

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

NATÁLIA GOES BLANCO

VESÍCULAS EXTRACELULARES PROVENIENTES DE DIFERENTES FONTES DE  
CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS APRESENTAM EFEITOS DISTINTOS  
NO PULMÃO, RIM E FÍGADO EM MODELO DE SEPSE EXPERIMENTAL

Rio de Janeiro

2023



VESÍCULAS EXTRACELULARES PROVENIENTES DE  
DIFERENTES FONTES DE CÉLULAS MESENQUIMAIS  
ESTROMAIS APRESENTAM EFEITOS DISTINTOS NO PULMÃO,  
RIM E FÍGADO EM MODELO DE SEPSE EXPERIMENTAL

Natália Goes Blanco

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Medicina (Área de concentração em Clínica Médica, setor Pneumologia).

Orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Ferreira Cruz  
Prof. Dr. Pedro Leme e Silva  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Rieken Macedo Rocco

Rio de Janeiro  
Julho/2023

## CIP - Catalogação na Publicação

B641v Blanco, Natália Goes  
Vesículas extracelulares provenientes de diferentes fontes de células mesenquimais estromais apresentam efeitos distintos no pulmão, rim e fígado em modelo de sepse experimental / Natália Goes Blanco. -- Rio de Janeiro, 2023.  
98 f.

Orientadora: Fernanda Ferreira Cruz.  
Coorientador: Pedro Leme e Silva.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Clínica Médica, 2023.

1. Sepse experimental. 2. Células mesenquimais estromais. 3. Vesículas extracelulares. 4. proteômica. 5. Imunomodulação. I. Cruz, Fernanda Ferreira, orient. II. Leme e Silva, Pedro, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
FACULDADE DE MEDICINA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE NATÁLIA GOES BLANCO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UFRJ. ....

Aos vinte e seis dias, do mês de julho de 2023, às dez horas, no 8º andar, no Auditório Harley Pacheco, do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – Cidade Universitária – Fundão – UFRJ, realizou-se a defesa de tese de Natália Goes Blanco intitulada: **VESÍCULAS EXTRACELULARES PROVENIENTES DE DIFERENTES FONTES DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS APRESENTAM EFEITOS DISTINTOS NO PULMÃO, RIM E FÍGADO EM MODELO DE SEPSE EXPERIMENTAL**. O trabalho foi orientado pelos Professores Fernanda Ferreira Cruz; Pedro Leme e Silva e Patrícia Rieken Macedo Rocco. A Banca Examinadora foi presidida pela Professora Fernanda Ferreira Cruz e composta pelos Professores Nazareth de Novaes Rocha, Fernanda Carvalho de Queiroz Mello, Tatiana Maron Gutierrez e Rodrigo Bernardo Serafim. Iniciados os trabalhos a aluna apresentou, em trinta minutos, os objetivos, a metodologia, os resultados e as conclusões do seu trabalho de tese. Em seus comentários, os examinadores procederam à arguição, indicando pontos passíveis de aperfeiçoamento na tese. A aluna replicou, agradecendo as sugestões e esclarecendo a sua opinião sobre os itens discutidos pelos examinadores. Após a aprovação, a aluna terá prazo máximo de sessenta dias para entregar à Secretaria os exemplares da versão final, ficando determinado pela Banca que o(a) Prof(a). Nazareth N. Rocha será o(a) responsável para atestar se as modificações realizadas estão de acordo com o exigido pela Banca. Em seguida a Banca Examinadora decidiu pela **APROVAÇÃO** da candidata. Cumpridas as exigências o(a) candidato(a) fará jus ao **Título de Doutor em Medicina, Área de Concentração: Clínica Médica**. E nada mais havendo a tratar foi encerrada a sessão e lavrada a presente ata que será assinada pelo(a) presidente(a) e pelos membros da banca examinadora. ....

Rio de Janeiro, 26 de julho de 2023.

Fernanda Ferreira Cruz

Professora Fernanda Ferreira Cruz  
Presidente da Banca Examinadora

Nazareth N. Rocha

Professora Nazareth de Novaes Rocha  
Membro da Banca

Fernanda Carvalho de Queiroz Mello

Professora Fernanda Carvalho de Queiroz Mello  
Membro da Banca

Tatiana Maron Gutierrez

Professora Tatiana Maron Gutierrez  
Membro da Banca

Rodrigo Bernardo Serafim

Professor Rodrigo Bernardo Serafim  
Membro da Banca

Do amor deles, brotei, cresci e floresci.

Dedico essa tese de doutorado às minhas três raízes.

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço à minha mãe, Ana Valéria Chagas Goes, de quem herdei a dedicação e a garra para batalhar pelo que acredito, colo nos dias em que os experimentos não saíram como planejado, aconchego nos dias de maior cansaço, força para erguer a cabeça e fé para nunca desistir. Obrigada pelo cuidado e amor incondicionais. Obrigada por me proteger como uma leoa protege sua cria. Você é a mãe que qualquer um sonha em ter.

Agradeço ao meu pai, Luiz Fernando Blanco Vasquez, de quem herdei a constância e a forma lúdica de enxergar as responsabilidades. Você me ensinou fração com barras de chocolate e física mecânica calculando a distância e o tempo das nossas cavalgadas. Para você, o amor está nas ações: em cada dever de casa feito durante minha infância, em cada aula de equitação, em cada ligação imediatamente após a saída da escola para saber do meu dia, em cada viagem Itaipu-Centro às 5am, em cada café da manhã, em cada planilha do Excell e em cada "Força, Nati". Há coisas que não precisam ser ditas. Obrigada por provar que o amor é a maior delas.

Agradeço à minha irmã, Luísa Goes Blanco - minha Lulu -, por trazer afeto, dengo, alegria e gargalhadas para dentro da nossa casa. Você foi o melhor presente que nossos pais já me deram. Seguiremos sempre juntas lutando pelos nossos sonhos.

Agradeço ao Matheus Melo, meu amor, que me conheceu em uma fase final da trajetória do MD-PhD, mas que desde o primeiro momento vibra com cada bom resultado, acolhe em cada momento difícil, torce pelo meu sucesso e, acima de tudo, enxerga em mim a mulher, a médica e a cientista que sempre batalhei para ser. Obrigada por regar minhas flores e por ser combustível para o meu crescimento.

Agradeço à Professora Patrícia Rocco por ter lecionado de forma brilhante fisiologia respiratória quando eu ainda estava no segundo período da graduação – fato que gerou profunda admiração pela pneumologia, minha futura especialidade médica -, por ter me selecionado para ser aluna de iniciação científica no Laboratório de Investigação Pulmonar, por abrir tantas portas na minha carreira profissional, pela personificação de força e garra e, acima de tudo, por acreditar no meu potencial.

A todos os membros do Laboratório de Investigação Pulmonar, agradeço

imensamente por evidenciarem na prática algo que já imaginava: o trabalho em equipe é a melhor forma de conquistar o sucesso. Trabalhamos durante os dias e noites, aos finais de semana e feriados, mas estivemos sempre juntos. Juntos em cada cultura de células, em cada experimento, em cada perrengue e em cada vitória. Obrigada por serem a força motriz que me fez seguir nos piores dias; obrigada pela leveza e gentileza no cotidiano. Obrigada por me fazerem acreditar com todo o coração no enorme potencial da ciência brasileira. Trabalhar com vocês me tornou uma pesquisadora e uma pessoa melhores.

Agradeço à Fernanda Cruz, orientadora, amiga e exemplo a ser seguido, pela motivação constante, pelo cuidado e pelo empoderamento. Alcançar qualquer objetivo é mais fácil sabendo que você caminha ao lado. *“Todas nós seguimos em frente quando percebemos como são fortes e admiráveis as mulheres à nossa volta” (Rupi Kaur)*. Espero que você nunca se esqueça da magnitude que sua presença tem na vida dos que cruzam seu caminho.

Agradeço ao Pedro Leme, orientador e referência, pela paciência inesgotável, pela voz serena, pela disponibilidade e pela calma ao transmitir todo tipo de conhecimento. Obrigada por ser segurança e norte durante a trajetória. Por você, nutro profunda gratidão.

Agradeço à Mariana Antunes, confidente e dupla, pela parceria, pelas risadas e por cada célula em cultura. Sem você teria sido muito mais difícil e bem menos divertido.

Agradeço ao Johnatas Dutra, dono de uma energia única, pelas técnicas ensinadas, pela leveza nos experimentos, pelos duetos nas canções e especialmente pela alegria que irradia.

Natália Machado, Lígia Castro, Professora Christina Takiya, Professora Monique Trugilho, Luana Silva, Professora Adriana Paes Leme, Romênia Domingues, Bianca Pauletti, Beatriz Toja e Professora Cláudia dos Santos, obrigada por dedicarem seu tempo e seus esforços para que conseguíssemos desenvolver esse trabalho de forma séria, responsável e cuidadosa.

Rodrigo Serafim, faltam palavras para demonstrar minha gratidão. Obrigada por me acolher como acadêmica de medicina, por acreditar em mim como médica recém-formada e pela disponibilidade para estar na minha banca de doutorado, participando de todas as fases da minha vida profissional. É um privilégio ter você como referência.

Professora Tatiana Maron-Gutierrez, é uma honra contar com sua profunda experiência com as células mesenquimais estromais na minha banca de doutorado. Obrigada por disponibilizar o seu tempo e seu enorme conhecimento.

Agradeço à Professora Nazareth Rocha pela participação na banca, podendo contribuir de forma elementar com sua experiência médica e também com pesquisa na área básica.

Professora Fernanda Mello, obrigada pelo acolhimento no Instituto de Doenças do Tórax, pela gentileza ao aceitar o convite para a banca e pela motivação para que eu persiga meus sonhos.

Manifesto meus agradecimentos ainda ao André Benedito da Silva pela proatividade única e pelo sorriso sempre sincero, à Verônica Cristina dos Santos Lima pelo cuidado com os animais, à Arlete Fernandes pela gentileza diária e ajuda no processo histológico, à Camila Bayer pela ajuda na digitalização das lâminas e Prof. Antônio Carlos C. de Carvalho por nos permitir o uso do Nanosight.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-FAPERJ), pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Regenerativa (INCT – Regenera) e pelo Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT)

“A gente se emociona com pouco porque dentro da gente tudo é muito.”

Fabício Garcia

## RESUMO

---

BLANCO, Natália Goes. Vesículas extracelulares provenientes de diferentes fontes de células mesenquimais estromais apresentam efeitos distintos no pulmão, rim e fígado em modelo de sepse experimental. Rio de Janeiro, 2023. Tese (Doutorado em Medicina), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Em estudos pré-clínicos, os efeitos benéficos da administração de células estromais mesenquimais (MSCs) podem variar de acordo com a fonte celular utilizada. Nossa hipótese é que as vesículas extracelulares (EVs) derivadas de MSCs provenientes da medula óssea (BM), do tecido adiposo (AD) ou do pulmão (L) também promovem efeitos distintos no pulmão e em órgãos distais em um modelo de sepse experimental. Foram caracterizados número total, diâmetro e conteúdo proteômico das diferentes EVs como uma estratégia inicial para entender seus possíveis mecanismos de ação na sepse. Noventa e dois camundongos machos C57BL/6 foram utilizados (CEUA025-17). A sepse polimicrobiana foi induzida por ligadura e perfuração cecal (SEPSE) e os animais controle (SHAM) foram submetidos apenas à laparotomia. Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais do grupo SEPSE foram distribuídos de forma randômica para receber, por via endovenosa, soro fisiológico ou EVs derivadas de  $3 \times 10^6$  MSCs provenientes de BM, AD ou L. O tamanho e o número de EVs das diferentes fontes não variaram de forma significativa, mas o conteúdo proteômico sim. BM-EVs apresentaram maior concentração de proteínas anti-inflamatórias em comparação às AD-EVs e L-EVs. O escore de dano alveolar difuso diminuiu com o tratamento com EVs derivadas das três fontes. Nos rins, BM-, AD- e L-EVs reduziram o edema intersticial renal e a expressão de interleucina-18. No entanto, a expressão da molécula de injúria renal-1 (KIM-1) diminuiu apenas após a terapia com BM- e L-EVs. No fígado, apenas as BM-EVs reduziram a congestão e a infiltração celular nos sinusóides. Em conclusão, na sepse experimental, BM-EVs foram associadas a menor dano pulmonar, hepático e renal em comparação às outras fontes de EVs, o que pode estar relacionado às diferenças detectadas em seu conteúdo proteômico.

**Palavras-chave:** sepse; vesículas extracelulares; células estromais mesenquimais; modelo animal; proteômica; imunomodulação

Rio de Janeiro  
Julho/2023

## ABSTRACT

---

BLANCO, Natália Goes. Vesículas extracelulares provenientes de diferentes fontes de células mesenquimais estromais apresentam efeitos distintos no pulmão, rim e fígado em modelo de sepse experimental. Rio de Janeiro, 2023. Tese (Doutorado em Medicina), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

In preclinical studies, the beneficial effects of administration of mesenchymal stromal cells (MSCs) may vary according to the cell source. We hypothesized that MSC-derived extracellular vesicles (EVs) obtained from bone marrow (BM), adipose (AD), or lung (L) tissues may also lead to different effects on lung and distal organs in experimental sepsis. The total number, diameter and proteome from different EVs were evaluated as a first step toward understanding possible mechanisms of action of EVs in sepsis. Ninety-two male C57BL/6 mice were used (CEUA025-17). Polymicrobial sepsis was induced by cecal ligation and puncture (SEPSIS) and control animals (SHAM) underwent laparotomy only. Twenty-four hours after surgery, animals in the SEPSIS group were randomized to receive saline or  $3 \times 10^6$  MSC-derived EVs from BM, AD, or L. The size and number of EVs from different sources were not significantly different, but the proteomic content of the EVs differed. BM-EVs were enriched for anti-inflammatory proteins compared with AD-EVs and L-EVs. In kidneys, BM-, AD-, and L-EVs reduced kidney interstitial edema and expression of interleukin-18. However, kidney injury molecule-1 expression decreased only after therapy with BM- and L-EVs. In the liver, only BM-EVs reduced congestion and cell infiltration in sinusoids. In conclusion, in the current model of sepsis, BM-EVs were associated with less lung, liver, and kidney damage compared with the other sources of EVs, which may be related to differences detected in their proteomic content.

