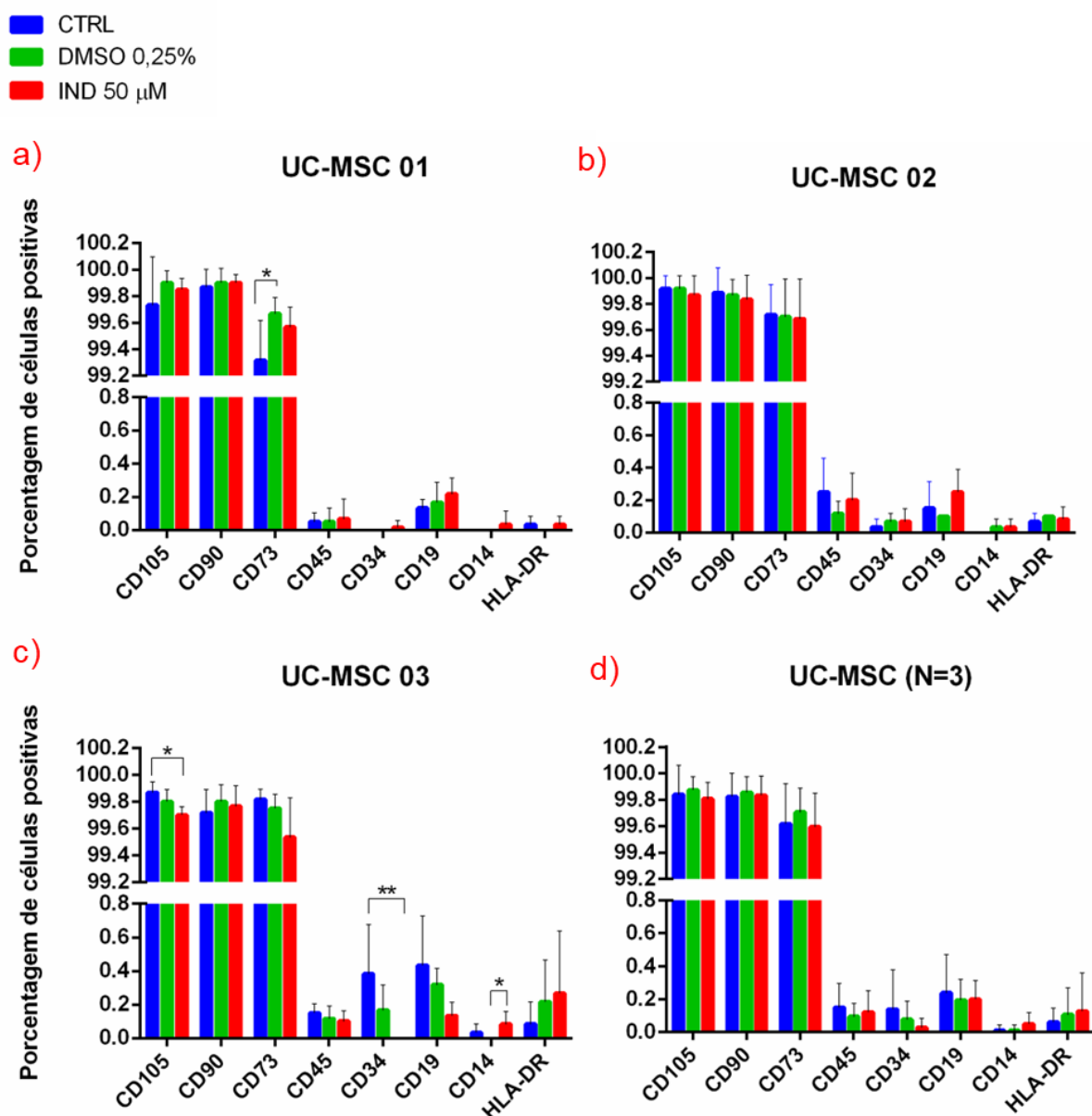
Os resultados mostraram que a população de células positivas para os marcadores de superfície celular CD105, CD90 e CD73 foram superiores a 99% para todas as linhagens, ao passo que as células positivas para os marcadores CD45, CD34, CD19, CD14 e HLA-DR foram inferiores a 1%. Foram encontradas diferenças estatísticas abaixo:

Na UC-MSC 01: para o marcador 73, entre os tratamentos controle ( $99,32 \pm 0,30$ ) e DMSO 0,25% ( $99,67 \pm 0,12$ ). Na UC-MSC 03: para o marcador CD105, entre os tratamentos controle ( $99,87 \pm 0,08$ ) e indirubina 50  $\mu\text{M}$  ( $99,70 \pm 0,06$ ); para o marcador CD34, entre os tratamentos controle ( $0,38 \pm 0,29$ ) e indirubina 50  $\mu\text{M}$  ( $0 \pm 0$ ); e para o marcador CD14, entre os tratamentos DMSO 0,25% ( $0 \pm 0$ ) e indirubina 50  $\mu\text{M}$  ( $0,08 \pm 0,08$ ).

Tanto a UC-MSC 02 quanto o perfil imunofenotípico médio das três amostras (Figura 4 - item d) não tiveram diferença estatística. Todavia, as diferenças encontradas não contrariaram os limites estabelecidos pela International Society of Cell Therapy (ISCT) a caracterização das células (Figura 4).



**Figura 5:** Perfil imunofenotípico das UC-MSC.



Análises do perfil imunofenotípico de três amostras de células tronco mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC), em (a), (b) e (c), e do perfil médio destas (d). Os gráficos representam a porcentagem de células positivas para cada um de nove marcadores de superfície celular: CD105, CD90, CD73, CD45, CD34, CD19, CD14 e HLA-DR. As barras azuis representam as células cultivadas na condição de controle (CTRL), as barras verdes às cultivadas na presença de DMSO 0,25% e as vermelhas às cultivadas na presença de indirubina 50 $\mu$ M (IND 50 $\mu$ M). A análise estatística foi feita com teste de Kruskal-Wallis com teste comparativo de Dunn com  $\alpha = 0,05$ . ( $p > 0,05$  (não significativo),  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*)). Fonte: Próprio autor.

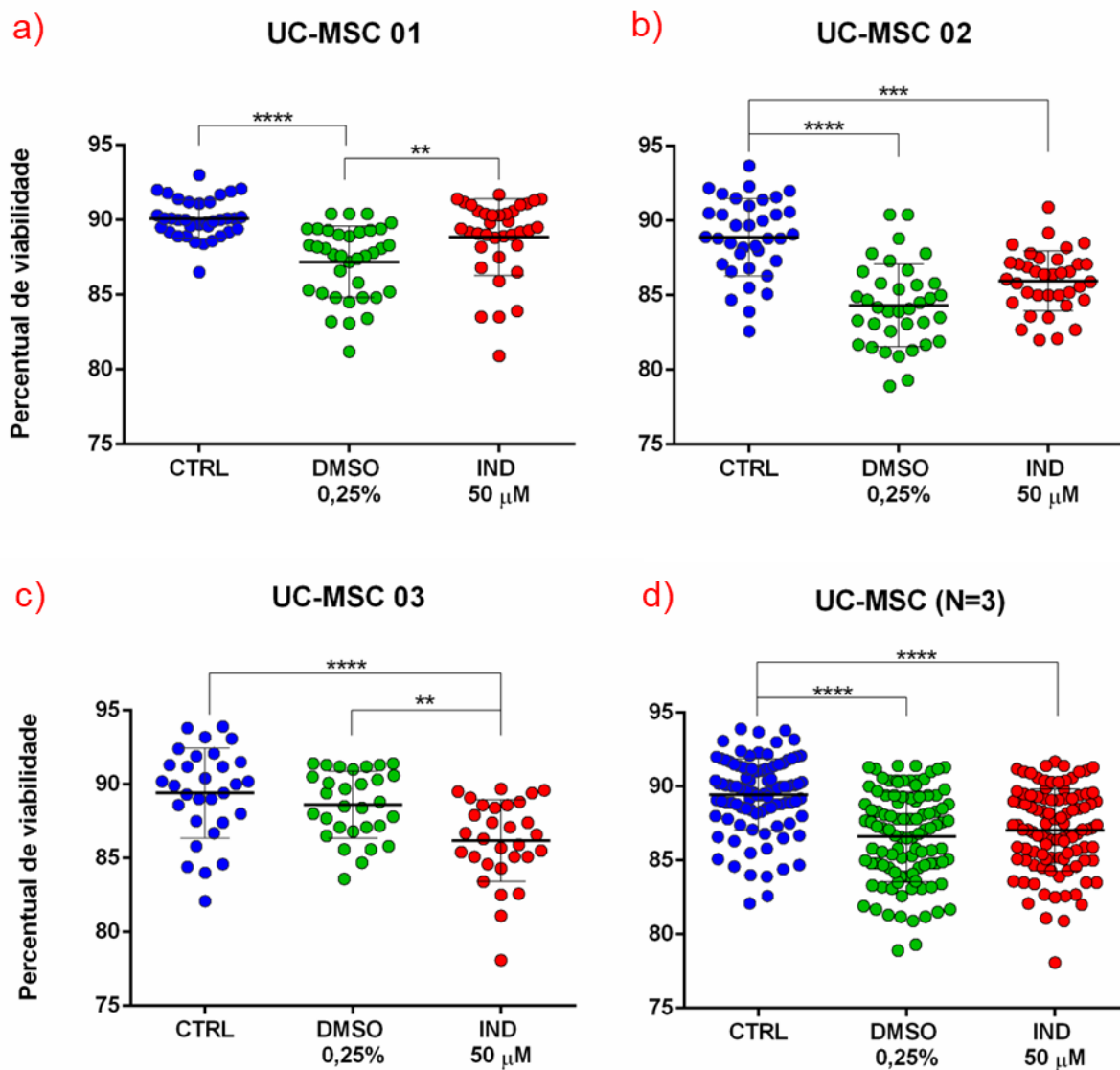
### 4.1.3 Viabilidade celular

A Figura 5 demonstra que os tratamentos não alteraram significativamente a viabilidade das linhagens celulares entre os tratamentos. O valor médio ficou acima de 84% para todas as UC-MSCs. Foram encontradas as diferenças estatísticas nas seguintes condições abaixo:

Na UC-MSC 01, para o tratamento com DMSO 0,25% ( $87,19 \pm 2,34$ ) em relação ao controle ( $90,08 \pm 1,29$ ), e em relação a indirubina 50  $\mu\text{M}$  ( $88,86 \pm 2,57$ ). Na UC-MSC 02: para o tratamento controle ( $88,89 \pm 2,59$ ) em relação ao DMSO 0,25% ( $84,33 \pm 2,77$ ), e em relação a indirubina 50  $\mu\text{M}$  ( $85,96 \pm 2,01$ ). Na UC-MSC 03: para o tratamento com indirubina 50  $\mu\text{M}$  ( $88,18 \pm 2,76$ ) em relação ao controle ( $89,40 \pm 3,05$ ), e em relação ao DMSO 0,25% ( $88,62 \pm 2,26$ ).