**Key-words:** sepsis; extracellular vesicles; mesenchymal stromal cells; animal model; proteomics; immunomodulation.

Rio de Janeiro  
Julho/2023

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

<b>AD</b>	Tecido adiposo
<b>BM</b>	Medula óssea
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CD</b>	Grupamento de diferenciação, do inglês, <i>cluster of differentiation</i>
<b>CK- MB</b>	Creatinofosfoquinase
<b>CLP</b>	Ligadura e perfuração do ceco
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CT</b>	Do inglês, <i>Threshold cycle</i>
<b>DAD</b>	Dano alveolar difuso
<b>DECIT</b>	Departamento de Ciência e Tecnologia
<b>DU</b>	Débito urinário
<b>ELAM- 1</b>	Molécula de adesão leucócito-endotélio 1
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>EVs</b>	Vesículas extracelulares
<b>FAPERJ</b>	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
<b>FiO2</b>	Fração inspirada de gás oxigênio
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HRP</b>	Peroxidase de rábano
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INCT-Regenera</b>	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Regenerativa
<b>iNOS</b>	Enzima óxido nítrico sintetase
<b>ip</b>	Intraperitoneal
<b>iv</b>	Intravenoso
<b>L</b>	Pulmão
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>miRNA</b>	MicroRNA
<b>MSCs</b>	Células mesenquimais estromais

<b>NET</b>	Armadilhas extracelulares, do inglês <i>neutrophil extracellular traps</i>
<b>NK</b>	Células exterminadoras naturais, do inglês Natural Killer
<b>NLR</b>	Do inglês, <i>Nod Like Receptors</i>
<b>O2</b>	Oxigênio
<b>PAI-1</b>	Inibidor do ativador de plasminogênio- 1
<b>PAM</b>	Pressão Arterial Média
<b>PAS</b>	Ácido periódico de Schiff
<b>PDE-4</b>	Fosfodiesterase-4
<b>PRONEX-FAPERJ</b>	Programa de Apoio a Núcleos de Excelência
<b>SOFA</b>	Do inglês, <i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
<b>TGF</b>	Fator de transformação do crescimento, do inglês, <i>transforming growth factor</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TLR</b>	Receptor do tipo Toll
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adesão celular-vascular 1
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E DE QUADROS

---

<b>Figura 1</b> -	Fisiopatologia da sepse.....	20
<b>Figura 2</b> -	Resposta do hospedeiro à sepse.....	21
<b>Figura 3</b> -	Caracterização das células mesenquimais estromais (MSCs).....	28
<b>Figura 4</b> -	Efeitos terapêuticos das células mesenquimais estromais .....	29
<b>Figura 5</b> -	Representação esquemática da biogênese das vesículas extracelulares.....	33
<b>Figura 6</b> -	Representação ilustrando a função das vesículas extracelulares liberadas por células mesenquimais estromais.....	37
<b>Figura 7</b> -	Representação das diferenças nos tamanhos entre MSCs e EVs, bem como a comunicação intercelular realizada pelas EVs.....	39
<b>Figura 8</b> -	Desenho experimental .....	51
<b>Figura 9</b> -	Caracterização das Evs .....	58
<b>Figura 10</b> -	Concentração e tamanho das vesículas extracelulares obtidas pela técnica de nanosight.....	59
<b>Figura 11</b> -	Diagrama de Venn .....	60
<b>Figura 12</b> -	Mapa de calor .....	61
<b>Figura 13</b> -	Gráficos representam comparações pareadas da concentração de proteínas presentes nas vesículas extracelulares provenientes de diferentes fontes (BM/AD, BM/L e AD/L) .....	63
<b>Figura 14</b> -	Taxa de sobrevivência em 48 horas .....	69
<b>Figura 15</b> -	Dano alveolar difuso (DAD).....	70
<b>Figura 16</b> -	Citocinas no parênquima pulmonar.....	71
<b>Figura 17</b> -	Edema intersticial e destruição da borda em escova .....	73
<b>Figura 18</b> -	Citocinas no parênquima renal.....	74
<b>Figura 19</b> -	Vacuolização (esteatose e degeneração hidrópica).....	75
<b>Figura 20</b> -	Avaliação quantitativa da infiltração de células inflamatórias nos sinusóides hepáticos .....	76
<b>Figura 21</b> -	Citocinas no parênquima hepático .....	77
<b>Figura 22</b> -	Sumário gráfico .....	79

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1 -</b>	Escore de Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos [do inglês, Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)] – Critérios para avaliação do grau de disfunção orgânica.....	18
<b>Tabela 2 -</b>	Primers (PCR).....	55
<b>Tabela 3 -</b>	Lista de proteínas identificadas nas vesículas extracelulares com intensidade significativa ( $p < 0,05$ ) .....	64
<b>Tabela 4 -</b>	Vias metabólicas (WikiPathways): Análise comparativa das vias metabólicas relacionadas ao conteúdo proteômico das vesículas extracelulares ( $p < 0,05$ ).....	66

## SUMÁRIO

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Sepse</b> .....	<b>17</b>
1.1.1	DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA .....	17
1.1.2	FISIOPATOLOGIA DA SEPSE.....	19
1.1.2.1	Inflamação x Imunossupressão na sepse: o que é mais prejudicial para o organismo? .....	22
1.1.2.2	Ação das células do sistema imune .....	22
1.1.2.3	Ação das citocinas .....	23
1.1.2.4	Apoptose .....	24
1.1.2.5	Alterações vasculares .....	25
<b>1.2</b>	<b>Terapias utilizadas na sepse</b> .....	<b>26</b>
<b>1.3</b>	<b>Terapia celular</b> .....	<b>27</b>
1.3.1	VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	32
1.3.2	CONTEÚDO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	35
<b>1.4</b>	<b>Terapia celular na sepse</b> .....	<b>35</b>
1.4.1	LIMITAÇÃO DO USO DE MSC NO TRATAMENTO DA SEPSE E APLICABILIDADE DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	37
<b>1.5</b>	<b>Vesículas extracelulares derivadas de MSCs na sepse</b> .....	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
4.1	Objetivos gerais .....	44
4.2	Objetivos específicos .....	44
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
5.1	Aprovação do Estudo .....	45
5.2	Cultura de células mesenquimais estromais e extração de vesículas extracelulares .....	45
5.3	Proteômica .....	47
5.3.1	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	47
5.3.2	ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	47
5.3.3	ANÁLISE DE DADOS DE PROTEÔMICA.....	48
5.3.4	INTERPRETAÇÃO DE DADOS DE PROTEÔMICA.....	49
5.3.5	DISPONIBILIDADE DE DADOS.....	49
5.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	49
5.5	Preparo dos animais e protocolo experimental .....	50
5.6	Taxa de Sobrevivência .....	51

5.7	Histologia.....	52
5.8	Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA).....	53
5.9	Análise de PCR m tempo real (RT-PCR).....	54
5.10	Análise Estatística.....	55
6	<b>RESULTADOS</b> .....	57
6.1	Caracterização de EVs.....	57
6.2	Proteômica.....	60
6.2.1	TEOR DE PROTEÍNAS.....	60
6.2.2	REGULAÇÃO POSITIVA E NEGATIVA DE VIAS METABÓLICAS.....	65
6.3	Taxa de Sobrevivência.....	68
6.4	Histologia pulmonar e biologia molecular.....	69
6.5	Histologia renal e biologia molecular.....	72
6.6	Histologia hepática e biologia molecular.....	74
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	78
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	87
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	88
	<b>ANEXO A - CEUA</b> .....	97
	<b>ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	98

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Sepses

### 1.1.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A *Sepsis Definitions Task Force* de 2021 reforça o entendimento da sepsis como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção e estabelece os critérios clínicos para sua classificação, sendo eles: a suspeita ou certeza de infecção somada a um aumento agudo de 2 ou mais pontos no SOFA (Sequential Organ Failure Assessment Score), o que representa disfunção orgânica associada à infecção subjacente (EVANS *et al.*, 2021). Além disso, evidencia o conceito de choque séptico, que é compreendido como sepsis acompanhada por profundas anormalidades hemodinâmicas, celulares e metabólicas capazes aumentar a mortalidade e é classificado como sepsis somada à necessidade de vasopressor para elevar a pressão arterial média acima de 65 mmHg e lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) após expansão volêmica adequada (EVANS *et al.*, 2021).

Os parâmetros considerados pelo SOFA incluem a capacidade respiratória [relação entre a pressão arterial de oxigênio ( $O_2$ ) no sangue e a fração de oxigênio no ar inspirado ( $FiO_2$ )], as funções hepática (estimada pelo valor de bilirrubina total no plasma) e renal [verificada pelo débito urinário (DU) ou pelo valor da creatinina no plasma], a capacidade de coagulação (avaliada indiretamente através do número de plaquetas), a hemodinâmica [cuja instabilidade é inferida a partir de valores reduzidos da pressão arterial média (PAM) ou dos níveis de vasopressores utilizados] e o nível de consciência (definido pela escala Glasgow de coma). Uma maior pontuação no SOFA está associada a um elevado risco de mortalidade (EVANS *et al.*, 2021).

**Tabela 1** - Escore de Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos [do inglês, Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)] – Critérios para avaliação do grau de disfunção orgânica

SOFA	ESCORE	0	1	2	3	4
	PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub>	≥400	<400	<300	<200 com suporte ventilatório	<100 com suporte ventilatório
	Plaquetas (10 <sup>3</sup> )	≥150	<150	<100	<50	<20
	Bilirrubina	<1,2	1,2-1,9	2-5,9	6-11,9	≥12
	Cardiovascular	PAM ≥70	PAM <70	Dopamina <5 ou dobutamina (qualquer dose)	Dopamina (5,1-15) ou adrenalina ≤0,1 ou nora-drenalina ≤0,1	Dopamina >15 ou adrenalina >0,1 ou nora-drenalina >0,1
	Glasgow	15	14-13	12-10	9-6	<6
	Creatinina ou Débito urinário (mL/dia)	<1,2	1,2-1,9	2-3,4	3,5-4,9 ou DU <500	>5 ou DU <200

Fonte: <https://www.passeidireto.com/arquivo/116454252/sofa-sepse>

A sepse é a maior causa de internação e morte em unidades de terapia intensiva (UTI) não cardiológicas em todo mundo, apesar dos avanços nas estratégias de suporte ventilatório, hemodinâmico, e do tratamento precoce com antibióticos de amplo espectro (EVANS *et al.*, 2021; FLEISCHMANN *et al.*, 2016; IBRAHIM *et al.*, 2020; MURAO *et al.*, 2020). Calcula-se que cerca de um terço dos leitos de UTI seja ocupado por pacientes sépticos, com uma taxa de mortalidade mundial em torno de 55% (MACHADO *et al.*, 2017), resultando em um número estimado de 6 milhões de mortes ao ano e custos em torno de 24 bilhões/ano somente nos Estados Unidos (IBRAHIM *et al.*, 2020).

No Brasil, estima-se uma prevalência de sepse em torno de 50 casos a cada 100 mil habitantes (ALMEIDA *et al.*, 2022), com uma ocupação de um terço dos leitos de terapia intensiva disponíveis no país (MACHADO *et al.*, 2017). A taxa de mortalidade em 30 dias da sepse e do choque séptico é de aproximadamente 30% e 80%, respectivamente (SILVA *et al.*, 2004; SILVA, E. P. D. *et al.*, 2019). Cabe destacar que o custo estimado para o tratamento de cada paciente séptico no Brasil em 2008 era de 10 mil dólares (SOGAYAR *et al.*, 2008), o que gera um impacto significativo na economia nacional.

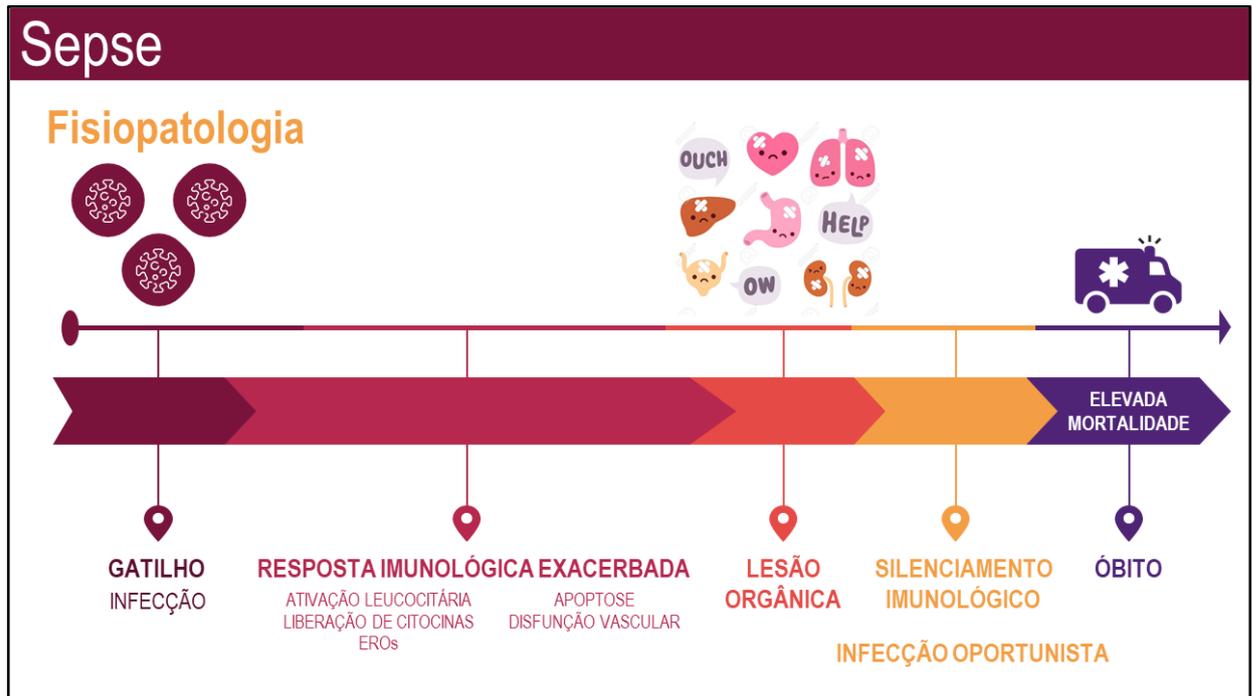
As infecções que levam à sepse podem ser de origem comunitária ou hospitalar. Os principais órgãos e regiões responsáveis pelo início do processo

inflamatório são os pulmões (64%), o abdômen (20%), a corrente sanguínea (15%) e as vias urinárias (15%) (FONT; THYAGARAJAN; KHANNA, 2020). Os principais agentes envolvidos são as bactérias gram-positivas (com destaque para o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus pneumoniae*), seguidas pelas bactérias gram-negativas (com destaque para a *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia Coli*) (FONT; THYAGARAJAN; KHANNA, 2020). Além disso, em uma proporção significativamente menor, fungos, micobactérias e vírus também podem causar essa síndrome (MARTIN *et al.*, 2003). Nos últimos anos, houve um aumento importante do número de casos de sepse de etiologia viral, após o início da pandemia pelo novo Coronavírus (ALHAZZANI *et al.*, 2020).

### 1.1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

O mecanismo através do qual uma fonte infecciosa gera disfunção em múltiplos órgãos permanece sem completa elucidação, mas parece ter influência multifatorial, com destaque para um efeito prejudicial proveniente do desequilíbrio entre fatores pró e anti-inflamatórios regulados pelo sistema imune (WIERSINGA *et al.*, 2014). Inicialmente, na fase precoce da sepse, ocorre resposta inflamatória exacerbada em resposta à infecção, com elevada ativação de leucócitos, liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROS), que promovem apoptose e disfunção vascular, culminando em lesão orgânica. Posteriormente, na fase tardia, ocorre silenciamento imunológico secundário à disfunção e morte das células de defesa do organismo, favorecendo a ocorrência de infecções oportunistas e aumentando o risco de óbito (SINGER *et al.*, 2016) (Figura1).

**Figura 1 -** Fisiopatologia da sepse



**Fonte:** o próprio autor.

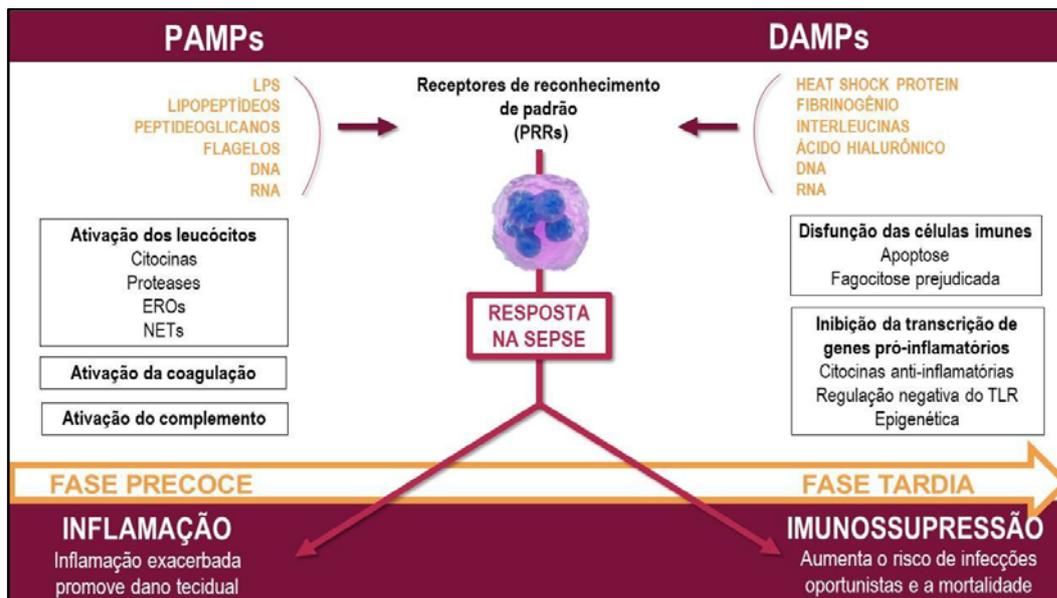
**Legenda:** EROs: espécies reativas de oxigênio;

**Nota:** Breve descrição da linha do tempo vista na resposta imunológica na síndrome, que se inicia com um gatilho infeccioso e evolui com resposta imunológica exacerbada e lesão orgânica, culminando com silenciamento imunológico, infecção oportunista e óbito.