Em todas as condições avaliadas, o tratamento controle demonstrou maior porcentagem de células viáveis. No entanto, as diferenças de viabilidade entre todos os tratamentos foi inferior a 5%.

**Figura 6:** Análises de viabilidade das UC-MSC.

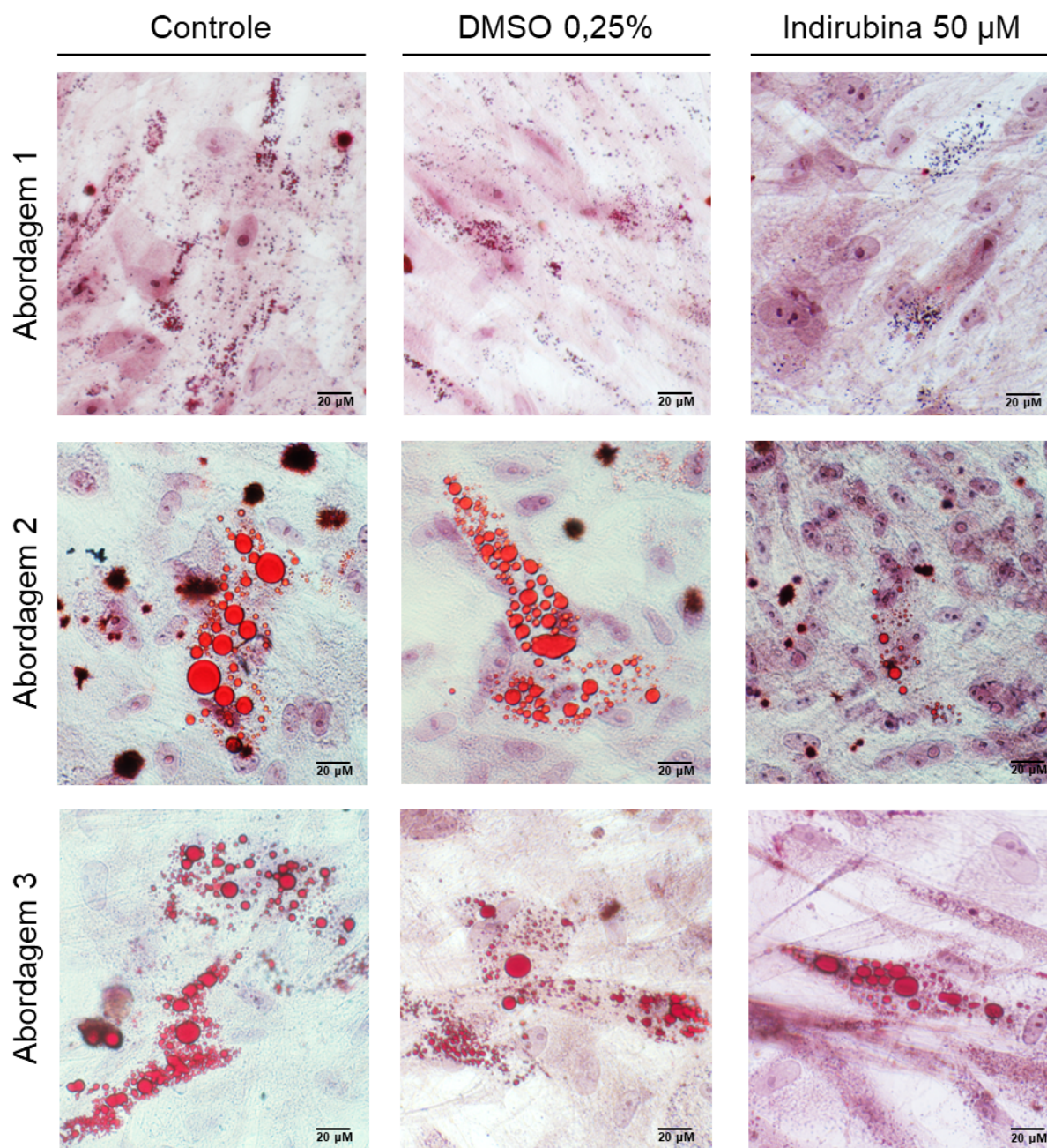


Análises de perfil viabilidade de três amostras de células tronco mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC), em (a), (b) e (c), e da viabilidade média destas (d). Cada ponto em cada gráfico indica a porcentagem de células coradas com solução de corante DAPI-Hydrochloride (Cayman Chemical) diluída em PBS (células vivas) dentro de uma população total de UC-MSC, presente em um único tubo de citometria. As contagens foram divididas por condição experimental: Pontos em azul são populações tratadas na condição controle (CTRL), pontos em verde são as tratadas na condição com DMSO 0,25% e pontos em vermelho são as tratadas na condição com indirubina 50μM (IND 50μM). A análise estatística foi feita com teste de Kruskal-Wallis com teste comparativo de Dunn com  $\alpha = 0,05$ . ( $p > 0,05$  (não significativa),  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,00001$  (\*\*\*\*). Fonte: Próprio autor.

#### **4.1.4 Capacidade de diferenciação**

As abordagens de diferenciação testaram a UC-MSK 03 quanto a capacidade de diferenciação adipogênica. Nas três abordagens utilizadas, indicadas na Figura 6, os resultados mostraram que as células, independente de seu tratamento prévio, foram capazes de gerar vesículas de adipócitos. Contudo, a “Abordagem 1” apresentou uma indução mais lenta, apresentando vesículas tardias e menores. Tanto a “Abordagem 2” quanto a “Abordagem 3” demonstraram maior eficiência na indução adipogênica, contudo, a “Abordagem 2” apresentou a deposição de artefatos escuros e pontiagudos, em todos os tratamentos. Já a “Abordagem 3” resultou em boa formação e vesículas para todos os tratamentos, e não houve aparecimento de artefatos.

**Figura 7:** Padrões de morfologia de UC-MSC induzida à diferenciação adipogênica em três diferentes metodologias.

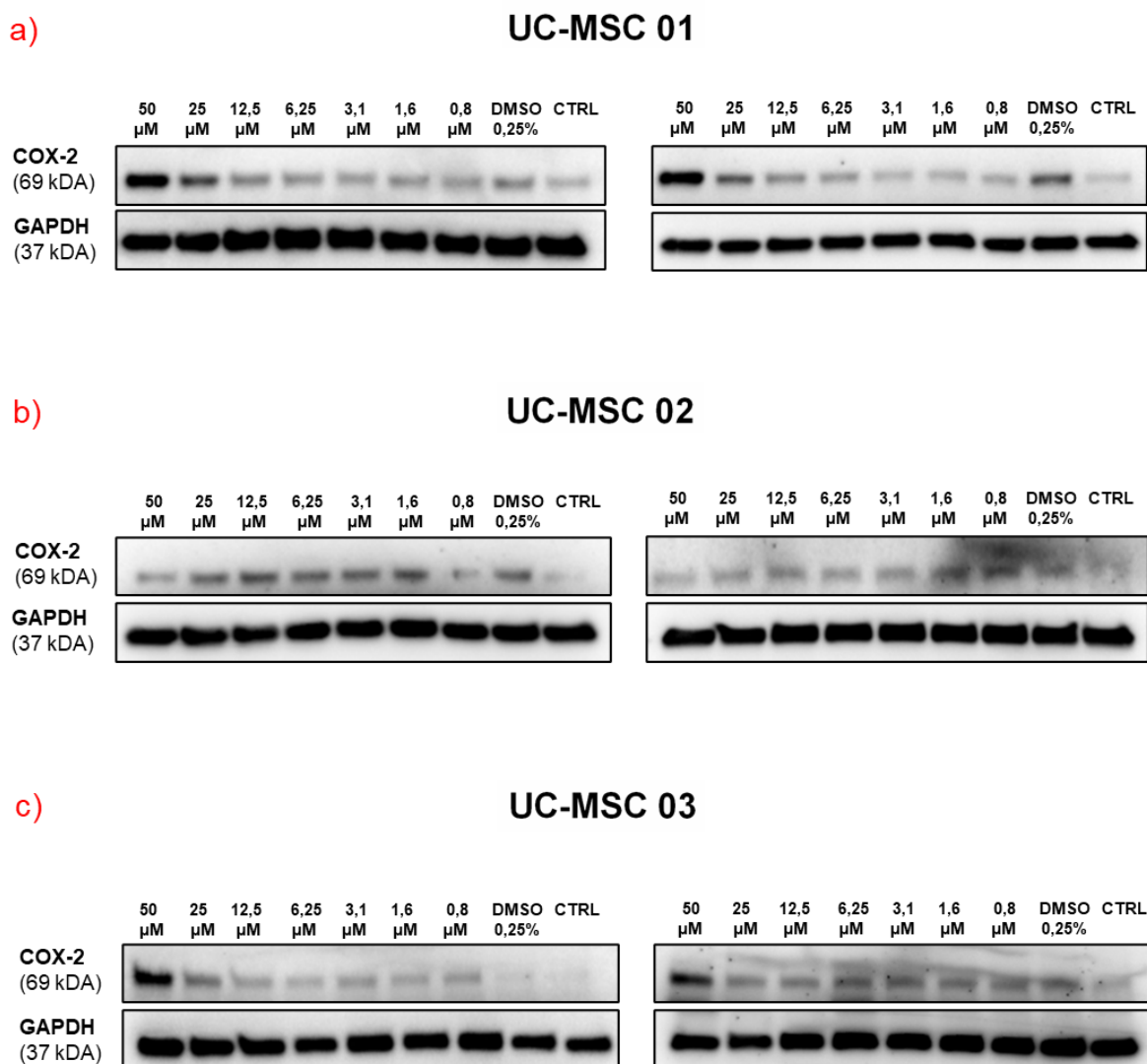


Análise morfológica por microscopia de contraste de fase de uma amostra de células tronco estromal mesenquimal do cordão umbilical (UC-MSC 03) induzida à diferenciação em adipócitos, a partir de três metodologias (indicadas como “Abordagem 1”, “Abordagem 2” e “Abordagem 3”). As células foram cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de PHCS, 3,44 mM de insulina, 0,2 mM de indometacina e 0,2 mM de dexametasona, e foram divididas em três condições experimentais (Controle, DMSO 0,25% e Indirubina 50  $\mu\text{M}$ ). Para o experimento, as células foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de  $1,8 \times 10^4$  células/poço, e mantidas em condição de normóxia (5%  $\text{CO}_2$ ). Após cerca de 30 dias de indução, as imagens foram adquiridas utilizando um aumento de 600X. As barras de escala representam 20  $\mu\text{M}$ . Fonte: Próprio autor.

## 4.2 Expressão da proteína COX-2 nas linhagens de UC-MSC

Conforme visto na Figura 7, a análise de expressão proteica forneceu resultados qualitativos, a partir de uma duplicata experimental da técnica de *Western blot*, para as três linhagens de UC-MSC, avaliando os tratamentos controle, DMSO 0,25% e uma diluição seriada do composto indirubina (começando em 50  $\mu$ M e indo até 0,8  $\mu$ M). Nos tratamentos de todas as células, o controle endógeno GAPDH apresentou bandas intensas e similares. Já para a enzima COX-2, tanto a UC-MSC 01 quanto a UC-MSC 03, tiveram bandas mais intensas para as células tratadas com indirubina, sobretudo na concentração de 50  $\mu$ M. Já a UC-MSC 02, não demonstrou diferenças claras entre a intensidade das bandas.



**Figura 8:** Expressão proteica das UC-MSC através de *Western blot*.

Padrão de expressão de bandas proteicas de três amostras de células tronco mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC), em (a), (b) e (c), divididas em nove condições experimentais: Indirubina 50 μM; 25 μM; 12,5 μM; 6,25 μM; 3,1 μM; 1,6 μM; e 0,8 μM; Controle (CTRL) e DMSO 0,25%. Para a corrida eletroforética foram utilizadas de 15 a 25 μg de proteína por amostra, aplicadas em gel de poli-acrilamida 10%, com tamanho molecular medido em quilodaltos (kDA). Posteriormente, as intensidades das bandas foram obtidas a partir da marcação com anticorpos com especificidade para a proteína alvo ciclo-oxigenase 2 COX-2 (69 kDA) e para a proteína de controle endógeno anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (37 kDA). Fonte: Próprio autor.

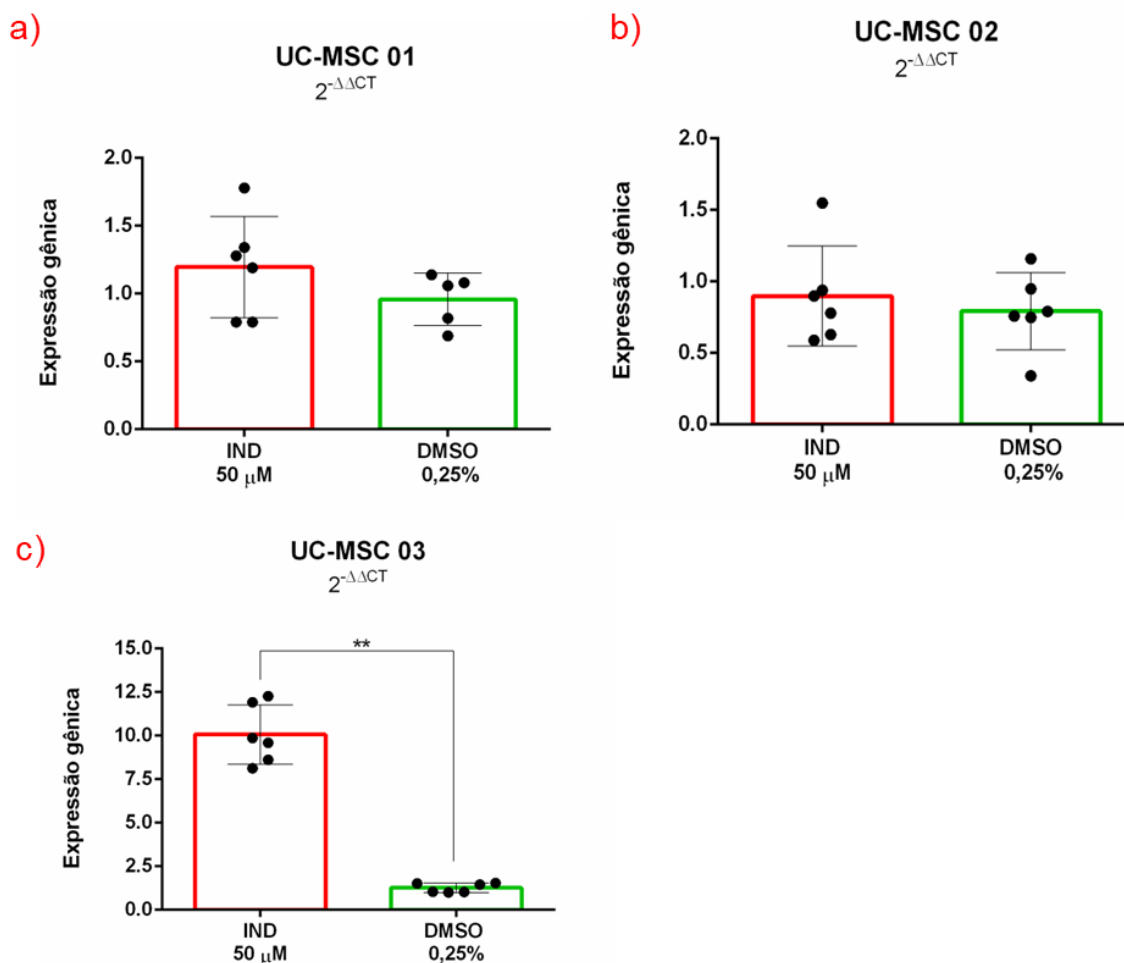
### 4.3 Expressão gênica de COX-2 nas linhagens de UC-MSC

Os gráficos gerados para a expressão gênica (Figura 8) se deram a partir da aplicação do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . O método comparou os tratamentos DMSO 0,25% e indirubina 50  $\mu$ M a partir da normalização pela amostra calibradora (condição controle). Foi visto que a UC-MSC 03 foi a única linhagem que apresentou diferenças significativas na expressão gênica entre os dois tratamentos. O incremento de expressão de COX-2 após o tratamento com indirubina nesta amostra foi de 7,93 vezes: condição indirubina 50  $\mu$ M ( $10,07 \pm 1,70$ ) *versus* condição DMSO 0,25% ( $1,27 \pm 0,27$ ).

Nas demais amostras, a expressão gênica foi baixa. Para a UC-MSC-01, incremento de 1,14 vezes: condição indirubina 50  $\mu$ M ( $0,90 \pm 0,35$ ) *versus* condição DMSO 0,25% ( $0,79 \pm 0,27$ ). Para a UC-MSC-02, incremento de 1,25 vezes: condição indirubina 50  $\mu$ M ( $1,20 \pm 0,37$ ) *versus* condição DMSO 0,25% ( $0,96 \pm 0,19$ ).



**Figura 9:** Expressão gênica das UC-MSC pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

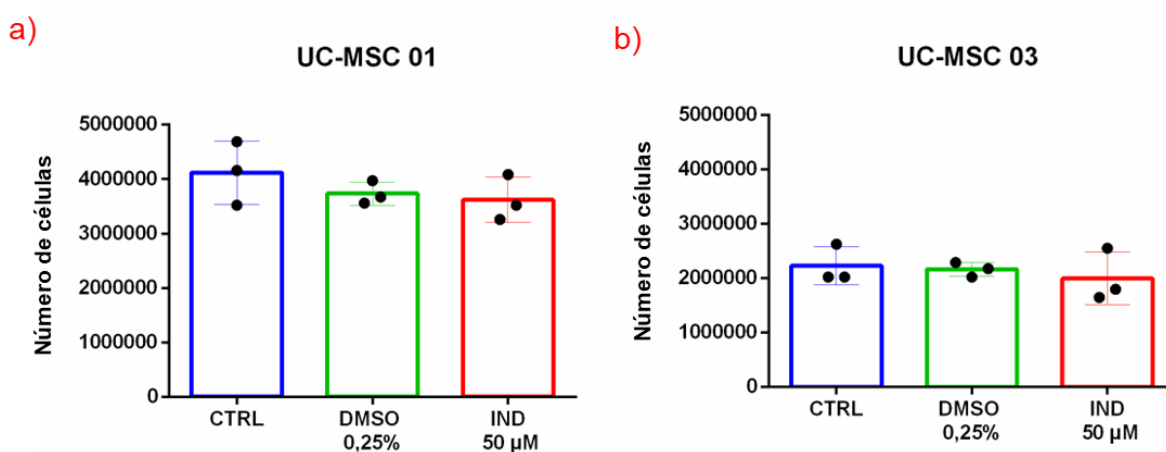


Análises de expressão gênica de três amostras de células tronco mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC), em (a), (b) e (c), pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Cada ponto em cada gráfico indica uma amostra de DNA complementar (cDNA) amplificada e quantificada por qPCR. As células foram obtidas de três tratamentos: condição controle, que é amostra calibradora do método, condição com DMSO 0,25% e condição com indirubina 50 $\mu$ M (IND 50 $\mu$ M). A análise estatística foi feita com teste de Mann-Whitney com  $\alpha = 0,05$ . ( $p > 0,05$  (não significativo),  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*)). Fonte: Próprio autor.