A sepse desenvolve-se a partir de uma infecção primária: numa fase precoce, células do sistema imune capazes de reconhecer fragmentos do patógeno invasor (PAMPs- do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*) e sinalizadores de dano celular (DAMPs – do inglês, *damage associated patterns* – também conhecidos como alarminas), através de receptores específicos de reconhecimento de padrões conhecidos denominados PRRs (do inglês, *pattern recognition receptors*) – como exemplo, podemos citar os receptores do tipo Toll e do tipo Nod (do inglês, *toll-like e nod-like receptors*) -, liberam mediadores inflamatórios [como fator de necrose tumoral (TNF) $\alpha$ , Interleucina (IL)-1 $\beta$  e proteases] capazes de ativar leucócitos e células endoteliais, aumentando a permeabilidade do endotélio, além de induzir a migração de linfócitos T, monócitos e neutrófilos em direção aos órgãos afetados (WIERSINGA *et al.*, 2014). Objetivando combater os microrganismos invasores, os neutrófilos ativados liberam espécies reativa de oxigênio (EROS) e armadilhas extracelulares conhecidas como NETs (do inglês, *neutrophil extracellular traps*) (WIERSINGA *et al.*, 2014). Além disso, evidencia-se a ativação da cascata do complemento e das vias de coagulação como resposta à inflamação exacerbada,

fatores que, em conjunto com a “tempestade de citocinas” e com a ação dos linfócitos T-CD8+ citotóxicos (CD - do inglês, *cluster of differentiation*), provocam dano estrutural e comprometimento funcional das células endoteliais, culminando em alterações vasculares e danos a diversos órgãos, além da liberação de novas DAMPs, perpetuando o processo inflamatório (DENNING *et al.*, 2019; RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008; WANG; MA, 2008) (Figura 2). Posteriormente, a sepse evolui para uma fase de silenciamento imunológico cujos mecanismos fisiopatológicos exigem esclarecimento complementar, mas parecem ser secundários à apoptose e disfunção de células imunes e inibição da produção de genes pró-inflamatórios (WIERSINGA *et al.*, 2014) (Figura 2). De forma notável, a extensão, o comportamento e a duração da resposta imunológica dependem de fatores como genética, idade, comorbidades e alguns fatores intrínsecos ao patógeno, como carga microbiana e virulência (WIERSINGA *et al.*, 2014).

**Figura 2 -** Resposta do hospedeiro à sepse



**Fonte:** Adaptado de Wiersinga *et al.*, 2014.

**Legenda:** EROs: espécies reativas de oxigênio; NETs: armadilhas extracelulares, do inglês, *neutrophil extracellular traps*.

**Nota:** Caracterizada por uma fase pró-inflamatória inicial, seguida de imunossupressão. A resposta inflamatória inicia-se pela interação entre fragmentos do patógeno invasor (PAMPs - do inglês, pathogen-associated molecular patterns) e sinalizadores de dano celular (DAMPs - do inglês, damage-associated patterns), com receptores específicos de reconhecimento de padrões conhecidos como PRRs, expressos na superfície das células do sistema imune. A resposta inflamatória é potencializada pela ativação de leucócitos, do sistema complemento e da cascata de coagulação. A inflamação exagerada promove lesão tecidual. A fase posterior - tardia - é caracterizada por imunossupressão secundária à disfunção celular e inibição das vias pró-inflamatórias.

### 1.1.2.1 Inflamação x Imunossupressão na sepse: o que é mais prejudicial para o organismo?

Os danos teciduais iniciais observados na sepse parecem estar relacionados à exacerbada ativação das vias pró-inflamatórias, o que leva à excessiva migração de células e produção de mediadores inflamatórios. Apesar disso, ensaios clínicos que testaram terapias anti-inflamatórias para abordagem dessa fase inicial não observaram redução significativa da mortalidade (MURAO *et al.*, 2020; REMICK, 2003; WIERSINGA *et al.*, 2014). A partir desse dado, novos questionamentos surgiram em relação ao real responsável pela elevada taxa de mortalidade nessa síndrome.

Foi evidenciado que, apesar de alguns pacientes evoluírem para óbito na fase inicial da sepse, quando ocorre o ápice da inflamação, a maior taxa de mortalidade ocorre tardiamente, numa fase caracterizada pela imunossupressão (WIERSINGA *et al.*, 2014). Tal fato parece estar associado a um desequilíbrio entre as vias pró e anti-inflamatórias, quando ocorre uma redução da atividade dos neutrófilos, silenciando importantes mecanismos de defesa (WIERSINGA *et al.*, 2014). Além disso, a apoptose de linfócitos e células dendríticas contribui para o cenário imune observado (HOTCHKISS *et al.*, 1999). A maior mortalidade na fase tardia está relacionada principalmente ao aumento da incidência de infecções nosocomiais oportunistas (KOLLEF *et al.*, 2008).

### 1.1.2.2 Ação das células do sistema imune

No curso da sepse, os linfócitos - com destaque para os linfócitos T *helper* (CD4+) - têm o papel de harmonizar a resposta imunológica ao estímulo infeccioso. As células T *helper naive (imaturas)* são capazes de se diferenciar nos subtipos Th1, que produz mediadores pró-inflamatórios, como interferon (IFN)- $\gamma$  e IL-12, estimulando a proliferação, crescimento, maturação e ativação de células de defesa, e Th2, que produz mediadores com caráter anti-inflamatório, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (GOTTS; MATTHAY, 2016; RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008). Vale ressaltar também um outro subtipo, o Th17, que produz a IL-17 (pró-inflamatória), importante no combate de microrganismos (HARRINGTON *et al.*, 2005). A inflamação sistêmica potencializa, a partir do aumento do número de citocinas circulantes, a expressão de

moléculas que provocam a adesão de linfócitos T, monócitos e neutrófilos, como a molécula de adesão leucócito-endotélio (ELAM)-1 e molécula de adesão celular-vascular (VCAM)-1, o que favorece a diapedese (HENNINGER *et al.*, 1997; PANES *et al.*, 1995).

Na fase inicial, as células do sistema imune que residem ou migram para diversos órgãos são as principais responsáveis pelos danos teciduais. Isso ocorre porque, devido ao estímulo de citocinas e células inflamatórias, há aumento da produção por neutrófilos e macrófagos de espécies reativas de oxigênio (ROS), as principais responsáveis pela lesão celular (WANG; MA, 2008).

Em uma fase tardia, ocorre importante silenciamento imunológico devido à apoptose e redução da atividade das células de defesa, o que exacerba o risco de infecções e morte por patógenos oportunistas (GOTTS; MATTHAY, 2016).

#### 1.1.2.3 Ação das citocinas

Uma enorme gama de células é capaz de produzir citocinas, com destaque para os macrófagos e linfócitos T *helper*. Essas moléculas podem agir através de mecanismos autócrinos, parácrinos ou endócrinos, disparando cascatas intracelulares e agindo na modulação do sistema imune, visto que são capazes de estimular a proliferação, maturação, crescimento e ativação celular; podem também atuar como quimioatratadores, induzir a formação e liberação de anticorpos, aumentar a produção de proteínas de fase aguda, além de realizarem regulação positiva ou negativa nas suas próprias cascatas de sinalização, e de outras citocinas. Mediante a todas essas ações, uma “tempestade de citocinas” possui um enorme potencial para causar lesão celular, devido ao estado pró-inflamatório em que o organismo se encontra com a dispersão dessas moléculas pelo plasma (HATTORI *et al.*, 2017).

As principais citocinas que atuam na sepse podem ser classificadas como pró e anti-inflamatórias. Dentre as pró-inflamatórias, destacam-se o TNF $\alpha$  – potente indutor de apoptose; a IL-6 – que aumenta a produção de proteínas de fase aguda, a ativação de linfócitos T e a atração de neutrófilos para o foco inflamatório (AYALA *et al.*, 2002); a IL-1 $\beta$  – que ativa neutrófilos, aumenta a expressão de moléculas de adesão nos linfócitos e endotélio, além de estimular a produção de enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) pelas células endoteliais, o que contribui para o efeito vasodilatador classicamente observado na sepse (KOBAYASHI *et al.*, 1998); a IL-8 –

que recruta neutrófilos e induz a liberação de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (SINGER; SANSONETTI, 2004); e a IL-12 – que estimula a produção de IFN $\gamma$ , responsável pela atividade fagocítica e antimicrobiana de neutrófilos e macrófagos (MORENO *et al.*, 2006). Em relação às citocinas anti-inflamatórias, são produzidas a IL-10, o antagonista do receptor de IL-1 (IL1-RA), o receptor solúvel de TNF (sTNFR) (BONE; GRODZIN; BALK, 1997) e a IL-9, que parece ter efeito protetor na fisiopatologia da sepse (GROHMANN *et al.*, 2000).

Em 2000, Grohmann e colaboradores demonstraram que a administração de citocina IL-9 recombinante, classicamente descrita como importante no combate a parasitas e no processo alérgico, parece ter um papel protetor na sepse experimental por *Pseudomonas aeruginosa*, reduzindo a mortalidade, o que pareceu estar associado à redução da produção de TNF $\alpha$ , IL-12 e IFN $\gamma$  pelos camundongos sépticos (GROHMANN *et al.*, 2000).

É importante salientar que o padrão de citocinas encontrado no plasma está associado à gravidade e ao prognóstico da sepse. A IL-6, a IL-8, a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), quando elevados nas primeiras 24 horas, são indicativos de falha na função de órgãos. A IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, MCP-1 e G-CSF, quando elevados nas primeiras 48 horas, estão associados a uma maior taxa de mortalidade (BOZZA *et al.*, 2007).

#### 1.1.2.4 Apoptose

Na sepse, ocorre aumento da apoptose de linfócitos B, T e células dendríticas, o que parece estar associado à imunossupressão e ao óbito (DENNING *et al.*, 2019). Apesar da apoptose de linfócitos parecer benéfica, sob uma análise superficial - devido ao fato de atenuar a resposta inflamatória excessiva, e, dessa forma, o dano tecidual - a morte programada dessas células de defesa compromete a capacidade do organismo de combater os patógenos invasores, e, portanto, de frear a evolução a sepse (HATTORI *et al.*, 2017). Por outro lado, outras células do sistema imunológico como macrófagos e neutrófilos parecem apresentar redução na taxa de apoptose, aumentando sua sobrevivência, o que amplifica o dano tecidual causado pela sua atividade pró-inflamatória (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008).

Destaca-se o fato de que o pulmão é o principal órgão acometido na sepse e

parte desse efeito deve-se à apoptose de células epiteliais pulmonares resultante da inflamação sistêmica (CHOPRA; REUBEN; SHARMA, 2009). Ocorre ainda apoptose de células endoteliais vasculares, como observado em modelos de sepse induzida por CLP (ligadura e perfuração cecal) em roedores (MATSUDA *et al.*, 2007; ZHOU; SIMMS; WANG, 2004).

#### 1.1.2.5 Alterações vasculares

As células endoteliais vasculares são importantes não somente por sua função de barreira física, controlando a passagem de substâncias entre o espaço intravascular e o interstício, mas também por produzirem mediadores que modulam a angiogênese, o tônus vasomotor, a inflamação e a coagulação (CINES *et al.*, 1998; DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007; SENA; PEREIRA; SEICA, 2013).

No curso da sepse, devido à elevada quantidade de EROS, citocinas e linfócitos citotóxicos circulantes, ocorre alteração da função e estrutura das células endoteliais, o que permite maior diapedese de células do sistema imunológico, potencializando a inflamação, além de provocar alterações vasomotoras, que são características da síndrome (GOTTS; MATTHAY, 2016). Estudos anteriores mostram que ocorre, nesse cenário, aumento da expressão de histamina, bradicinina, e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bem como de seus receptores, o que aumenta a permeabilidade vascular (HATTORI *et al.*, 2016; MATSUDA *et al.*, 2004; MONTRUCCHIO; ALLOATTI; CAMUSSI, 2000). As células do sistema imune podem, dessa forma, infiltrar tecidos saudáveis, atraindo outros leucócitos a partir da produção de citocinas, o que perpetua a inflamação e a deterioração tecidual (HATTORI *et al.*, 2017).

Outra questão relevante na sepse é o fato das células endoteliais perderem suas características anticoagulantes e antiagregantes. Existem algumas hipóteses que objetivam justificar o perfil pró-coagulante do endotélio nessa condição, dentre elas a redução da quantidade de proteína C e da trombomodulina (anticoagulantes) circulantes, além do aumento da atividade da via do Fator tecidual (pró-coagulante). Essas alterações aumentam o risco de formação de trombos na microcirculação, o que prejudica o aporte sanguíneo aos tecidos (OPAL; VAN DER POLL, 2015). Além disso, no contexto da sepse, a lesão endotelial secundária à inflamação exacerbada promove exposição da fosfatidilserina na superfície celular, o que leva à ativação da

cascata de coagulação e inflamação.(BEATTIE et al., 2019).

As alterações vasculares - especialmente na microcirculação - podem comprometer a perfusão de órgãos, que sofrem hipóxia e lesão tecidual. Esse mecanismo parece ser uma importante causa de disfunção de órgãos na sepse (HATTORI *et al.*, 2017).

## 1.2 Terapias utilizadas na sepse

O tratamento da sepse baseia-se principalmente no combate ao microrganismo invasor a partir do uso de antibióticos, o que pode ser facilitado pela identificação do foco e do germe causador da infecção. Além disso, realiza-se o manejo das alterações hemodinâmicas, ventilatórias e metabólicas resultantes da inflamação sistêmica. Apesar disso, as estratégias para redução do dano tecidual são precárias, baseadas majoritariamente no uso precoce de aminas vasoativas, na ventilação mecânica protetora, nas manobras de pronação e recrutamento do paciente, além da utilização circulação extracorpórea em casos refratários (EVANS *et al.*, 2021). Muito se estuda sobre o papel dos corticoides no manejo desses pacientes, especialmente nos casos em que há choque séptico associado. Entretanto, estudos revelam que essa esta última modalidade terapêutica (recomendação fraca e qualidade de evidência moderada) não é capaz de reduzir a mortalidade a curto ou longo prazo associada à sepse (EVANS *et al.*, 2021). Tal fato pode ser explicado com base na definição de sepse: *disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção*. Dessa forma, compreende-se que não ocorre somente uma “tempestade pró-inflamatória” (na qual o efeito anti-inflamatório do corticoide seria benéfico), mas sim um profundo desequilíbrio entre as vias pró e anti-inflamatórias, o que pode ser confirmado pelos dados que ilustram maior mortalidade relacionada à sepse em sua fase mais tardia, marcada pela imunossupressão resultante de diversos fatores, dentre eles a redução significativa dos neutrófilos e a apoptose de células de defesa (HOTCHKISS *et al.*, 1999; KOLLEF *et al.*, 2008; SOLOMKIN *et al.*, 1981).