#### 4.4 Proliferação celular

Os dados de proliferação celular (Figura 9), tanto da UC-MSC 01 quanto da UC-MSC 03, demonstraram que as condições DMSO 0,25% e Indirubina 50  $\mu\text{M}$  não causaram mudanças acentuadas nesta propriedade em comparação ao controle: Para a UC-MSC 01, queda de 9,29% no tratamento com DMSO 0,25% e de 12,12% no tratamento com Indirubina 50  $\mu\text{M}$ ; Para a UC-MSC 03, queda de 2,81% no tratamento com DMSO 0,25% e de 10,11% no tratamento com Indirubina 50  $\mu\text{M}$ .

**Figura 10:** Proliferação celular de duas UC-MSC.



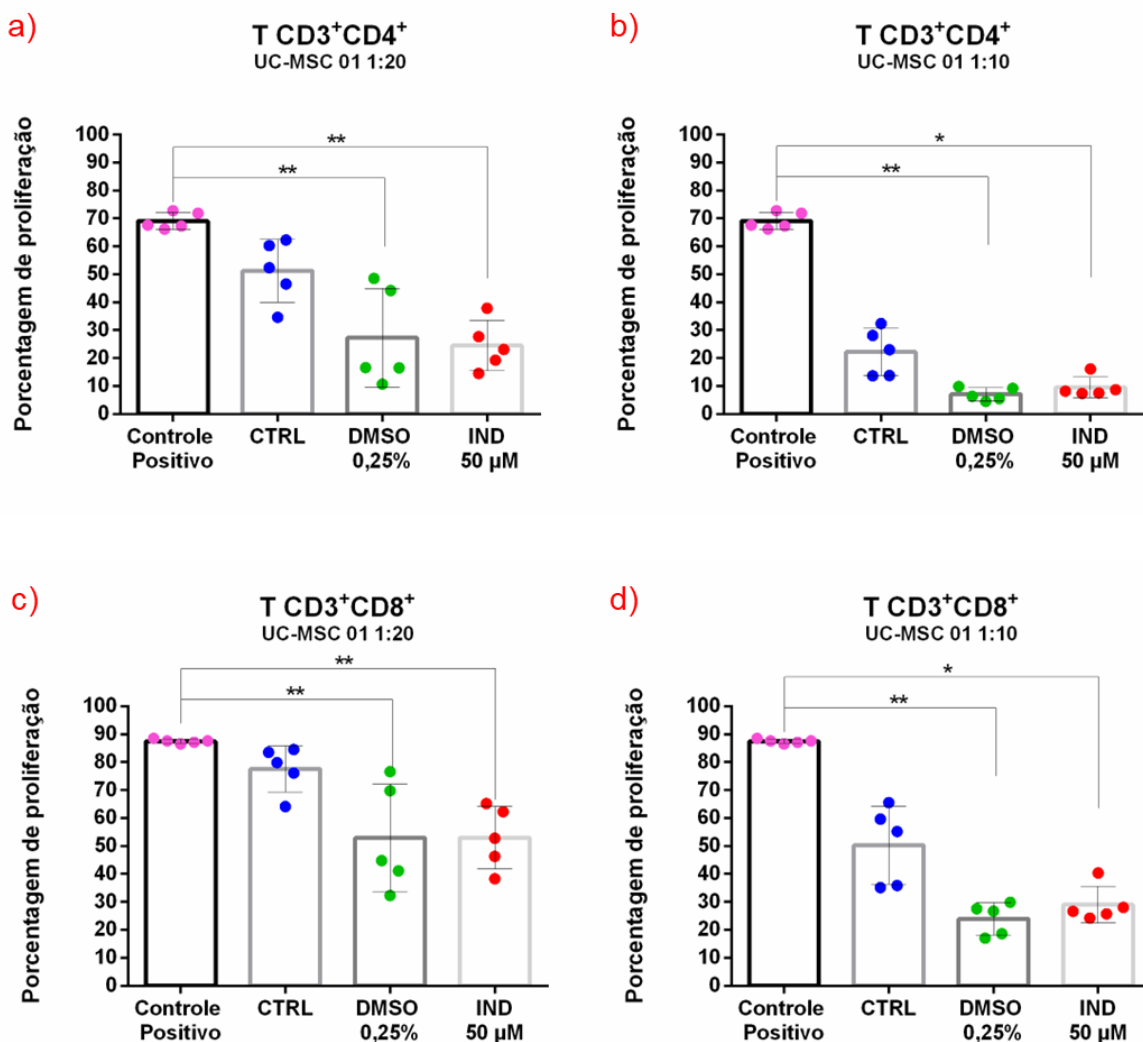
Análises de proliferação de duas amostras de células tronco mesenquimais do cordão umbilical (UC-MSC), em (a) e (b), para três diferentes tratamentos experimentais: condição controle (CTRL), condição com DMSO 0,25% e condição com indirubina 50 $\mu\text{M}$  (IND 50 $\mu\text{M}$ ). Para cada condição foram semeadas  $1,7 \times 10^5$  células em garrafas de 25  $\text{cm}^2$ , em triplicata experimental, com cada unicata representada por um ponto nos gráficos. Após três dias de tratamento as células foram colhidas enzimaticamente e tiveram sua contagem aferida a partir de coloração com azul de tripan e utilização de uma câmara de Neubauer. A análise estatística foi feita com teste de Kruskal-Wallis com teste comparativo de Dunn com  $\alpha = 0,05$ . ( $p > 0,05$  (não significante)). Fonte: Próprio autor.

#### 4.5 Potencial de imunomodulação

A análise de imunomodulação da UC-MSc 01, mostrou que independente das condições de tratamento (CTRL, DMSO 0,25% e IND 50  $\mu$ M) e densidade celular da monocamada (UC-MSc:PBMC 1:10 e 1:20), o co-cultivo de PBMC com UC-MSc resulta na diminuição na porcentagem de populações de linfócitos TCD4 e TCD8 positivas (Figura 11). Tanto para o linfócito TCD4 (itens a e b) quanto para o TCD8 (itens c e d), a proporção de 1:10 contém a proliferação de forma mais acentuada em comparação a proporção de 1:20.

Com relação aos tratamentos, foi observado que, nas duas subpopulações, os co-cultivos com UC-MSc previamente tratadas com DMSO 0,25% e indirubina 50  $\mu$ M (IND 50  $\mu$ M) resultaram em maior contenção da proliferação em comparação com UC-MSc da condição controle. No entanto, as taxas de proliferação de linfócitos foram próximas e se mantiveram proporcionais para estes dois tratamentos.