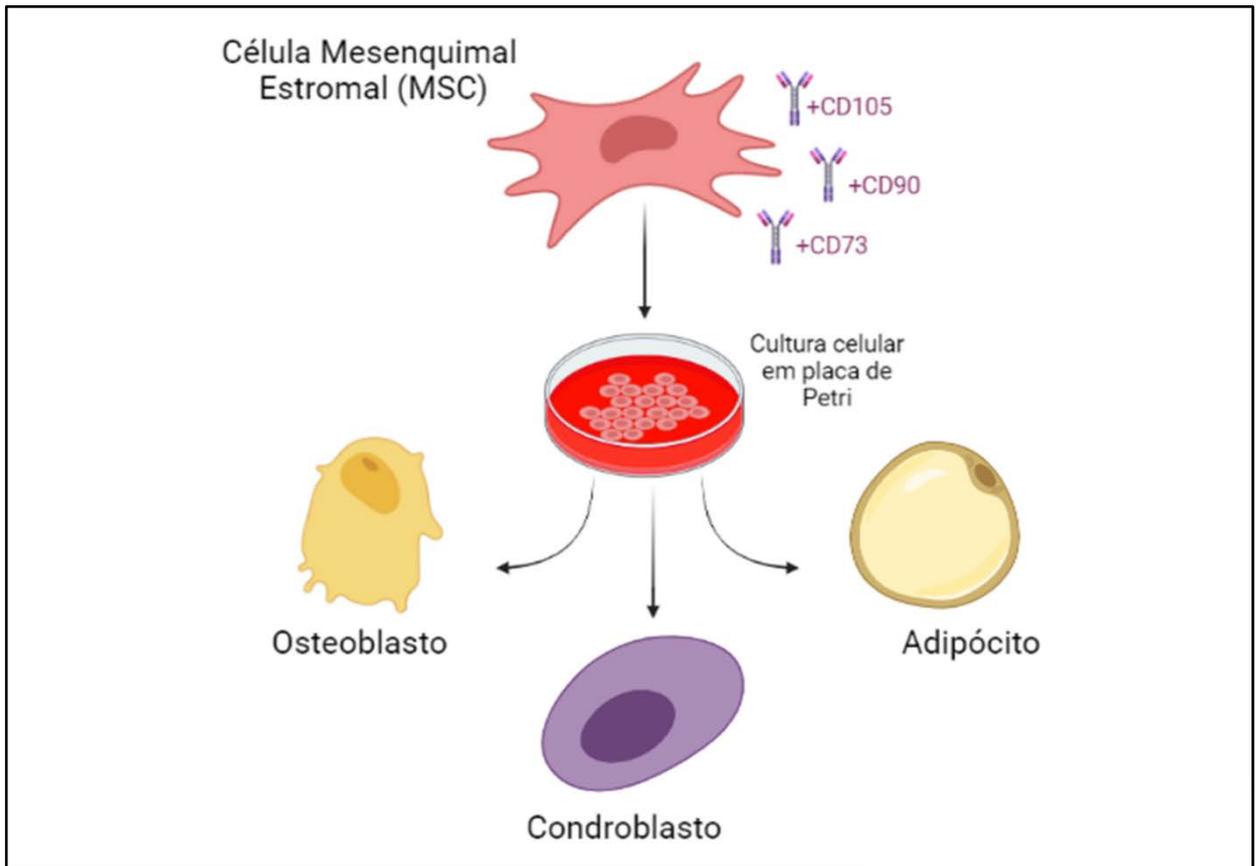
Nos últimos anos, diversos estudos foram desenvolvidos com enfoque na descoberta de novas estratégias capazes de reduzir a mortalidade na sepse, dentre elas o uso de vitamina C, tiamina, estatinas, inibidores de fosfodiesterase (PDE)-4, cloroquina, levosimendan, inibidores de caspases, dentre outras (EVANS *et al.*,

2021; HATTORI *et al.*, 2017). Apesar da intensa pesquisa, a sepse continua sendo uma síndrome complexa associada a uma elevada taxa de mortalidade e os ensaios pré-clínicos e clínicos têm falhado em encontrar uma terapia capaz de melhorar seu desfecho.

Torna-se evidente, portanto, que para ser eficaz, uma terapia deve ser capaz de modular o sistema imunológico, criando o equilíbrio necessário para combater microrganismos invasores, com o mínimo de dano tecidual possível. Nesse contexto, as células mesenquimais estromais ganham destaque.

### **1.3 Terapia celular**

As células mesenquimais estromais (MSCs) são caracterizadas por sua capacidade de multiplicação e diferenciação em tecidos especializados (osteoblastos, condroblastos e adipócitos), pela habilidade de aderir em superfícies plásticas e por apresentarem positividade para marcadores específicos (CD105, CD73 e CD90), além de não expressarem marcadores da linhagem hematopoiética como CD45, CD34 e CD14 em sua superfície (DOMINICI *et al.*, 2006; VISWANATHAN *et al.*, 2019)(Figura 3).

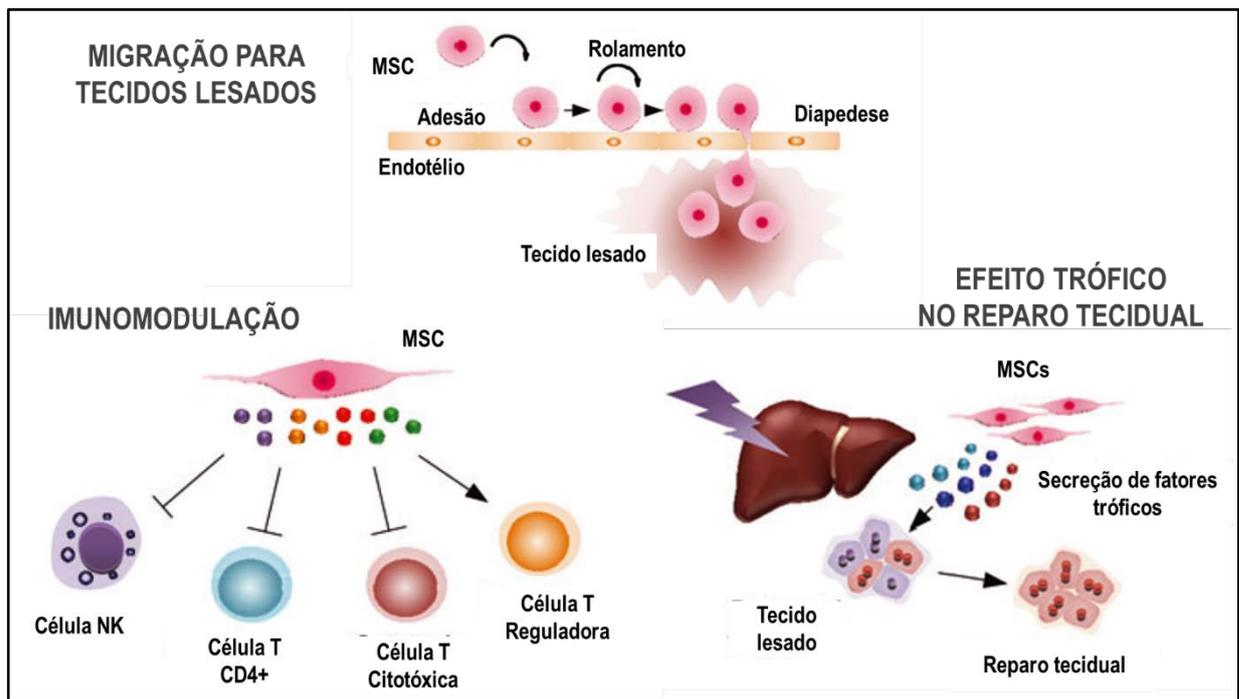
**Figura 3 -** Caracterização das células mesenquimais estromais (MSCs)

**Fonte:** o próprio autor.

**Nota:** Marcadores de superfície das MSCs. Grupamento de diferenciação – do inglês, cluster of differentiation (CD) – 105, -90 e -73 e seu potencial de diferenciação em osteoblasto, condroblasto e adipócito.

O potencial terapêutico das MSCs está associado à sua capacidade de migração para áreas com tecido sob injúria, promovendo a secreção de fatores com propriedades imunomoduladoras, antimicrobianas, antiapoptóticas e tróficas, auxiliando na regeneração de tecidos (MATTHAY; PATI; LEE, 2017; SILVA *et al.*, 2018) (Figura 4).

**Figura 4 -** Efeitos terapêuticos das células mesenquimais estromais



**Fonte:** Adaptado de Katsuda et al., 2013.

**Legenda:** MSC: Células mesenquimais estromais; NK: células exterminadoras naturais, do inglês, *natural killer*; CD4 +: grupamento de diferenciação, do inglês, *cluster of differentiation*.

**Nota:** MSCs são capazes de migrar para tecidos lesados, apresentam efeitos imunomoduladores que envolvem a secreção de citocinas, inibição de células NK, células T CD4+ e células T citotóxicas, bem com estímulo às células T reguladoras. MSCs ainda liberam fatores tróficos, auxiliando no reparo tecidual e órgãos e tecidos sob injúria.

Essas células podem ser obtidas a partir de diversas fontes, como a medula óssea, pulmão, tecido adiposo, polpa dentária, cordão umbilical, placenta, sangue menstrual, entre outros (KESHTKAR; AZARPIRA; GHAREMANI, 2018). Cabe destaque que, a depender da sua origem, o conteúdo transcriptômico, lipidômico e proteômico das MSCs varia, e tal fato está associado a efeitos regenerativos e imunomodulatórios distintos (ABREU *et al.*, 2017; MENARD *et al.*, 2020; OSTANIN *et al.*, 2011). Ménard e sua equipe, em 2019, compararam MSCs derivadas de medula óssea e tecido adiposo provenientes de doadores humanos saudáveis, observando diferenças em seu transcriptoma e na atuação no sistema imunológico: BM-MSCs inibiram de forma significativa a proliferação de células exterminadoras naturais (NK, do inglês, *natural killer*), enquanto as AD-MSCs inibiram de forma mais intensa a proliferação de linfócitos T (MENARD *et al.*, 2020). O conteúdo das MSCs também parece receber influência do meio ao qual as células estão expostas (BRAGA *et al.*, 2022).

Nosso grupo comparou o efeito da terapia com células mesenquimais

derivadas de medula óssea, tecido adiposo e pulmão administradas por via intratraqueal em modelo experimental de asma induzida por ovalbumina, identificando efeitos benéficos, porém distintos a depender da fonte utilizada na mecânica e na inflamação pulmonar a depender da fonte utilizada (ABREU *et al.*, 2017).

Vale ressaltar que, para um melhor efeito terapêutico, as MSCs devem ser ativadas, principalmente por citocinas pró-inflamatórias presentes no microambiente ou por outros fatores estressantes (como privação de nutrientes), o que desencadeia a secreção de prostaglandinas, fatores de crescimento, citocinas anti-inflamatórias, além de vesículas extracelulares ricas em proteínas, RNAs mensageiros (RNAm) e microRNA (miRNA) (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008). Em adição, acredita-se que o sucesso no reparo tecidual obtido com essa terapia deve-se ao fato das MSCs serem capazes de compreender e produzir as necessidades imediatas do tecido lesado, a partir da avaliação dos fatores solúveis presentes ao redor das células em sofrimento (KEANE; JERKIC; LAFFEY, 2017). Isso justifica a sua aplicação nos mais diversos cenários, como na sepse, na lesão pulmonar, na doença renal, no infarto agudo do miocárdio dentre várias outras doenças (GUILLAMAT-PRATS *et al.*, 2017; LUGER *et al.*, 2017; SUNG *et al.*, 2013).

O uso das MSCs em modelos pré-clínicos e clínicos parece ser seguro, a depender da dose administrada. Devido às propriedades de imunomodulação e à baixa imunogenicidade dessas células, o seu transplante alogênico não costuma cursar com rejeição. Dentre os fatores marcadamente associados a este fato, destacam-se a ausência de expressão de moléculas MHC de classe II em sua superfície, evitando reações imunológicas e a inibição da atividade de células como linfócitos B e células NK, reduzindo a inflamação (ZHANG *et al.* 2015). Uma metanálise publicada em 2021 reforçou a segurança da terapia celular em 62 ensaios clínicos fase I/IIa publicados entre os anos de 2006 e 2020, destacando que os principais efeitos colaterais observados com essa terapia eram reações infusionais com febre e rash durante a administração intravenosa, que não promoviam descontinuidade do tratamento (WANG; YI; SONG, 2021).

Recentes estudos pré-clínicos e clínicos utilizando terapias com doses evolutivamente crescentes de MSCs por via intravenosa expandiram o conhecimento acerca do seu potencial efeito adverso: o tromboembolismo. A infusão de células em altas doses pode criar um aglomerado celular que obstrui a circulação

sanguínea. Em camundongos, a administração por via intravenosa de doses superiores a  $4 \times 10^7$  MSCs/kg (o que costuma ser equivalente a  $1 \times 10^6$  MSCs/camundongo, considerando seu peso médio de 20-25g), está associada ao aumento da mortalidade (LI et al., 2023). Averyanov e colaboradores, ao avaliarem em um estudo Fase IIa o impacto da terapia com doses elevadas de MSCs derivadas de medula óssea (8 doses de  $2 \times 10^8$  células, totalizando  $1,6 \times 10^9$  células por paciente) em indivíduos com fibrose pulmonar rapidamente progressiva, obtiveram um caso de AVE isquêmico dentre os dez pacientes que receberam a terapia (AVERYANOV et al., 2020).

As MSCs podem ser administradas por duas vias principais: sistêmica/intravenosa (iv) ou tópica (intratraqueal, intracraniana, subcutânea, dentre outras). A via sistêmica é a mais utilizada por conveniência, porém a administração tópica possui a vantagem de entrega direta das células ao órgão fragilizado. (ZHANG et al., 2015).

O mecanismo através do qual as MSCs são capazes de migrar para a região lesada ainda não está completamente elucidado, mas parece depender da passagem dessas células através dos capilares, quando ocorre redução da sua velocidade, o que possibilita a apresentação de citocinas, ativação de integrinas, adesão, rastreamento e direcionamento (CHAMBERLAIN et al., 2011).

No passado, acreditava-se que os efeitos das MSCs decorriam de sua plasticidade, da capacidade de autorrenovação e de diferenciação em outras linhagens (criando um novo tecido em substituição a um previamente danificado, por exemplo), mas atualmente, acredita-se que o efeito benéfico as MSCs deve-se a sua atuação sobre células-alvo, particularmente do sistema imune e também sobre diversas células estruturais dos diferentes órgãos (KATSUDA et al., 2013). As MSCs podem agir através do contato direto célula-célula ou por meio de efeitos parácrinos e/ou endócrinos, especialmente através de transferência de organelas como as mitocôndrias, da liberação de mediadores solúveis e de vesículas extracelulares (EVs) (KEANE; JERKIC; LAFFEY, 2017).

De Carvalho e colaboradores, em 2021, evidenciaram que terapia de camundongos sépticos com infusão de mitocôndrias derivadas de MSCs reduziu a mortalidade, além de ter efeitos benéficos na mecânica e inflamação pulmonares, na lesão renal, nos níveis de creatinina, além de reduzirem os níveis de citocinas

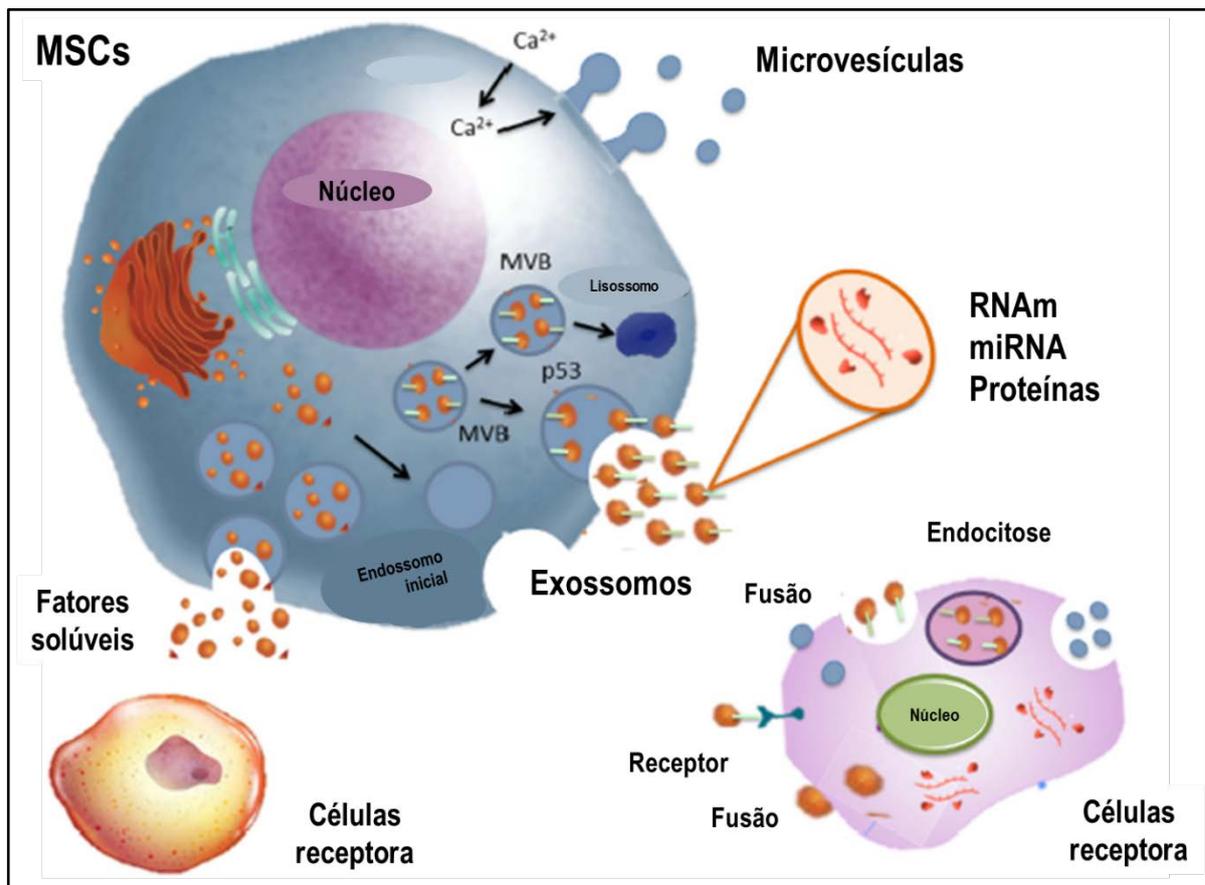
circulantes (DE CARVALHO et al., 2021)

Um dos principais mecanismos de ação das MSCs parece ser a liberação de EVs (THERY *et al.*, 2018) e essas vesículas têm tido seu potencial terapêutico explorado nos últimos anos para tratamento de diversas patologias, como sepse (HOMMA et al., 2023), fibrose pulmonar (WAN et al., 2020), asma (BANDEIRA et al., 2023), hipertensão pulmonar (ZHANG et al., 2020), cirrose (OHARA et al., 2018), osteoartrite (COSENZA et al., 2017), dentre outras.

### 1.3.1 VESÍCULAS EXTRACELULARES

A Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares nomeia como vesículas extracelulares (EVs) todas as partículas liberadas por células, envoltas por uma bicamada lipídica, sem capacidade de duplicação e sem núcleo funcional. Essas vesículas podem ser originadas a partir dos endossomos (sendo classicamente nomeadas como exossomos) ou podem originar-se pelo brotamento direto da membrana plasmática, sendo rotineiramente classificadas como microvesículas (Figura 5). Ainda não foi possível estabelecer marcadores de superfície específicos e exclusivos dos exossomos e microvesículas. Desta forma, opta-se por classificar as vesículas extracelulares de acordo com suas características físicas, como seu tamanho (caso possuam tamanho inferior a 200 nanômetros, são classificadas como pequenas; se ultrapassarem 200 nanômetros, são classificadas como médias/grandes), densidade e composição bioquímica (CD63+/CD81+, Anexina A5+, etc) (THERY *et al.*, 2018).

**Figura 5 -** Representação esquemática da biogênese das vesículas extracelulares



**Fonte:** Adaptado de Abreu, Weiss e Rocco, 2016 (ABREU; WEISS; ROCCO, 2016).

**Legenda:** MSC: célula mesenquimal estromal; miRNA: microRNA; MVBs: corpos multivesiculares; RNAm: RNA mensageiro.

**Nota:** As microvesículas brotam diretamente da membrana plasmática, por um mecanismo que depende do cálcio, enquanto exossomos originam-se de endossomos iniciais, que são gerados pelo brotamento interno da membrana e transformam-se em corpos multivesiculares (MVBs). Os MVBs são direcionados para a periferia celular e, após a fusão com a membrana plasmática, liberam seu conteúdo (exossomos) no espaço extracelular. As vesículas extracelulares na forma de microvesículas ou exossomos carregam RNA mensageiro, microRNA, proteínas e outras organelas, sendo capazes de interagir com a célula receptora a partir da interação na superfície celular, internalização por endocitose ou fusão com a membrana plasmática.

Atualmente, diversas habilidades das EVs são conhecidas, como a sua capacidade de realizar comunicação entre as células, além de transportar proteínas, lipídios, RNAm, miRNA e organelas (Figura 5). Esses RNAm podem inclusive ser transportados e traduzidos em outras células, alterando o fenótipo das mesmas. Dentre os RNAs mais frequentemente encontrados nas vesículas, estão os relacionados ao controle da transcrição, proliferação celular e imunomodulação. Por sua vez, os miRNAs podem alterar a expressão de genes específicos em células-alvo, estando associados à sobrevivência e proliferação das mesmas, bem como à regulação do sistema imunológico. As proteínas encontradas dentro das EVs estão

associadas à autorenovação e diferenciação celular, devido à presença de proteínas de superfície (receptor fator de crescimento derivado de plaqueta, receptor de fator de crescimento epidérmico, dentre outros), moléculas de sinalização da via da MAPK e moléculas de adesão celular, corroborando o papel das vesículas no reparo tecidual (ABREU; WEISS; ROCCO, 2016; KATSUDA *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2012).

As vesículas extracelulares interagem com as células do tecido de três maneiras distintas: interação na superfície celular, internalização por endocitose ou fusão com a membrana plasmática (Figura 5). A captação das EVs pelas diferentes células parece estar diretamente relacionada com o pH do meio: Parolini e colaboradores, em 2009, evidenciaram que o meio ácido é a chave para aumentar tanto a liberação quanto a captação de vesículas, o que provavelmente está associada à redução da rigidez da membrana em ambientes de pH reduzido, por aumento da concentração de componentes lipídicos. Além disso, o grupo especula que, em meio ácido, as vesículas (que naturalmente possuem predomínio de cargas negativas em seu interior), seriam positivamente carregados com hidrogênio (H<sup>+</sup>), o que tenderia a neutralizar sua carga, facilitando a fusão com as células receptoras (PAROLINI *et al.*, 2009; PHINNEY *et al.*, 2015).

É importante destacar que, assim como as MSCs, as características de cada EV estão diretamente relacionadas ao tipo celular e tecidual de origem no que diz respeito às suas características fenotípicas, ao seu conteúdo e também às vias metabólicas e função desempenhada no organismo e nos órgãos-alvo. Em adição, os efeitos das EVs também variam de acordo com as células sobre as quais elas exercem seus efeitos (KATSUDA *et al.*, 2013; MENARD *et al.*, 2020; OSTANIN *et al.*, 2011). Nesse contexto, as vesículas provenientes das MSCs despontam como uma nova opção terapêutica, na medida em que as habilidades secretoras dessas células têm se mostrado como o mais importante pilar dentre os seus mecanismos de ação (DOMINICI *et al.*, 2006).

EVs provenientes de MSCs modulam o sistema imune a partir da liberação e estímulo à secreção de citocinas anti-inflamatórias, da indução de células T Reguladoras (Treg), e do controle da polarização de macrófagos e da mobilização de neutrófilos. Além disso, parecem interferir na expansão de progenitores mieloides, reduzindo a quantidade de linfócitos B e Natural Killer. Merece destaque o fato de que as vesículas extracelulares são capazes de transferir mitocôndrias e enzimas geradoras de ATP para os tecidos lesados, aumentando a quantidade de

energia disponível para a regeneração tecidual (DOSTERT *et al.*, 2017; ISLAM *et al.*, 2012).

### 1.3.2 CONTEÚDO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

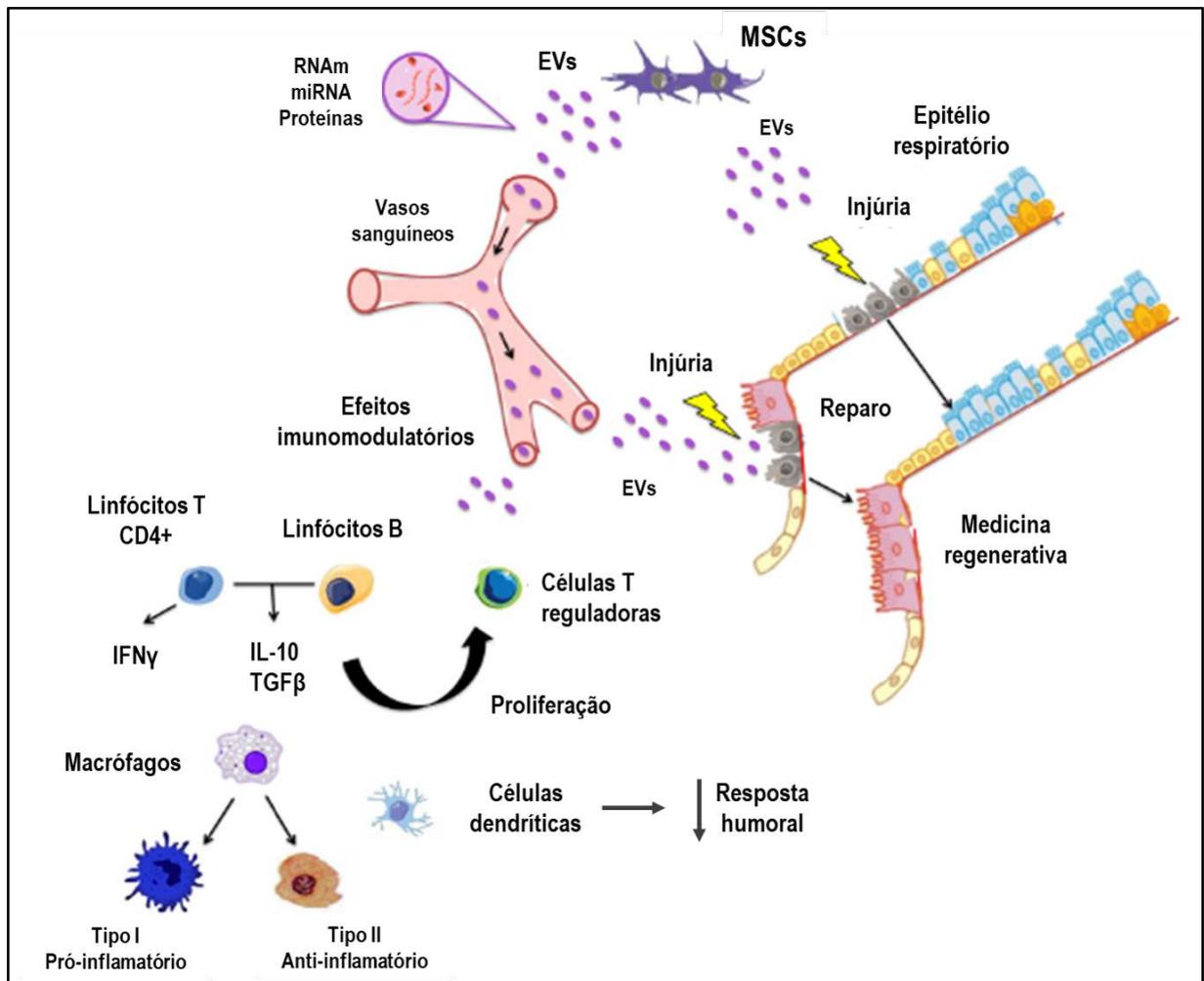
As vesículas extracelulares possuem em seu interior proteínas, microRNAs, RNAs mensageiros, RNAs longos não-codificantes e fosfolipídeos e exercem seu papel terapêutico principalmente a partir da transferência de proteínas, RNAs e microRNAs para células-alvo (QIU *et al.*, 2019). Na última década, muitos avanços acerca da assinatura proteômica dessas vesículas ocorreram. Kim e colaboradores identificaram 730 proteínas em EVs provenientes de MSCs humanas, com vias de sinalização associadas à autorrenovação, diferenciação, adesão, migração e morfogênese (KIM *et al.*, 2012). Wang e colaboradores analisaram e compararam o conteúdo de proteínas de EVs derivadas de medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical. As EVs possuíam perfil de proteínas similar no que diz respeito às proteínas de matriz extracelular, porém diferiram quanto às proteínas funcionais: EVs derivadas de medula óssea eram enriquecidas de proteínas envolvidas na regeneração tecidual; quando derivadas de tecido adiposo, apresentavam proteínas com efeito imunológico a partir da regulação de leucócitos; as originadas na cordão umbilical eram enriquecidas em inibidor do ativador de plasminogênio- 1 (PAI-1), proteína envolvida na homeostase endotelial e regulação da fibrose tecidual (WANG *et al.*, 2020). Recentemente, Braga e colaboradores compararam o perfil proteômica das MSCs de roedores submetidas a um ambiente com hipóxia às MSCs em normóxia: aquelas liberaram mais vesículas extracelulares, cujo conteúdo era enriquecido de proteína relacionadas à imunomodulação e à formação de matriz extracelular (BRAGA *et al.*, 2022).

## 1.4 Terapia celular na sepse

Há mais de dez anos, inúmeros estudos mostram efeitos benéficos da terapia celular na redução da mortalidade e da lesão de órgãos em modelos murinos de sepse (MEI *et al.*, 2010). As MSCs exercem suas propriedades imunomoduladoras atuando nas duas fases dessa síndrome. Na etapa inicial, caracterizada por inflamação exacerbada e intensa lesão de órgãos, as células mesenquimais liberam

vesículas extracelulares ricas em citocinas, proteínas e RNAs com características anti-inflamatórias, reduzindo o efeito citotóxico das células Natural Killer, suprimindo a proliferação de linfócitos e reduzindo o influxo tecidual de neutrófilos e, portanto, os danos causados por eles (MATTHAY; PATI; LEE, 2017). Nessa fase, as células mesenquimais – especialmente através da liberação de vesículas extracelulares - ainda contribuem para a redução dos danos teciduais por meio de outras propriedades: efeito antimicrobiano direto – como a secreção de peptídeos bactericidas – e indireto – como o aumento da atividade fagocítica dos macrófagos; efeito antioxidante, por promover redução da secreção de EROS; e efeito antiapoptótico, a partir da secreção de fatores de crescimento (MATTHAY; PATI; LEE, 2017) (Figura 6). Vale ressaltar que as vesículas extracelulares derivadas de MSCs apresentam efeito benéfico bem estabelecido sobre o pulmão, órgão frequentemente danificado na sepse de origem pulmonar e extrapulmonar, sendo capazes de reduzir o edema intersticial, a permeabilidade vascular, a infiltração de neutrófilos e a concentração de proteínas inflamatórias no lavado broncoalveolar em modelo murino de síndrome do desconforto respiratório (ABREU; WEISS; ROCCO, 2016)(Figura 6). Na fase tardia, as MSCs atuam reduzindo a apoptose de células do sistema imunológico e conseqüentemente a imunossupressão (MATTHAY; PATI; LEE, 2017).

**Figura 6** - Representação ilustrando a função das vesículas extracelulares liberadas por células mesenquimais estromais



**Fonte:** Adaptado de Abreu, Weiss e Rocco, 2016 (ABREU; WEISS; ROCCO, 2016).

**Legenda:** IFN: interferon; IL: interleucina; TGF: fator de transformação do crescimento, do inglês, *transforming growth factor*; CD: grupamento de diferenciação, do inglês, *cluster of differentiation*.

**Nota:** O intercâmbio de proteínas, RNA mensageiro e microRNA entre MSCs e tecidos danificados contribui para o reparo e regeneração.

#### 1.4.1 LIMITAÇÃO DO USO DE MSC NO TRATAMENTO DA SEPSE E APLICABILIDADE DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Há evidência de que o tratamento da lesão pulmonar - frequentemente observada na sepse - com elevadas doses de MSCs apresenta melhores resultados quando comparado ao uso de baixas doses de células, principalmente no que diz respeito à melhora da inflamação pulmonar (ASMUSSEN *et al.*, 2014).

Apesar dos inúmeros efeitos benéficos da terapia com MSCs, sua administração intravenosa em altas doses pode ter repercussões graves. Yavagal e

colaboradores realizaram um estudo comparativo visando definir a melhor dose de MSCs a ser administrada em ratos que sofreram acidente vascular encefálico isquêmico, com o objetivo de restaurar o tecido neuronal lesado. As doses utilizadas foram  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  MSCs, e a mortalidade associada foi de 8,3%, 28,6%, 12,5%, 42,9%, 42,9% nos grupos tratados e 42,9% no grupo placebo, respectivamente (YAVAGAL *et al.*, 2014). Como é possível observar, doses mais altas de MSCs administradas por via intravenosa estão associadas a maiores taxas de mortalidade (podendo, inclusive, igualar-se à taxa de mortalidade do grupo placebo). O grupo mostrou ainda que essa maior mortalidade está fortemente relacionada com a formação de microtrombos de células mesenquimais (que são grandes, com tamanhos variando entre 15-50 micrômetros) em diversas regiões, com destaque para os trombos na vascularização do sistema nervoso central, o que explica menor sobrevivência quando maiores doses são administradas aos animais.