**Figura 11:** Proliferação de linfócitos T co-cultivados com a UC-MSC 01.



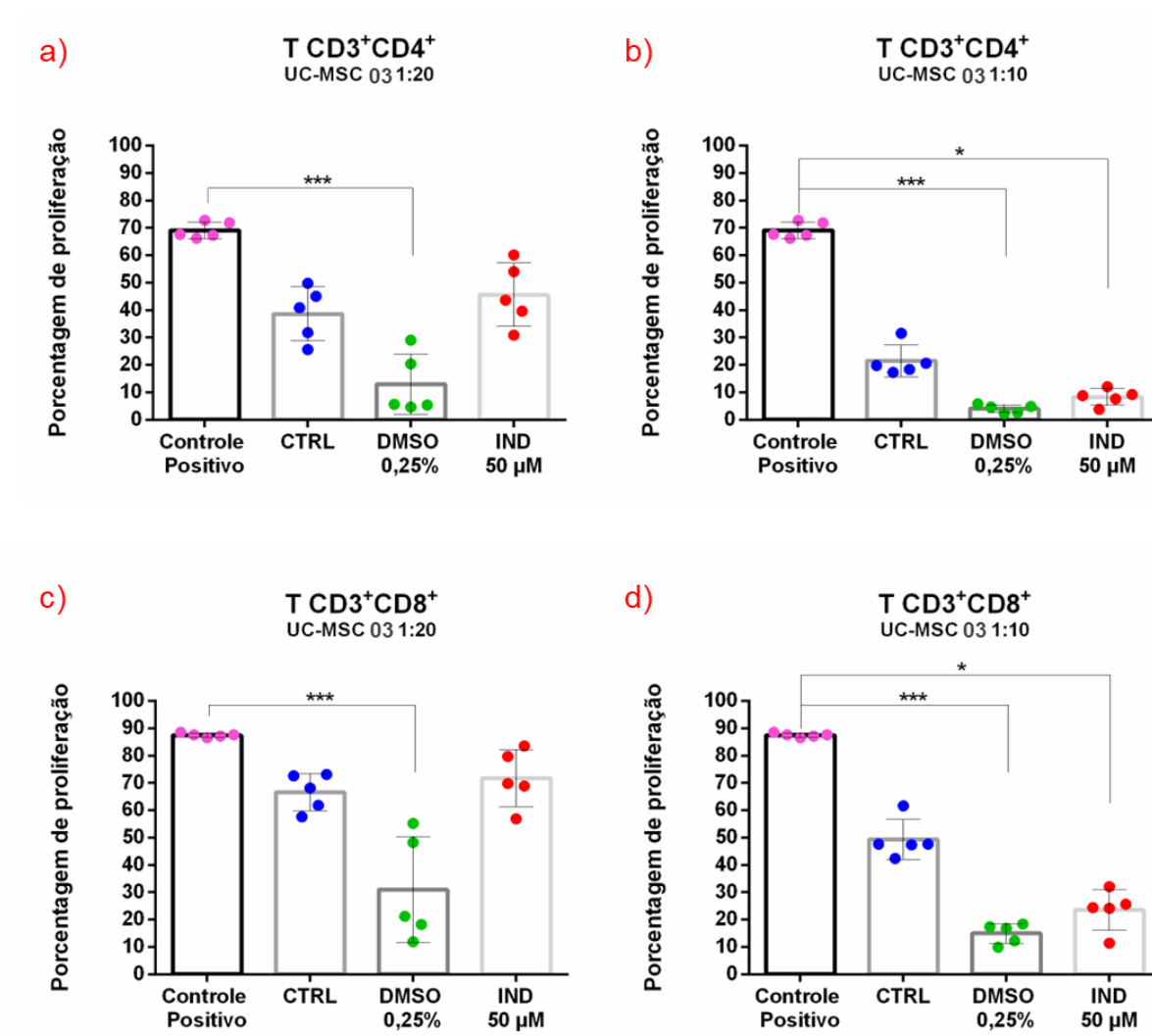
Os gráficos representam a porcentagem de linfócitos T que proliferaram em diferentes condições experimentais, após plaqueamento inicial de  $5 \times 10^5$  células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em placas de 24 poços durante cinco dias. Estas células foram marcadas com 5,6-carboxyfluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) e estimuladas com o agente mitógeno fitohemaglutinina (PHA), sendo semeadas sozinhas (Controle positivo) ou co-cultivadas com uma amostra de célula tronco mesenquimal do cordão umbilical (UC-MSC 01). Por sua vez, as UC-MSC foram anteriormente tratadas por três dias em três condições: condição controle (CTRL), DMSO 0,25% e Indirubina 50µM (IND 50µM). Para a análise, foram feitas duas proporções de co-cultivo UC-MSC/PBMC: 1:20, com  $2,5 \times 10^4$  UC-MSC inicialmente semeadas (gráficos a e c); e 1:10, com  $5 \times 10^4$  UC-MSC inicialmente semeadas (gráficos b e d). Os três diferentes co-cultivos de cada uma das duas proporções, junto com o controle positivo, foram marcados com anticorpos para identificar duas populações de linfócitos: Em (a) e (b), células positivas simultaneamente para os marcadores de superfície celular TCD3 e TCD4 (linfócitos T auxiliares); E em (c) e (d), para os marcadores TCD3 e TCD8 (linfócitos T citotóxicos). A análise estatística foi feita com teste de Kruskal-Wallis com teste comparativo de Dunn com  $\alpha = 0,05$ . ( $p > 0,05$  (não significativa),  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*)). Fonte: Próprio autor.

A UC-MSC 03 (Figura 12) obteve resultados semelhantes aos da UC-MSC 01 (Figura 11). O co-cultivo mostrou que independente das condições de tratamento e densidade celular da monocamada, as UC-MSC 03 diminuem ambas as populações de linfócitos TCD4 e TCD8 positivas, porém, com maior efetividade na proporção de 1:10.

No entanto, observado os tratamentos, foi visto que somente na proporção 1:10 (itens b e d) os co-cultivos com UC-MSC previamente tratadas com DMSO 0,25% e indirubina 50  $\mu$ M (IND 50  $\mu$ M) resultaram em maior contenção da proliferação de linfócitos em comparação com UC-MSC da condição controle. Pois na proporção de 1:20, o tratamento com IND 50  $\mu$ M conteve menos a proliferação do que a condição controle. Em todas as situações, o tratamento com DMSO 0,25% se mostrou mais efetivo que o tratamento com IND 50  $\mu$ M, principalmente na proporção de 1:10.

Na comparação de UC-MSC 01 e UC-MSC 03, também foi observado que os co-cultivos nas proporções de 1:10 de ambas as células obtiveram resultados próximos. Entretanto, ao diminuir a proporção de mesenquimais (1:20), a UC-MSC 03, em todos os tratamentos, demonstrou ter uma maior capacidade de contenção de linfócitos .

**Figura 12:** Proliferação de linfócitos T co-cultivados com a UC-MSC 03.



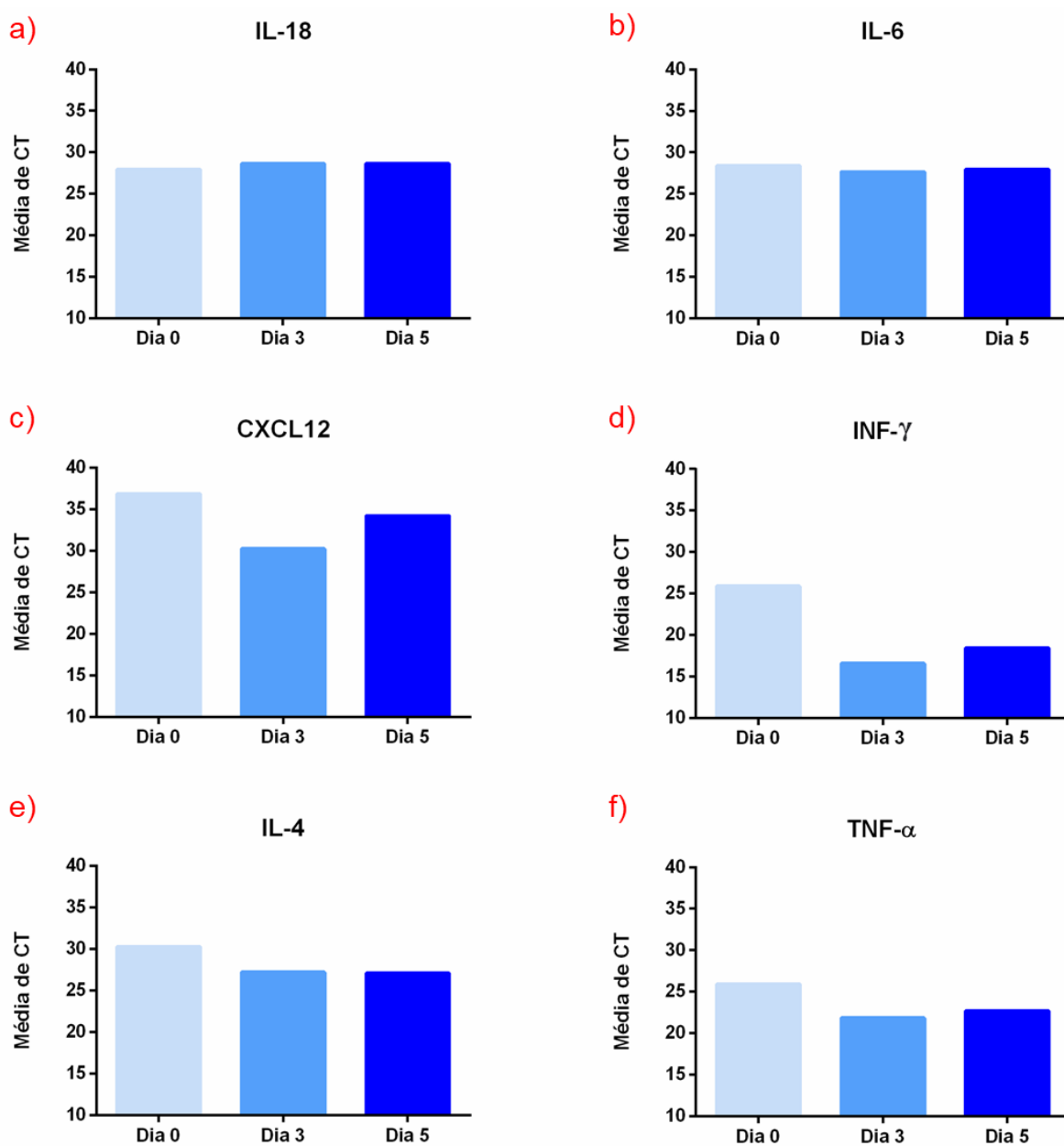
Os gráficos representam a porcentagem de linfócitos T que proliferaram em diferentes condições experimentais, após plaqueamento inicial de  $5 \times 10^5$  células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em placas de 24 poços durante cinco dias. Estas células foram marcadas com 5,6-carboxyfluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) e estimuladas com o agente mitógeno fitohemaglutinina (PHA), sendo semeadas sozinhas (Controle positivo) ou co-cultivadas com uma amostra de célula tronco mesenquimal do cordão umbilical (UC-MSC 03). Por sua vez, as UC-MSC foram anteriormente tratadas por três dias em três condições: condição controle (CTRL), DMSO 0,25% e Indirubina 50μM (IND 50μM). Para a análise, foram feitas duas proporções de co-cultivo UC-MSC/PBMC: 1:20, com  $2,5 \times 10^4$  UC-MSC inicialmente semeadas (gráficos a e c); e 1:10, com  $5 \times 10^4$  UC-MSC inicialmente semeadas (gráficos b e d). Os três diferentes co-cultivos de cada uma das duas proporções, junto com o controle positivo, foram marcados com anticorpos para identificar duas populações de linfócitos: Em (a) e (b), células positivas simultaneamente para os marcadores de superfície celular TCD3 e TCD4 (linfócitos T auxiliares); E em (c) e (d), para os marcadores TCD3 e TCD8 (linfócitos T citotóxicos). A análise estatística foi feita com teste de Kruskal-Wallis com teste comparativo de Dunn com  $\alpha = 0,05$ . ( $p > 0,05$  (não significativo),  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*)). Fonte: Próprio autor.