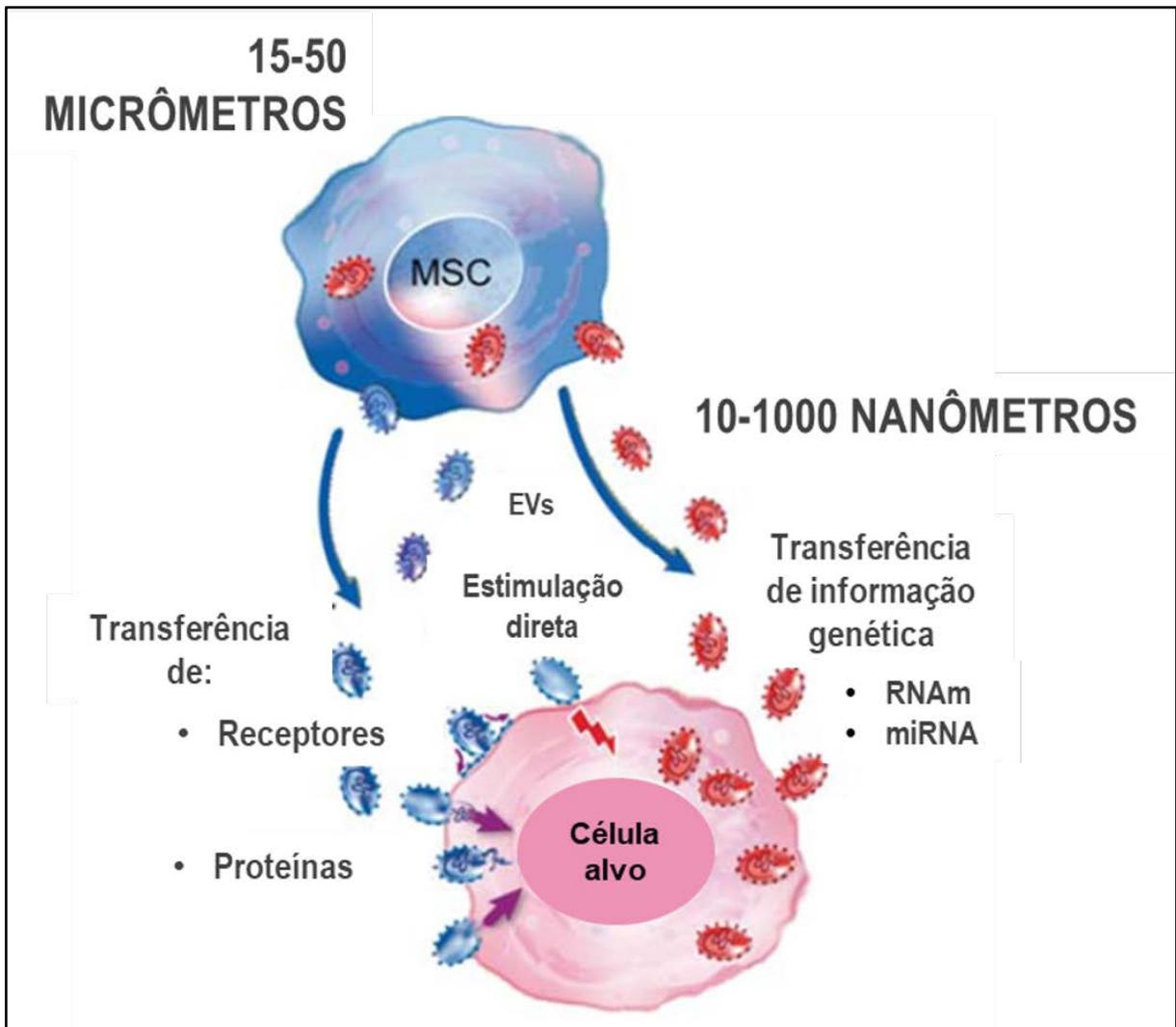
Em 2023, Kui Li e colaboradores administraram células mesenquimais estromais derivadas de tecido adiposo em camundongos sépticos, nas seguintes doses:  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  e  $4 \times 10^7$  células/kg (equivalente a aproximadamente  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$  e  $8 \times 10^5$  em camundongos com 20g). A dose intermediária apresentou melhor efeito na taxa de sobrevivência (35,89% versus 8,89% no grupo sepse que não recebeu tratamento), a menor dose não apresentou efeitos significativos e a maior dose apresentou taxa de sobrevivência de 21,42%, o que talvez esteja associado aos efeitos tromboembólicos adversos. (LI *et al.*, 2023)

O uso de vesículas extracelulares na sepse visa contornar a limitação dose-dependente observada na terapia com células mesenquimais. Isso se deve ao fato de as EVs apresentarem efeito muito similar ao das MSCs, na medida em que representam um dos seus principais mecanismos de ação, porém com tamanho menor. As vesículas possuem tamanho que varia entre 10 a 1000 nanômetros, sendo muito menores que as células, com tamanho estimado entre 15 e 50 micrômetros. Dessa forma, devido às diferenças nas propriedades físicas, as EVs apresentam risco trombótico inferior ao das MSCs, mantendo efeito terapêutico semelhante (THERY *et al.*, 2018) (Figura 7). Comparadas à terapia celular, as EVs possuem menor imunogenicidade e toxicidade, mantendo relativa estabilidade na circulação. (YANG *et al.*, 2023)

Vale ressaltar que, apesar de não haver evidência na literatura de que a infusão de células mesenquimais esteja associada ao aumento do risco de neoplasia

(WANG; YI; SONG, 2021), o que gera preocupação, na medida em que essas células possuem capacidade de autorreplacação, o uso das EVs também parece ser ainda mais seguro nesse aspecto, visto que não se replicam. (HOMMA, K. et al., 2023).

**Figura 7 -** Representação das diferenças nos tamanhos entre MSCs e EVs, bem como a comunicação intercelular realizada pelas EVs



**Fonte:** Adaptado de Biancone et al., 2012 (BIANCONE *et al.*, 2012).

**Legenda:** EV: vesícula extracelular; MSC: célula mesenquimal estromal; miRNA: microRNA.

**Nota:** As vesículas extracelulares podem estimular diretamente células-alvo a partir de receptores de superfície. EVs podem transferir proteínas, RNA mensageiro e microRNA, promovendo alterações funcionais nas células-alvo.

## 1.5 Vesículas extracelulares derivadas de MSCs na sepse

Diversos ensaios pré-clínicos analisaram o efeito das EVs em modelo experimental de sepse. Recentemente, foi publicada uma meta-análise que reforçou o potencial benéfico das EVs na síndrome (YANG et al., 2023).

Em 2021, Danyang e colaboradores evidenciaram que a administração de EVs derivadas de medula óssea (dose  $2 \times 10^7$  células por via iv) em ratos de ambos os sexos com sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP) recuperou parcialmente a função da barreira intestinal perdida na sepse, além de melhorar o metabolismo energético das células do intestino a partir da transferência mitocondrial (ZHENG et al., 2021).

Em outro estudo, EVs derivadas de  $1,5 \times 10^9$  MSCs também extraídas da medula óssea atenuaram a disfunção miocárdica induzida pela sepse em camundongos machos, além de reduzirem os níveis séricos de creatinofosfoquinase (CK-MB) e lactato desidrogenase (LDH) e o índice de apoptose miocárdica (PEI et al., 2021).

Xiaoyan Wang e seu grupo avaliaram o efeito da infusão de EVs derivadas de tecido adiposo em camundongos machos com sepse e observaram uma redução na mortalidade, no edema pulmonar e no conteúdo de IL-6 e IL-1 $\beta$  no pulmão (WANG et al., 2022).

O tratamento com EVs de origem humana também apresenta efeito benéfico na sepse experimental: em camundongos machos submetidos à cirurgia de CLP, o tratamento com EVs derivadas de células mesenquimais humanas provenientes do âmnio (dose derivada de  $1 \times 10^6$  células/animal) atenuou a disfunção renal aguda através da atuação da disfunção endotelial. (CHI et al., 2022); em outro estudo, a infusão de EVs derivadas células mesenquimais do cordão umbilical reduziu a injúria pulmonar nos camundongos sépticos (CHEN et al., 2021).

## 2 JUSTIFICATIVA

---

A sepse é uma das maiores causas de morbimortalidade no mundo, sendo a principal responsável pelas internações nas unidades de terapia intensiva. Além disso, o impacto financeiro dessa síndrome na economia dos países é significativo, devido à sua alta incidência e ao elevado custo associado ao seu manejo clínico, estimado em 10 mil dólares por paciente internado (FLEISCHMANN *et al.*, 2016).

Em relação à fisiopatologia, a sepse caracteriza-se por uma resposta imune desequilibrada a uma infecção, que cursa com lesão a diversos órgãos. Isso pode ser explicado por diversos fatores, que são divididos de maneira simplificada em duas fases: a primeira, mais precoce, caracteriza-se por uma exacerbação da inflamação e engloba fatores como elevada produção de citocinas, ativação de linfócitos, células endoteliais, macrófagos e neutrófilos, aumento da permeabilidade vascular, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, exacerbada citotoxicidade de linfócitos CD8+ e natural killer responsáveis pelas lesões teciduais e alterações vasculares (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008; WANG; MA, 2008). A segunda fase, mais tardia, caracteriza-se pelo silenciamento imunológico, que ocorre devido à apoptose e redução da atividade das células de defesa, aumentando o risco de infecções por patógenos oportunistas. Neste último momento, encontram-se as maiores taxas de mortalidade (HOTCHKISS *et al.*, 1999; KOLLEF *et al.*, 2008; SOLOMKIN *et al.*, 1981).

No contexto de desequilíbrio imune, o tratamento com MSCs apresenta-se como uma excelente alternativa terapêutica, na medida em que tem como base sua ação imunomoduladora, seu efeito antioxidante – ideal para o controle do dano tecidual provocado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio-, o efeito antiapoptótico – direcionado para o combate à imunossupressão observada nas fases tardias da doença-, e, por fim, o efeito antimicrobiano, que atuaria em sinergia com os demais mecanismos para o controle da fonte infecciosa e para a contenção dos danos provocados ao organismo pela resposta imune exacerbada (MATTHAY; PATI; LEE, 2017).

Apesar de muito próspera, essa estratégia apresenta uma importante limitação: diversos estudos têm reportado que a administração intravenosa de doses elevadas de MSCs estão associadas à melhora do quadro clínico, porém com

aumento a incidência de eventos tromboembólicos(ASMUSSEN *et al.*, 2014; YAVAGAL *et al.*, 2014).

Diante dessa limitação e considerando o fato de que os efeitos obtidos no tratamento com MSCs devem-se, principalmente, à ação parácrina dos fatores solúveis liberados através das vesículas extracelulares(DOSTERT *et al.*, 2017; ISLAM *et al.*, 2012), a abordagem terapêutica da sepse com as EVs liberadas pelas MSCs apresenta-se como uma forma de contornar a limitação imposta pela administração intravenosa de um número elevado de MSCs. Considerando que o tamanho das EVs é significativamente menor que o das MSCs (10-1000 nanômetros comparados a 15-50 micrômetros), e que o risco associado à formação de trombos é diretamente proporcional ao tamanho da partícula administrada por via intravenosa, essa nova estratégia permitiria a exploração dos efeitos benéficos associados à administração de vesículas provenientes de uma elevada concentração de células mesenquimais estromais, com atenuação dos efeitos pró-trombóticos indesejados (LI *et al.*, 2023; THERY *et al.*, 2018; YAVAGAL *et al.*, 2014;(REF).

Outra questão importante baseia-se na relação fenotípica entre vesícula e sua célula-fonte. Como já citado, as EVs carregam os aspectos funcionais e estruturais das células em que tiveram origem (KATSUDA *et al.*, 2013; MENARD *et al.*, 2020). Além disso, atualmente, fontes de MSCs alternativas à medula óssea vêm sendo amplamente exploradas, com o objetivo de obter um maior número de células mesenquimais, com procedimentos menos invasivos. Uma estratégia interessante seria, por exemplo, obtenção de MSCs do tecido adiposo, que pode ser facilmente extraído dos doadores, sem grandes riscos associados. Além disso, considerando que o órgão mais frequentemente acometido na sepse (CHOPRA; REUBEN; SHARMA, 2009) é o pulmão, estudar o efeito terapêutico de MSCs derivadas de pulmão na sepse pode ser interessante. Até o presente momento, não há na literatura comparação do efeito da terapia com EV derivadas de MSCs da medula óssea, do tecido adiposo e do pulmão na sepse.

Dessa forma, o presente estudo objetiva avaliar e comparar pela primeira vez o efeito terapêutico do uso de EVs derivadas de  $3 \times 10^6$  de MSCs provenientes da medula óssea, tecido adiposo e pulmão na taxa de mortalidade, na inflamação e no dano tecidual na sepse experimental induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP), bem como estudar e compreender melhor as características fenotípicas e o conteúdo proteômico das vesículas provenientes dessas três diferentes fontes.

### 3 HIPÓTESE

---

A terapia com vesículas extracelulares derivadas de altas concentrações de células mesenquimais estromais provenientes da medula óssea, tecido adiposo e pulmão e administradas por via intravenosa possui efeitos benéficos e distintos na mortalidade e na inflamação de órgãos na sepse experimental e isso se associa às diferenças observadas no conteúdo proteômico, que pode variar entre as três fontes.

## 4 OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivos gerais

Comparar as características estruturais, fenotípicas e o conteúdo proteômico das vesículas extracelulares provenientes de medula óssea, tecido adiposo e pulmão.

Avaliar o efeito da terapia com vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais estromais provenientes de medula óssea, tecido adiposo e pulmão na mortalidade e no dano pulmonar, renal e hepático na sepse experimental.

### 4.2 Objetivos específicos

Caracterizar as vesículas extracelulares derivadas de MSCs provenientes da medula óssea, pulmão e tecido adiposo;

Analisar e comparar o conteúdo proteômico das vesículas provenientes das três diferentes fontes;

Analisar e comparar o impacto dessas três terapias na taxa de mortalidade;

Analisar e comparar o impacto dessas três terapias e na lesão tecidual (por análise histopatológica) e na inflamação (por análise de citocinas) nos pulmões, rins e fígado;

Investigar o mecanismo de ação e as vias metabólicas associadas aos diferentes efeitos observados na terapia com vesículas extracelulares derivadas de medula óssea, tecido adiposo e pulmão.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 5.1 Aprovação do Estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde (CEUA-025/17) da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Todos os animais receberam cuidados conforme as diretrizes ARRIVE (Do inglês, *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (PERCIE DU SERT *et al.*, 2020). Os camundongos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (23°) e controle da luz (claro/escuro, 12-12h), com acesso livre à água e alimento.

### 5.2 Cultura de células mesenquimais estromais e extração de vesículas extracelulares

Doze camundongos C57BL/6 machos saudáveis (20-25 g, 6-8 semanas de idade) foram submetidos à eutanásia com Quetamina (25 mg/kg, Cristália, Itapira, SP, Brasil) e Xilazina (2 mg/kg, Syntec, Barueri, SP, Brasil) e utilizados como doadores. MSCs da medula óssea, pulmão e tecido adiposo foram obtidas como previamente descrito (ABREU *et al.*, 2017).