#### 4.6 Expressão de genes pró-inflamatórios pelo PBMC

A análise da expressão de genes inflamatórios por PBMC, feita em três diferentes tempos do cultivo celular (0, 3 e 5 dias) apresentou resultados variados para os genes alvos e para os genes endógenos avaliados (Figura 12). Para os alvos, IL-8 (Figura 12a) e IL-6 (Figura 12b) não mostraram diferenças expressivas entre nenhum dos tempos testados. Já o ligante de quimiocina motif 8 (CXCL-8) (Figura 12c) e INF- $\gamma$  (Figura 12d) demonstraram uma queda da expressão gênica (de acordo com o CT), porém, com menor pico no tempo de cultivo intermediário (dia 3). A Interleucina 4 (IL-4) (Figura 12e) e o TNF- $\alpha$  (Figura 12f) apresentaram ganho na expressão gênica, porém com menores diferenças entre o terceiro e o quinto dia avaliados. Comparando ambos os genes, mesmo com aumento de CT no quinto dia, INF- $\gamma$  apresentou ganhos de expressão mais expressivos. Por sua vez, o ligante de quimiocina motif 8 (CXCL-8) (Figura 12g), também conhecido com Interleucina-8 (IL-8), foi o único alvo que apresentou acréscimo de CT ao longo dos tempos de cultivo, que se manteve similar entre os dias 3 e dia 5. Por fim, os genes endógenos avaliados foram o GAPDH (Figura 12h) e o B2M (Figura 12i). O GAPDH apresentou maiores oscilações nos ciclos de amplificação dentro do período avaliado. Já o B2M, obteve níveis de CT semelhantes entre os dias 3 e 5.

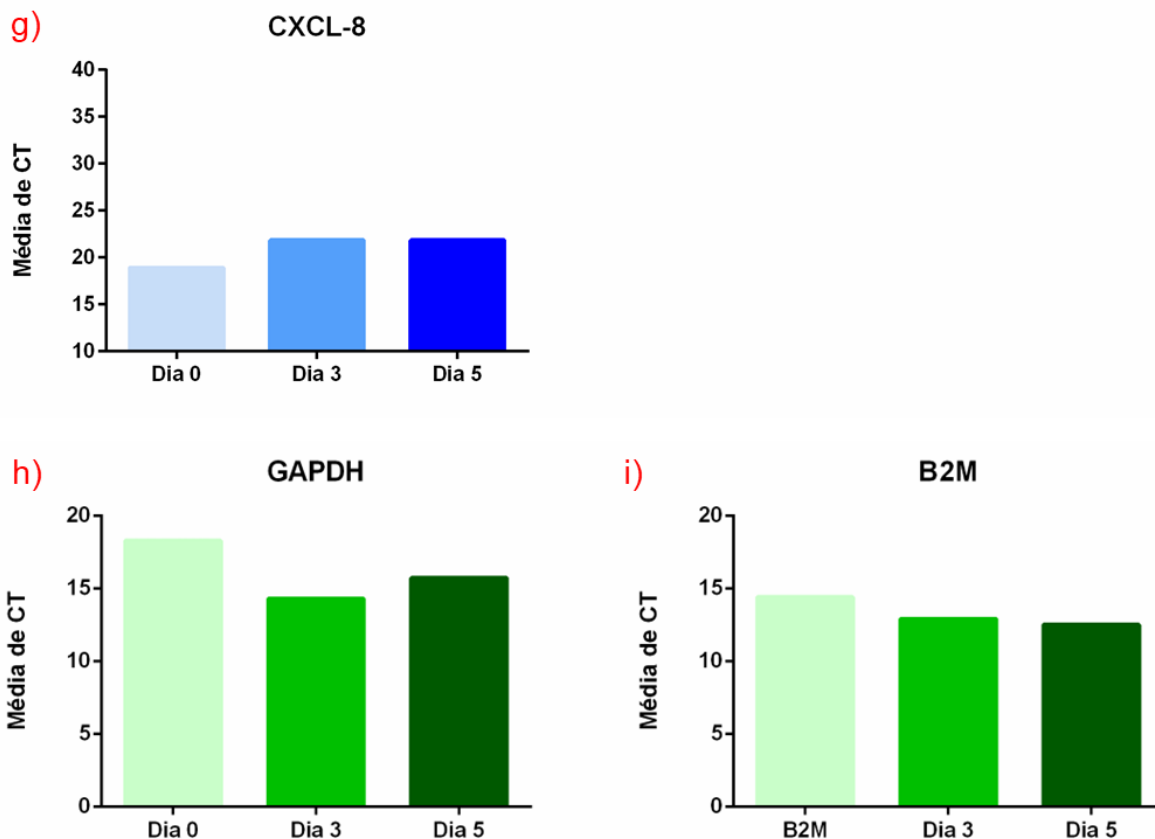
**Figura 13:** Expressão de genes inflamatórios em PBMC cultivados durante 0, 3 e 5 dias.

(continua)





**Figura 13:** Expressão de genes inflamatórios em PBMC cultivados durante 0, 3 e 5 dias.  
(conclusão)



Gráficos de comparação da expressão gênica entre três tempos de cultivo (0, 3 e 5 dias) de uma população de PBMC, quantificada através do ciclo da qPCR em que a fluorescência conjugada ao gene ultrapassa o limite (CT). Foram avaliados 9 genes, cada um com dois CT lidos a partir da aplicação em duplicata das amostras numa placa de qPCR, gerando uma média. São 7 genes relacionados à atividade inflamatória: (a) - Interleucina-18 (IL-18); (b) - Interleucina-6 (IL-6); (c) - Fator 1 derivado de células estromais (CXCL-12); (d) - Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ); (e) - Interleucina 4 (IL-4); (f) - Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); (g) - ligante de quimiocina motif 8 (CXCL-8). Os outros dois são genes que foram testados para controle endógeno: (h) - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH); (i) -  $\beta$ -2 microglobulina (B2M). Fonte: Próprio autor.

## 5. Discussão

As células estromais mesenquimais se destacam por suas propriedades regenerativas e terapêuticas, sendo utilizadas em diversas abordagens da terapia celular, principalmente como tratamento alternativo de doenças inflamatórias e autoimunes. Sua capacidade de regular a resposta imunológica, advém principalmente da sua atividade parácrina, que secreta moléculas bioativas com atuação local e sistêmica (LE BLANC e MOUGIAKAKOS, 2014). Nesse sentido, diversas abordagens terapêuticas têm sido exploradas, visando a potencialização da propriedade imunomoduladora das MSC.

O presente estudo utilizou-se da abordagem de condicionamento (*priming*) por moléculas que modulam TNF- $\alpha$  - COX-2, como uma forma de promover o potencial terapêutico destas células. Neste caso, a molécula investigada foi a indirubina, um produto natural apontado em um estudo anterior do nosso grupo (dados não publicados) como modulador de expressão gênica e proteica de COX-2 em um modelo utilizando UC-MS (n=1). Desta forma, com intuito de expandir estes achados, a influência da molécula indirubina foi analisada em mais duas amostras de UC-MS quanto a expressão gênica e proteica. Foi observado também se há interferências em características como morfologia, perfil imunofenotípico, viabilidade, proliferação e melhorias funcionais da imunomodulação nas UC-MS.

Essa caracterização da célula com o composto é importante para verificar se ocorre um ganho na eficácia terapêutica das MSC, de modo adequado ao uso clínico. O *priming* deve seguir padrões de qualidade e permitir a expansão das células sem comprometer seus atributos fundamentais (NORONHA *et al.*, 2019). Udalamaththa e colaboradores (2016) relatam que o uso de produtos naturais é importante frente aos efeitos colaterais e toxicidade que outros compostos possam gerar, como citocinas recombinantes e fatores de crescimento. Além disso, produtos naturais apresentam maior disponibilidade, o que diminui custos e torna as aplicações clínicas mais acessíveis. Entretanto, também foi ressaltado a necessidade da padronização dos testes, que envolvam ensaios que garantam a qualidade, segurança e reprodutibilidade.

Udalamaththa e colaboradores (2016) identificaram que o uso de diversos compostos advindos de extratos herbais, em MSC, apresentaram bons resultados na capacidade de diferenciação, potencial vasculogênico e neurogênico destas

células. O uso de curcumina em abordagens de priming foi ressaltado tanto neste estudo quanto no de Sharifi e colaboradores (2019), que demonstraram ganhos na viabilidade, capacidade de proliferação e regeneração das células. Atividades antioxidantes, quimioprotetoras, anti-inflamatórias e angiogênicas também foram relatadas. Outro exemplo é a tetrandrina, que foi utilizado no estudo de Yang e colaboradores (2016). Eles identificaram essa molécula a partir de um ensaio de triagem em larga escala, e observaram que seu uso como *priming* de MSC de medula óssea potencializou a produção de PGE2 a partir da modulação da via NF-kB - COX-2.

Ao analisar a influência da indirubina nas UC-MSCs, em geral, nenhuma das análises indicaram mudanças na caracterização das células, fornecendo resultados concordantes com os critérios de definição estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI *et al.*, 2006). No entanto, um dos critérios estabelece a capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagens celulares de osteoblastos, adipócitos e condroblastos, o que não foi investigado. Apesar do potencial terapêutico da diferenciação priorizou-se neste momento outras propriedades como a proliferação e a imunomodulação, que são mecanismos biológicos transientes e influenciáveis por nossa estratégia de priming de curto período de tempo (72 horas).