Brevemente, células da medula óssea foram obtidas do fêmur e da tíbia. Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura estéreis, foram retirados a pele e os músculos adjacentes ao fêmur e à tíbia, evitando o rompimento da artéria femoral. As epífises ósseas foram cortadas, e a cavidade medular foi lavada com meio de cultura de Iscove modificado por Dulbecco (IMDM) (Gibco, CA, <https://www.thermofisher.com>) utilizando uma seringa com agulha de 18 gauge colocada sobre um tubo estéril de poliestireno cônico de 15 mL (Falcon®). Células do pulmão foram obtidas a partir da maceração dos dois lobos pulmonares e as do tecido adiposo foram obtidas a partir da maceração da almofada de gordura epididimal. Os tecidos foram coletados, suspensos em PBS, transferidos para uma placa de Petri e cortados em pequenos pedaços (aproximadamente 0,2-0,8 cm<sup>2</sup>). Os pedaços dissecados foram lavados com PBS, cortados em pedaços ainda menores, e subsequentemente digeridos com collagenase tipo I (1 mg/ml em DMEM / 10 mM HEPES) por 30-60 minutos a 37,8°C. Sempre que restava tecido, a amostra era mantida em collagenase por mais 1-3

minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo meio fresco e centrifugado a 480 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. Os *pellets* foram ressuspensos em 3 ml de IMDM suplementado contendo 1% de solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen, CA), semeados em placas de 6 poços (3 ml por poço), que foram incubadas a 37,8°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO. No dia 3 de cultura, o meio foi trocado e as células não aderentes foram removidas. As células aderidas exibiram taxas similares de proliferação e após atingirem 80% de confluência, foram colocadas em frascos de cultura com meio essencial IMDM suplementado, conforme já descrito previamente (ABREU *et al.*, 2017).

Aproximadamente  $3 \times 10^6$  células foram caracterizadas como MSCs entre a terceira e quinta passagens de acordo com o Consenso da Sociedade Internacional de Terapia Celular (VISWANATHAN *et al.*, 2019). Uma alíquota de 1  $\mu$ L de células foi diluída em 200  $\mu$ L de ácido acético 2% (Reagen<sup>®</sup>) (líquido de Turck) a fim de lisar as hemácias e evitar a contagem das mesmas. Desta diluição, foram retirados 10  $\mu$ L de suspensão de células, que foram posteriormente adicionados na câmara de Neubauer (Hausser Scientific). O número de células redondas e brilhantes foi contado nos quatro quadrantes, e através dos cálculos das diluições realizadas, chegou-se à concentração de MSCs obtida pelo processo de extração e purificação.

Para induzir uma liberação maciça de EVs, foi realizado estresse das MSCs através da depleção total de soro no meio de cultura (DE CASTRO *et al.*, 2017). Após 12 horas, o meio foi coletado e centrifugado (2000 x g) por 20 minutos a 4°C para remover o *debris* celular. Em seguida, foi realizada ultracentrifugação (100.000 x g) por 1 hora a 4°C. O precipitado foi coletado e suspenso em solução salina a 0,9% para uso imediato, congelado para uso posterior ou ressuspenso em 100 $\mu$ L de 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> com RapiGest SF a 0,2% (Waters Corporation, Milford, MA, USA) e posteriormente congelado (-80°C) para análise proteômica. O diâmetro hidrodinâmico e a concentração de EVs foram avaliados. As amostras foram diluídas na proporção de 1:10 em solução tampão fosfato-salino (PBS) estéril e filtrada para um volume final de 1mL. Conforme o manual do software disponibilizado pelo fabricante, (NanoSight NS300 User Manual, MAN0541-02-EN, 2018; NanoSight, Salisbury, UK), cinco vídeos de 60 segundos foram capturados nas seguintes condições: temperatura, 25°C; velocidade da seringa, 25  $\mu$ L/s; nível da câmera, 13; ganho da tela, 1.0. Após a captura, os vídeos foram analisados pelo software

embutido (NTA 3.4 build 3.4.4) com um limiaros vídeos foram analisados pelo software embutido (NTA 3.4 build 3.4.4) com um limiar de detecção de 7. Hardware: laser integrado de 532 nm; câmera, sCMOS (BACHURSKI *et al.*, 2019).

## 5.3 Proteômica

### 5.3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

Alíquotas contendo aproximadamente 30 µg de proteínas derivadas das EVs foram reduzidas usando ditioneitol (concentração final de 10 mM, por 3 horas a 37°C) e alquiladas com iodoacetamida (concentração final de 25 mM, 30 minutos no escuro à temperatura ambiente). As proteínas extraídas foram incubadas com tripsina (Promega) 1:50 (m/m) por ~ 20 horas a 37°C e 45 minutos a 56°C termobloco (Eppendorf). A reação foi interrompida pela adição de ácido trifluoroacético a uma concentração final de 1% (v/v). A solução digerida de peptídeos foi dessalinizada em microcolunas com resina POROS R2 (Applied Biosystems). As amostras foram completamente secas em centrífuga a vácuo (Speed Vac® Plus SC210A -Savant) e ressuspensas com ácido fórmico a 1%. A concentração da mistura peptídica foi estimada por leitura de absorbância a 280 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). As amostras foram armazenadas a -20°C para análise de espectrometria de massa.

### 5.3.2 ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

A mistura de peptídeos (4,0 µL de cada amostra de EVs) foi analisada utilizando-se um espectrômetro de massa LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) acoplado à cromatografia líquida em um sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystems) com uma fonte de íons nanoeletrônicos Proxeon. Os peptídeos foram subsequentemente separados em um gradiente de 2-90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico usando uma coluna analítica PicoFrit (20 cm × ID75.5 µm tamanho de partícula, Novo Objetivo) a uma taxa de fluxo de 300 nL/min, durante 80 min, em que se atinge um gradiente de 35% de acetonitrila 40 min. A voltagem do nanoelectrospray foi ajustada para 2,2 kV, e a temperatura da fonte foi ajustada para 275 °C. Os métodos de instrumentos empregados para o LTQ Orbitrap Velos foram

configurados no modo DDA. Espectros MS de varredura completa (m/z 300–1600) foram adquiridos no analisador Orbitrap após a acumulação para um valor alvo de  $1 \times 10^6$ . A resolução no Orbitrap foi definida para  $= 60.000$ , e os 20 íons peptídicos mais intensos (top 20) com estados de carga  $\geq 2$  foram isolados sequencialmente para um valor alvo de 5000 e fragmentados na armadilha de íons linear de alta pressão por CID (dissociação induzida por colisão) com uma energia de colisão normalizada de 35%. A exclusão dinâmica foi habilitada com uma lista de tamanho de exclusão de 500 peptídeos, uma duração de exclusão de 60 s e uma contagem de repetições de 1. Um Q de ativação de 0,25 e um tempo de ativação de 10 ms foram usados (CARNIELLI *et al.*, 2018). A ordem de execução foi randomizada e bloqueada usando a linguagem de programação estatística de código aberto R.

### 5.3.3 ANÁLISE DE DADOS DE PROTEÔMICA

Os dados brutos foram processados utilizando-se o software MaxQuant v1.3.8 (COX; MANN, 2008) e os espectros MS/MS foram pesquisados no banco de dados *The Mouse UniProt* (lançado em dezembro de 2020, 63.724 sequências e 28.586.808 resíduos) usando o mecanismo de busca *Andromeda* (COX *et al.*, 2011). Como parâmetros de busca foram considerados uma tolerância de 10 ppm para íons precursores (busca MS) e 1 Da para íons fragmentos (busca MS/MS), com um máximo de duas clivagens perdidas. A carbamidometilação da cisteína foi considerada uma modificação fixa, e a oxidação da metionina e a acetilação N-terminal da proteína foram consideradas modificações variáveis. Um máximo de 1% de taxa de falsa descoberta (FDR) foi definido para a identificação de proteínas e peptídeos. A quantificação de proteínas foi realizada usando o algoritmo LFQ implementado no software MaxQuant, com uma contagem de razão mínima de 1 e uma janela de 2 min para correspondência entre as corridas. A análise estatística foi realizada com o software Perseus v.1.5.2.6 (TYANOVA *et al.*, 2016) que está disponível no MaxQuant. As proteínas identificadas foram processadas, excluindo as sequências reversas. Os contaminantes não foram removidos do conjunto de dados.

#### 5.3.4 INTERPRETAÇÃO DE DADOS DE PROTEÔMICA

A abundância de proteínas foi calculada com base na intensidade do espectro normalizado (intensidade LFQ) e, em seguida, transformado em  $\text{Log}_2$ . Os Mapas de calor (*heatmaps*) com intensidades de LFQ  $\text{Log}_2$  foram construídos a partir das proteínas identificadas nas vesículas extracelulares com p valor  $<0,05$ , excluindo-se potenciais contaminantes, utilizando um software específico (Metabo Analyst 5.0). Identificamos as proteínas mais abundantes em cada população de EVs em comparação com as outras duas populações (apenas aquelas com p valor  $<0,05$  foram incluídas) e as decodificamos usando a Plataforma *String* (<https://string-db.org/>) para análise murina. Com base no pool de proteínas mais prevalentes em cada fonte, descrevemos as vias metabólicas que estavam associadas às proteínas estatisticamente significativas através da Plataforma *Enricher* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), considerando as vias indexadas no *WikiPathways 2019 Mouse*.

#### 5.3.5 DISPONIBILIDADE DE DADOS

Os dados brutos de espectrometria de massa foram depositados no ProteomeXchange Consortium por meio da plataforma PRIDE (PEREZ-RIVEROL *et al.*, 2019), com o identificador PXD023259.

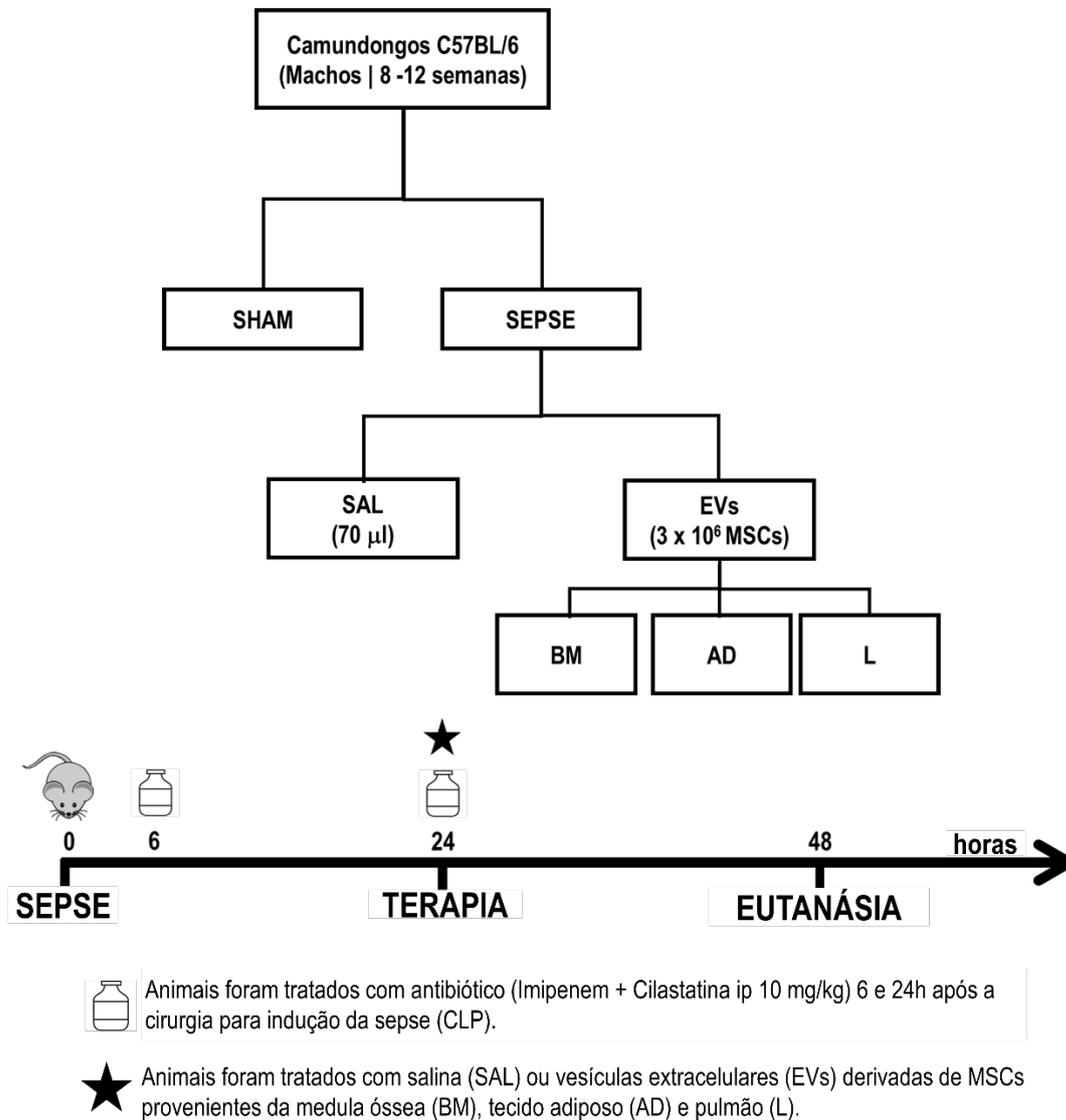
### 5.4 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada a partir da fixação das MSCs e EV sem glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2) por 2 horas e lavadas duas vezes com o tampão de cacodilato. Imediatamente após, foi realizada pós-fixação com solução de  $\text{OsO}_4$  e FeCNK (1:1) durante 45 minutos, seguida de desidratação com etanol por 10 minutos a cada concentração: 30%, 50%, 70%, 90%, 100%. Após a secagem crítica, as lamínulas foram analisadas e as imagens foram adquiridas em um microscópio eletrônico de varredura FEI QUANTA 250 (FEI, Hillsboro, OR, EUA). A lamínula com MSCs não submetidas a estresse foi utilizada como controle.

## 5.5 Preparo dos animais e protocolo experimental

Todas as análises foram feitas de forma cega. Trinta camundongos C57BL/6 machos (25-30g, 8-12 semanas de idade) foram alocados em 2 grupos principais: sham (SHAM) e sepse experimental (SEPSE) induzida pela cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) (SILVA *et al.*, 2016). Resumidamente, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (ip) de quetamina e xilazina (0,25 mg/kg e 0,025 mg/kg, respectivamente) e uma laparotomia mediana (incisão de 2 cm) foi realizada. O ceco foi cuidadosamente isolado e ligado abaixo da válvula ileocecal para evitar obstrução com fio de algodão 3-0. Em seguida, o ceco foi puncionado uma vez com agulha de calibre 18G, a camada muscular, subcutânea e a pele foram suturadas e os animais deixados para recuperação da anestesia (SILVA *et al.*, 2016). Na cirurgia Sham, a cavidade abdominal foi aberta e o ceco foi isolado sem ligadura ou perfuração. Os cuidados pós-operatórios foram semelhantes nos dois grupos e consistiram em injeção subcutânea de cloridrato de tramadol (20 mg/g peso corporal) em 1 mL de solução salina normal morna (37°C) (NaCl 0,9%) para prevenir a desidratação e o choque. Todos os animais submetidos à cirurgia de CLP receberam antibiótico (imipenem/cilastatina, 10 mg/kg, ip) 6 e 24 horas após a indução da sepse, conforme recomendado para estudos pré-clínicos nos quais se avaliaram potenciais terapêuticas humanas (OSUCHOWSKI *et al.*, 2018). O bem-estar dos camundongos foi constantemente monitorado com base em achados clínicos predeterminados (GONCALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

Os animais sépticos foram aleatoriamente distribuídos em subgrupos (n = 6/subgrupo), 24 horas após a indução da sepse, para receber, por infusão em veia jugular: (1) solução salina estéril (SAL, 70µl iv); (2) EVs provenientes de  $3 \times 10^6$  MSCs derivadas da medula óssea (BM, 70µl iv); (3) EVs provenientes de  $3 \times 10^6$  MSCs derivadas de tecido adiposo (AD, 70µl iv) e (4) EVs provenientes de  $3 \times 10^6$  MSCs derivadas de tecido pulmonar (L, 70µl iv) (Figura 1). Vinte e quatro horas após o tratamento, foi realizada a eutanásia com administração de Tiopental Sódico [(*Sodium Pentothal®*, Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, EUA (20 mg/kg, ip)], para coleta posterior de pulmão, rim, fígado e sangue, com objetivo de realizar a análise histológica e avaliação do conteúdo de proteínas e RNAs mensageiros do pulmão, fígado rim e análise das escórias nitrogenadas do sangue.