Todavia, abordagens de diferenciação foram testadas com a UC-MSCs 03, para dar uma visão sobre a capacidade de formação de adipócitos e qual a melhor estratégia para ensaios futuros. Foi observado que na “Abordagem 2” formaram-se artefatos semelhantes a cristais. Estes artefatos podem ter origem em diferentes etapas da diferenciação, mas foram observados somente após a coloração. Taqi e colaboradores (2018) descreveram as principais causas de artefatos em análises de lâminas histológicas, e dentre elas, estão os procedimentos de coloração. Por exemplo, o uso do corante hematoxilina desgastado ou mal homogeneizado pode levar à formação de corpos cristalinos escuros, o que condiz com as estruturas encontradas nas imagens. Estes cristais se formam quando o sulfato de alumínio, presente no corante, se converte em uma forma cristalina de potássio. A priori, a abordagem de diferenciação que se mostrou mais eficaz foi a “Abordagem 3”, pois não foram identificados artefatos e ela apresentou formação de vesículas adequadas em todos os tratamentos. Ao realizar o *priming* celular em uma placa de 25 cm<sup>2</sup> e posteriormente fazer a diferenciação em uma placa de 24 poços, diminuiu-se a

interferência de excedentes dos tratamentos que se manteriam na placa de diferenciação, o que pode ter contribuído para melhores resultados. Para maiores conclusões, a análise deverá ser repetida.

Além disso, nas análises de caracterização foi verificado que a UC-MSc 01 apresentou uma confluência maior quando comparada com a UC-MSc 02 e UC-MSc 03. Dados similares foram descritos por Markov e colaboradores (2007), que observaram que populações de UC-MSc distintas apresentavam diferenças fenotípicas: ao comparar duas amostras, viu-se que uma apresentava uma cinética de crescimento e capacidade de duplicação mais alta do que a outra, além de maior potencial de diferenciação osteogênica. As diferenças encontradas foram relacionadas à variação da expressão gênica natural entre as amostras. Isto ocorre devido às variações epigenéticas, ocasionadas por diferenças hereditárias intrínsecas ou a estímulos ambientais (WANG *et al.*, 2020).

Para a análise de *Western blot*, avaliou-se a expressão proteica de COX-2 a partir de uma diluição seriada do composto indirubina, começando por 50  $\mu$ M e finalizando em 0,8  $\mu$ M. A concentração de 50  $\mu$ M foi a usada no ensaio de triagem em larga escala e logo considerou-se importante observar se haveria modulação de COX-2 em concentrações menores.

Observou-se que tanto para a UC-MSc 01 quanto para a UC-MSc 03 o pré-tratamento com 50  $\mu$ M de indirubina aumentou a expressão de COX-2 em comparação com as demais condições. Entretanto, a UC-MSc 02 não demonstrou modulação. Aparentemente, as características intrínsecas e epigenéticas de cada UC-MSc poderiam explicar o perfil de expressão de COX-2 único em cada amostra. A expressão de diferentes proteínas reguladoras geram diferentes combinações de éxons, modificações pós-traducionais e interações entre moléculas, consequentemente, alterando a expressão proteica. A partir disso, o tratamento com o composto obtém respostas distintas ao interagir com os padrões genéticos de cada amostra. Estudos apontaram que mudanças epigenéticas também são decorrentes de processamento e cultivo de MSC, e pelo tratamento com a própria molécula alvo que geram mudanças na homeostase das células (NORONHA *et al.*, 2019. SUI *et al.*, 2020). Para maiores conclusões, análises complementares serão realizadas.

Observando que no *Western blot*, a concentração de 50  $\mu$ M de indirubina se sobressaiu sobre as demais concentrações de *priming*, esta condição foi

selecionada para a análise de expressão gênica, juntamente com os tratamentos DMSO 0,25% e controle. No entanto, a condição controle foi usada como normalizadora da análise  $\Delta\Delta Ct$ , de modo que foram comparados os outros dois tratamentos a partir dela. Foi observado que, apenas na UC-MSC 03, o tratamento com a droga aumentou a expressão de COX-2 em relação ao tratamento com DMSO. Portanto, esta amostra seguiu como esperada, já que indicou modulação proteica na análise de *Western blot*. A UC-MSC 02 também demonstrou um resultado previsto, já que não indicou modulação proteica.

No entanto, a UC-MSC 01 obteve resultados positivos apenas no *Western blot*, não indicando modulação gênica. Uma interpretação para os resultados da UC-MSC 01 é que os mecanismos moleculares promovidos pela indirubina ocasionaram uma super expressão proteica de COX-2, mesmo que a expressão gênica tenha se mantido mais baixa (VOGEL e MARCOTTE, 2012).

A expressão proteica pode ser afetada por vários fatores, incluindo a estabilidade e a eficiência do processamento da cadeia de mRNA, a regulação pós-transcricional e a interação entre proteínas. Tais mecanismos podem ter atuado de modo a aumentar a eficiência da tradução ou mesmo diminuir a degradação da proteína gerada, o que leva a maiores quantificações. São necessárias maiores análises para investigar os mecanismos regulatórios que o composto é capaz de afetar (GOLDBERG, 2003; VOGEL e MARCOTTE, 2012).

Como a UC-MSC 02 não demonstrou perfil de modulação positiva para COX-2 nós seguimos apenas com a 01 e 03 para as próximas análises. Foi observado primeiramente o comportamento da proliferação celular depois dos três dias de *priming*. Para as duas amostras testadas, foi visto que não há diferença significativa entre nenhum dos tratamentos. Diante disso, concluiu-se que a indirubina poderia ser associada a cultura sem comprometer a quantidade de células. Dados similares foram observados por Sharifi e colaboradores (2019).

Nas análises de imunomodulação, foi visto que ao aumentar as concentrações de mesenquimais semeadas para o co-cultivo, aumenta-se a capacidade de diminuir a proliferação de linfócitos. Em linhas gerais, tanto a UC-MSC 01 quanto a UC-MSC 03 demonstraram que os tratamentos com indirubina 50  $\mu M$  e DMSO 0,25% diminuem a proliferação de linfócitos em comparação com a condição controle. No entanto, não há conclusões se indirubina tem potencial para

potencializar a capacidade funcional imunomodulatória das UC-MSC, já que o controle negativo (DMSO 0,25%) apresentou resultados semelhantes.

O uso de DMSO já foi relacionado à diminuição da proliferação de linfócitos, no entanto, ele é mais significativo quando em concentrações maiores (DE ABREU COSTA *et al.*, 2017). É necessário repetir ou mudar a estratégia experimental para resultados mais conclusivos. Uma abordagem seria a utilização de membranas transwell, que permite analisar diretamente a atividade parácrina da célula, bloqueando o contato célula-a-célula, o que pode levar a resultados diferentes (NG *et al.*, 2016).

Sabendo que a imunomodulação pode se dar de diferentes formas, e não apenas pelo controle da proliferação celular, foi elaborado um ensaio de qPCR para analisar a expressão de genes inflamatórios em linfócitos co-cultivados, comparando os pré-tratamentos preconizados para as UC-MSC. Foram observados quais genes têm sua expressão em PBMC diminuída após 3 e 5 dias de cultivo. Para o ensaio, os genes foram selecionados após busca na literatura e disponibilidade pelo laboratório. Além disso, dois genes de controle endógeno também foram testados.

Os resultados preliminares mostraram que IL-18 e IL-6 não apresentaram mudanças significativas após o co-cultivo. Já CXCL-12 e IFN- $\gamma$  aumentaram sua expressão, no entanto, houve queda entre o terceiro e o quinto dia. Enquanto isso, a expressão de CXCL-8 apenas diminuiu. Por sua vez, IL-4 e TNF- $\alpha$  também aumentaram a expressão, no entanto, sem alterações dos níveis entre o terceiro e o quinto dia. Os controles demonstraram comportamentos semelhantes aos genes alvo: B2M e GAPDH apresentaram aumento da expressão gênica, no entanto GAPDH teve uma queda da expressão entre o terceiro e o quinto dia.

Portanto, os genes IFN- $\gamma$ , IL-4 e TNF- $\alpha$  foram identificados com ganhos mais expressivos de expressão gênica ao longo de 5 dias de cultivo, sendo *targets* interessantes para uma futura análise de co-cultivo. Estes genes já são relatados a muito tempo como citocinas expressas em populações de PBMC (HAGIWARA *et al.*, 1995; RIGANO *et al.*, 1999). Para controle endógeno, B2M foi identificado como o melhor candidato, pois apresentou uma expressão mais constante. No entanto, a análise leva a refletir se 5 dias de cultivo seria o ideal para avaliar a imunomodulação, já que alguns genes demonstraram maiores ganhos no tempo intermediário de três dias.

Ainda é necessário avaliar novas estratégias no tratamento das MSC como: aumentar o tempo do *priming* ou mesmo a concentração da droga, visando um ganho na modulação do eixo TNF- $\alpha$  - COX-2 e nos resultados de diferenciação destas células; analisar diferentes tempos de co-cultivos, bem como outras populações de linfócitos afetadas (Tregs); alterar as condições de cultivo, a composição do meio e/ou utilizar métodos de cultura tridimensionais e membrana porosas, como as *transwel*. Além disso, a quantificação de PGE2 através de ELISA se mostra um investimento que trará maior clareza à ação da indirubina sobre as UC-MSC. Contudo, os resultados encontrados representam um grande avanço na produção de MSC em condições compatíveis com um produto mais eficiente e seguro para futuras aplicações clínicas.

## Conclusões

Após o *priming* das UC-MSc, verificou-se que a indirubina não altera a morfologia, perfil imunofenotípico, viabilidade e proliferação das células. Além disso, o composto não interferiu na capacidade de diferenciação adipogênica, e a “Abordagem 3” se mostrou mais promissora. Os dados de expressão gênica e proteica indicam que a modulação do eixo TNF- $\alpha$ -COX-2 apresenta variação entre amostras de UC-MSc. Dentre as três, a UC-MSc 03 se destacou, apresentando maior modulação positiva.

Com relação ao ensaio de imunomodulação, observou-se que as UC-MSc são imunomoduladoras funcionais, e que houve uma maior contenção de linfócitos nos tratamentos com DMSO e indirubina. No entanto, não é possível associar o efeito à droga ou ao DMSO pois eles apresentaram valores de inibição similares. Uma alternativa para esse ensaio seria estudar o perfil de expressão gênica da população de PBMC estimulada e co-cultivada com as MSc. A partir do experimento de expressão de genes inflamatórios por PBMC, definiu-se os genes INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 como alvos interessantes para a análise mencionada.

Por fim, outras abordagens de *priming*, estratégias experimentais e análises adicionais podem enriquecer o estudo e trazer clareza aos dados encontrados. A quantificação de PGE2 e um ensaio EC<sub>50</sub> (a concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo) são ensaios que serão realizados futuramente.



## Referências bibliográficas

- AGGARWAL, Bharat B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature reviews immunology**, v. 3, n. 9, p. 745-756, set. 2003.
- BIEBACK, Karen et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. **Stem cells**, v. 27, n. 9, p. 2331-2341, set. 2009.
- BOBIS, Sylwia; JAROCHA, Danuta; MAJKA, Marcin. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 44, n. 4, p. 215-230, fev. 2006.
- BUNNELL, Bruce A. et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. **Methods**, v. 45, n. 2, p. 115-120, jun. 2008.
- COULSON-THOMAS, Vivien Jane et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress host rejection: the role of the glycocalyx. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 34, p. 23465-23481, ago. 2014.
- DA SILVA MEIRELLES, Lindolfo et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n. 5-6, p. 419-427, dez. 2009.
- DE ABREU COSTA, Lucas et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) decreases cell proliferation and TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-2 cytokines production in cultures of peripheral blood lymphocytes. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1789, nov. 2017.
- DOMINICI, M. L. B. K. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, jan. 2006.
- DOS SANTOS, Vanessa Tieko Marques et al. Characterization of human AB serum for mesenchymal stromal cell expansion. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 11-21, jan. 2017.
- DOTOLI, G. M. et al. Mesenchymal stromal cell infusion to treat steroid-refractory acute GvHD III/IV after hematopoietic stem cell transplantation. **Bone marrow transplantation**, v. 52, n. 6, p. 859-862, mar. 2017.
- DUFFY, Michelle M. et al. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. **Stem cell research & therapy**, v. 2, p. 1-9, ago. 2011.

- EIRO, Noemi et al. Importance of the origin of mesenchymal (stem) stromal cells in cancer biology: "alliance" or "war" in intercellular signals. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 1-19, jun. 2021.
- EL OMAR, Reine et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies?. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 20, n. 5, p. 523-544, abr. 2014.
- FAN, Xing-Liang et al. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. **Cellular and molecular life sciences**, v. 77, p. 2771-2794, jan. 2020.
- FERRARA, James LM et al. Graft-versus-host disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9674, p. 1550-1561, mai. 2009.
- FONG, Eliza LS; CHAN, Casey K.; GOODMAN, Stuart B. Stem cell homing in musculoskeletal injury. **Biomaterials**, v. 32, n. 2, p. 395-409, jan. 2011.
- FU, Xiaorong et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 784, jul. 2019.
- GALIPEAU, Jacques; SENSÉBÉ, Luc. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. **Cell stem cell**, v. 22, n. 6, p. 824-833, jun. 2018.
- GOLDBERG, Alfred L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 895-899, dez. 2003.
- GRAHAM, Christopher D.; FAUZA, Dario O. Isolation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid and placenta. **Current protocols in stem cell biology**, v. 35, n. 1, p. 1E. 2.1-1E. 2.14, nov. 2015.
- GUIOTTO, M. et al. Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-14, set. 2020.
- HAGIWARA, Eri et al. Phenotype and frequency of cells secreting IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN and TNF- $\alpha$  in human peripheral blood. **Cytokine**, v. 7, n. 8, p. 815-822, nov. 1995.
- HAN, Yu et al. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 886, ago. 2019.
- HARRELL, C. Randall et al. Molecular mechanisms responsible for anti-inflammatory and immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell-derived factors. In: **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Springer International, p. 187-206, jun. 2019.

- HARRIS, S. G. et al. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 144–150, mar. 2002.
- HERNÁNDEZ, Marita et al. Signaling mechanisms involved in the activation of arachidonic acid metabolism in human astrocytoma cells by tumor necrosis factor- $\alpha$ : phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and transactivation of cyclooxygenase-2. **Journal of neurochemistry**, v. 73, n. 4, p. 1641-1649, jan. 2002.
- HUANG, Mingcheng et al. Indirubin inhibits the migration, invasion, and activation of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. **Inflammation Research**, v. 66, p. 433-440, mar. 2017.
- KRAMPERA, Mauro et al. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells - The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. **Cytotherapy**, v. 15, n. 9, p. 1054-1061, set. 2013.
- KULESZA, Agnieszka; PACZEK, Leszek; BURDZINSKA, Anna. The Role of COX-2 and PGE2 in the Regulation of Immunomodulation and Other Functions of Mesenchymal Stromal Cells. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, p. 445, fev. 2023.
- KUSUMA, Gina D. et al. Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect. **Stem cells and development**, v. 26, n. 9, p. 617-631, mai. 2017.
- LE BLANC, Katarina et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **The Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1439-1441, mai. 2004.
- LE BLANC, Katarina et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **The Lancet**, v. 371, n. 9624, p. 1579-1586, mai. 2008.
- LE BLANC, Katarina; MOUGIAKAKOS, Dimitrios. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 383-396, out. 2012.
- LIAU, Ling Ling et al. Treatment of spinal cord injury with mesenchymal stem cells. **Cell & bioscience**, v. 10, n. 1, p. 1-17, set. 2020.
- MARKOV, Vladimir et al. Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles. **Stem cells and development**, v. 16, n. 1, p. 53-74, mai. 2007.

- MEBARKI, Miryam *et al.* Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, fev. 2021.
- MELDRUM, Daniel R. *et al.* Adaptive and maladaptive mechanisms of cellular priming. **Annals of surgery**, v. 226, n. 5, p. 587, nov. 1997.
- NG, Jia *et al.* Immunomodulatory properties of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 12, p. 2844-2853, mai. 2016.
- NORONHA, Nádia de Cássia *et al.* Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. **Stem cell research & therapy**, v. 10, n. 1, p. 1-21, mai. 2019.
- OZKUL, Yusuf; GALDERISI, Umberto. The impact of epigenetics on mesenchymal stem cell biology. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 11, p. 2393-2401, mar. 2016.
- PITTENGER, Mark F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, abr. 1999.
- PITTENGER, Mark F., *et al.* "Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress." **NPJ Regenerative medicine** 4.1:22, dez. 2019.
- RIGANO, R. *et al.* Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pharmacologically treated cystic echinococcosis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 118, n. 1, p. 95-101, out. 1999.
- SENSEBÉ, Luc; GADELORGE, Mélanie; FLEURY-CAPPELLESSO, Sandrine. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. **Stem cell research & therapy**, v. 4, n. 3, p. 1-6, mai. 2013.
- SHAER, Anahita *et al.* Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cells derived from placental decidua basalis; umbilical cord Wharton's jelly and amniotic membrane. **Pakistan journal of medical sciences**, v. 30, n. 5, p. 1022, out. 2014.
- SHAH, Khalid *et al.* Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 64, n. 8, p. 739-748, jun. 2012.
- SHARIFI, Simin *et al.* Stem cell therapy: curcumin does the trick. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 11, p. 2927-2937, ago. 2019.
- SRINIVASAN, Akshaya *et al.* Strategies to enhance immunomodulatory properties and reduce heterogeneity in mesenchymal stromal cells during ex vivo expansion. **Cytotherapy**, mai. 2022.

- SUI, Bing-Dong et al. Epigenetic regulation of mesenchymal stem cell homeostasis. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 2, p. 97-116, fev. 2020.
- TAQI, Syed Ahmed et al. A review of artifacts in histopathology. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 22, n. 2, p. 279, ago. 2018.
- TIMANER, Michael *et al.* The multifaceted role of mesenchymal stem cells in cancer. **Seminars In Cancer Biology**, [S.L.], v. 60, p. 225-237, fev. 2020.
- TIRINO, Virginia et al. Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. **Somatic Stem Cells: Methods and Protocols**, p. 443-463, jan. 2012.
- UCCELLI, Antonio; MORETTA, Lorenzo; PISTOIA, Vito. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 9, p. 726-736, set. 2008.
- UDALAMATHTHA, Vindya Lankika; JAYASINGHE, Chanika Dilumi; UDAGAMA, Preethi Vidya. Potential role of herbal remedies in stem cell therapy: proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, p. 1-8, aug. 2016.
- VOGEL, Christine; MARCOTTE, Edward M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature reviews genetics**, v. 13, n. 4, p. 227-232, mar. 2012.
- WANG, Hezhen et al. Anticancer potential of indirubins in medicinal chemistry: Biological activity, structural modification, and structure-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 223, p. 113652, nov. 2021.
- WANG, Ruoxi et al. Epigenetic regulation in mesenchymal stem cell aging and differentiation and osteoporosis. **Stem Cells International**, v. 2020, set. 2020.
- YANG, Lin et al. Pharmacological properties of indirubin and its derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 151, p. 113112, jul. 2022.
- YANG, Zijiang et al. Tetrandrine identified in a small molecule screen to activate mesenchymal stem cells for enhanced immunomodulation. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 30263, jul. 2016.