**Figura 8 -** Desenho experimental

**Fonte:** O próprio autor.

**Nota:** Camundongos machos foram anestesiados e a sepse foi induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP). Animais controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico sem ligadura e perfuração cecal (SHAM). Camundongos sépticos receberam imipenem + cilastatina por via intraperitoneal (ip) 6 e 24 horas após a indução da sepse. Após 24 h, eles foram tratados com solução salina (SAL) ou EVs derivadas de  $3 \times 10^6$  MSCs provenientes da medula óssea (BM), tecido adiposo (AD) e pulmão (L), por via intravenosa. Quarenta e oito horas após a indução da sepse, os animais foram eutanasiados e o pulmão, fígado e rim removidos para análise posterior.

## 5.6 Taxa de Sobrevivência

Foram realizados estudos de sobrevivência com 50 camundongos C57BL/6 masculinos (n=10/grupo, 25-30g, 8-12 semanas de idade). Eles foram alocados inicialmente em dois grupos principais: SHAM e SEPSE, e posteriormente em 4 grupos adicionais (SAL, BM, AD e L) dentro do grupo SEPSE, como descrito

anteriormente. Os animais foram monitorados e os óbitos foram avaliados uma vez por dia, em 24 e 48 horas.

## 5.7 Histologia

### Microscopia óptica de pulmões, fígado e rim

Pulmão, rim e fígado foram extraídos dos animais para análise histológica. O brônquio fonte direito foi ocluído na capacidade residual funcional utilizando-se fio de algodão imediatamente antes da extração do pulmão. A seguir, o pulmão direito, o rim direito e o lobo direito do fígado foram removidos e mantidos em solução Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%, por volume) a - 70°C por 24 h. Após este período, o material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol, como discriminado abaixo:

- MC-1: etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20°C durante 1 h;
- MC-2: etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20°C durante 1 h;
- MC-3: etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20°C durante 1 h;
- Etanol 100%, sendo mantido a -20°C por 1 h.

Posteriormente, os órgãos foram mantidos a - 4°C por 24 h. Após a fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 4 µm de espessura. As lâminas foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina (pulmão e fígado), ou ácido periódico de Schiff (rim) e, em seguida, foram escaneadas através de um escaner Panoramic MIDI II (3DHISTECH, Budapeste Hungria). O Dano Alveolares Difuso (DAD) foi quantificado através de lâminas escaneadas, conforme descrito previamente (KISS *et al.*, 2016): dez campos de cada lâmina de tecido pulmonar (total de 1 lâmina por animal e 6 lâminas em cada grupo) foram analisados e classificados conforme a extensão (0- ausência de acometimento; 1- acometimento em < 25% da lâmina; 2- acometimento entre 25-50% da extensão; 3- acometimento entre 50-75% e 4- extensão superior a 75%) e o grau de severidade da alteração avaliada (1-leve; 2-moderado; 3-grave; 4-muito grave). No pulmão, classificamos a infiltração celular (inflamação), o espessamento

septal, o edema intersticial e colapso alveolar, que receberam notas de 0-4 conforme a presença de cada alteração e de 1-4 conforme sua gravidade (quando a alteração estava presente), e esses valores (extensão x severidade) eram multiplicados e recebiam uma nota final de 0-16. Os valores finais de cada parâmetro [infiltração celular (inflamação), espessamento septal, edema intersticial e colapso alveolar] eram então somados, totalizando o escore de dano alveolar difuso final, que variava de 0-64. A avaliação histológica hepática e renal também foi realizada utilizando-se lâminas escaneadas. Para avaliação do fígado, o escore adaptado de Dear (DEAR *et al.*, 2006) foi utilizado. O dano hepático foi quantificado a partir da análise de dez campos de cada lâmina de fígado (total de 1 lâmina por animal e 6 lâminas em cada grupo). As lâminas foram classificadas conforme a extensão da vacuolização (tumeção ou esteatose) no tecido (0- ausência de lesão; 1- lesão em < 25% da lâmina; 2- lesão entre 25-50% da extensão; 3- lesão entre 50-75% e 4- lesão com extensão superior a 75%). Além disso, a inflamação foi quantificada através da contagem de células totais infiltrando os sinusoides. A avaliação histológica renal foi feita da seguinte forma: escores desenvolvidos por um especialista (C.M.T.) foram utilizados para representar danos às células tubulares e edema intersticial. O dano às células tubulares renais foi quantificado a partir da análise de dez campos de cada lâmina (total de 1 lâmina por animal e 6 lâminas em cada grupo) de tecido renal, que foram classificados conforme a extensão do dano à borda em escova (0- ausência de lesão; 1- lesão em < 25% da lâmina; 2- lesão entre 25-50% da extensão; 3- lesão entre 50-75% e 4- lesão com extensão superior a 75%). A avaliação do edema intersticial renal foi feita através de uma análise digital com software específico (Image-Pro® Plus 6.3 for Windows®). Os escores histológicos pulmonares, hepáticos e renais foram avaliados por dois examinadores cegos (N.G.B. e J.S.D).

## **5.8 Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA)**

Uma parte do pulmão esquerdo foi extraído e congelado a - 70°C para análise da biologia molecular. Ensaios ELISA para IL-6 e TNF- $\alpha$  foram aplicados.

As análises foram feitas a partir de kits comerciais (Peprotech, Nova Jersey, Estados Unidos), sendo seguidas as recomendações do fabricante. Foram utilizadas placas de 96 poços e adicionados 100 $\mu$ L/poço do anticorpo capturador diluído em

tampão de revestimento fornecido pelo fabricante (0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 M NaCl, em pH 7,2), sendo mantidas em incubação por 12-18h hora a 4-8°C. A seguir, o conteúdo foi aspirado e os poços foram lavados uma vez (300µL/poço) com tampão de lavagem (salina tamponada PBS/0,05% de Tween 20) fornecido pelo fabricante. Após esta etapa, para bloqueio de sítios inespecíficos, a placa foi preenchida (300µL/poço) com tampão de bloqueio fornecido pelo fabricante (solução salina tamponada PBS/soro albumina bovina a 2%), sendo mantida por 1 hora a 37°C e aspirados em seguida. Posteriormente, as amostras e os padrões foram diluídos 100µL/ do tampão de bloqueio e adicionados aos poços. Após o período de incubação (1-2 horas a 37°C), procedeu-se à nova sequência de 5 lavagens (300µL/poço) com tampão de lavagem. A seguir, foram acrescentados 100µL/poço de uma solução composta pela adição do anticorpo detector no tampão de bloqueio, sendo mantida em incubação (1-2 horas a 37°C). Os poços foram lavados cinco vezes (300ml/poço) com tampão de lavagem, seguindo-se a etapa de incubação com 100µL da mistura neutravidina-peroxidase de rábano (HRP) diluída no tampão de bloqueio. Após nova etapa de cinco lavagens (300 ml/poço) com tampão de lavagem, 100µL da solução cromogênica de tetrametilbenzidina foram adicionados ao poços, que permaneceram em repouso a 37°C durante 30 minutos até alcançarem a coloração final. Em seguida, 100µL da solução de interrupção (ácido sulfúrico 0,16 M) foram adicionados ao poço. A análise espectrofotométrica foi realizada em leitora de placa no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram normalizados pela quantidade total de proteínas existente em cada amostra, quantificada pela técnica de Bradford e foram expressas em unidades arbitrárias (pg/mg).

## **5.9 Análise de PCR m tempo real (RT-PCR)**

Uma parte do rim esquerdo, além de parte do lobo esquerdo do fígado foram extraídos e congelados a - 70°C para análise da biologia molecular. O RNA total foi extraído de tecidos congelados através do RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi medida por espectrofotometria em Nanodrop ND- 1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, EUA). A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA total, pelo kit de transcrição reversa Quantitec (Qiagen, Hilden, Alemanha). Níveis

relativos de RNAm foram medidos com o sistema de detecção verde SYBR, utilizando o equipamento ABI 7500 real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). Todas as amostras foram medidas em triplicata. 36B4 (fosfoproteína ribossomal ácida P0) foi usado como gene de referência. Para o cálculo do nível de expressão de cada gene alvo, utilizou-se o método 2-delta delta Ct para a quantificação relativa, onde Ct (threshold cycle) é o ciclo da PCR em tempo real, no qual a amplificação atinge a fase logarítmica, onde delta Ct é a diferença de expressão entre gene alvo e controle endógeno de uma determinada amostra e delta delta Ct corresponde à diferença entre o delta Ct da amostra e o delta Ct do controle.

Os marcadores biológicos analisados foram IL-18 e Molécula de Injúria Renal-1 (KIM-1) no tecido renal e IL-6, IL-10 e Proteína de morte celular programada-1 (PD-1) no tecido hepático. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2 - Primers (PCR)**

Gene	Forward	Reverse
IL-18	5'-ACA GTG AAG TCG GCC AAA GT-3'	5'-TCT TGG CCC AGG AAC AAT GG-3'
IL-6	5'-TCT CTG GGA AAT CGT GGA A-3'	5'-TCT GCA AGT GCA TCA TCG T-3'
IL-10	5'-ATC CAA GAC AAC ACT ACT ATA-3'	5'-TAA ATA TCC TCA AAG TCC C-3'
KIM-1	5'-GCT AGC ATG CAT CCT CAA GTG GTC-3'	5'-CTC GAG TTA GTC CGT GGC ATA AAG-3'
PD-1	5'-CGT CCC TCA GTC AAG AGG AG-3'	5'-GTC CTT AGA AGT GCC CAA CA-3'
KIM-1	5'-GCT GCT ACT GCT CCT TGT GA-3'	5'-GGA AGG CAA CCA CGC TTA GA-3'
36B4	5'-AAC CCA GTT CTG GAG AAA C-3'	5'-GTT CTG AGC TCC CAC AGT GA-3'

**Legenda:** IL, interleucina; PD-1, Proteína de morte celular programada-1 1; KIM-1, Molécula de Injúria Renal-1; 36B4, fosfoproteína ribossomal ácida P0.

## 5.10 Análise Estatística

O grupo SHAM foi comparado aos animais do grupo SEPSE pelo teste t com correção de Bonferroni para 4 comparações ( $p < 0,0125$ ). Os animais do grupo SEPSE foram comparados por Oneway ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm–Šidák para dados paramétricos. As curvas de sobrevivência foram construídas a partir do método de Kaplan–Meier e comparadas por Log-Rank. A significância estatística foi fixada em  $p$  valor  $< 0,05$ . As análises foram feitas com o

GraphPad Prism 8 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, EUA).

De acordo com análise de potência para identificar o número de animais por grupo, utilizou-se o programa G\*Power 3.1.9.2 (University of Düsseldorf, Germany). O tamanho da amostra foi calculado baseado num estudo prévio de nosso laboratório que avaliou DAD após a indução do CLP. De acordo, ajustando a probabilidade de erro  $\alpha$  em 5%, e a potência ( $1 - \text{erro b}$ ) de 80%, nós obtemos um tamanho de amostra de 6 animais. Este número de animais providenciará uma potência adequada ( $1 - \beta = 0.80$ ) para identificar diferenças significativas ( $\alpha = 0,05$ ) no número de células, considerando: um effect size  $d = 1,98$ , um 2-sided test, e uma razão entre as amostras de = 1.

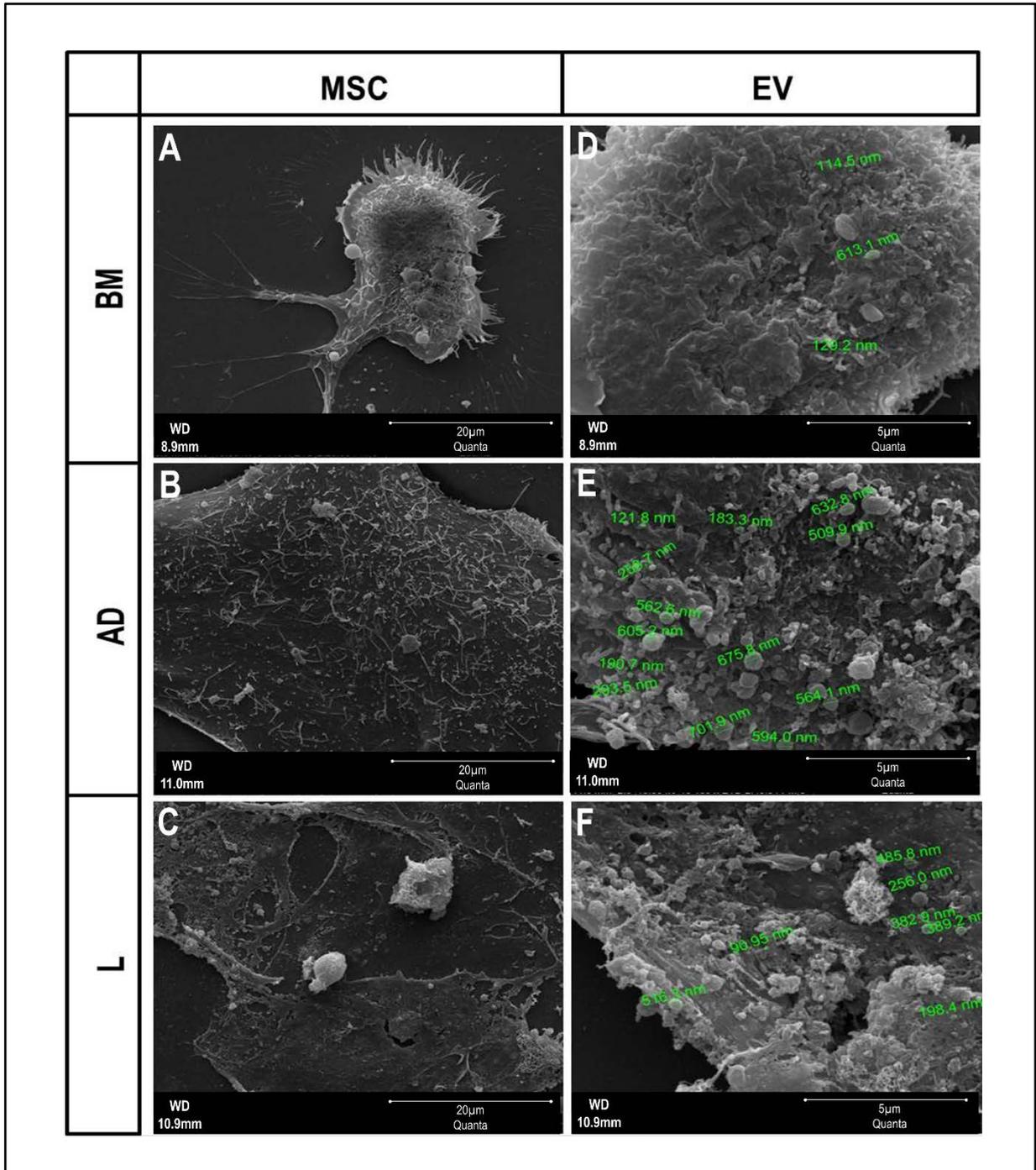
## 6 RESULTADOS

---

### 6.1 Caracterização de EVs

O perfil ultraestrutural exibido por microscopia eletrônica de varredura de MSCs e EVs derivados das três fontes de MSC pode ser encontrado na Figura 8. O método nanosight de rastreamento de nanopartículas evidenciou duas populações de vesículas extracelulares obtidas das três fontes de MSCs, uma de menor intensidade e tamanho (classificada pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares como pequenas EVs), e outra com maior intensidade e tamanho (classificada como EVs médias/grandes) (THERY *et al.*, 2018). Em relação ao tamanho molecular médio, as BM-EVs apresentaram um tamanho menor (153,0 +/- 2,1 nm) quando comparados aos AD-EVs (176,0 +/- 3,6 nm) e L-EVs, que foram os maiores (198,5 +/- 3,1 nm). Concentrações semelhantes de EVs foram observadas após ultracentrifugação dos sobrenadantes obtidos da medula óssea ( $1,1 \times 10^9 + 5,7 \times 10^7$  partículas/ml), tecido adiposo ( $1,03 \times 10^9 + 1,05 \times 10^8$  partículas/ml) e tecido pulmonar ( $1,1 \times 10^9 + 4,82 \times 10^7$  partículas/ml) derivadas de MSCs (Figura 9).

**Figura 9 -** Caracterização das Evs

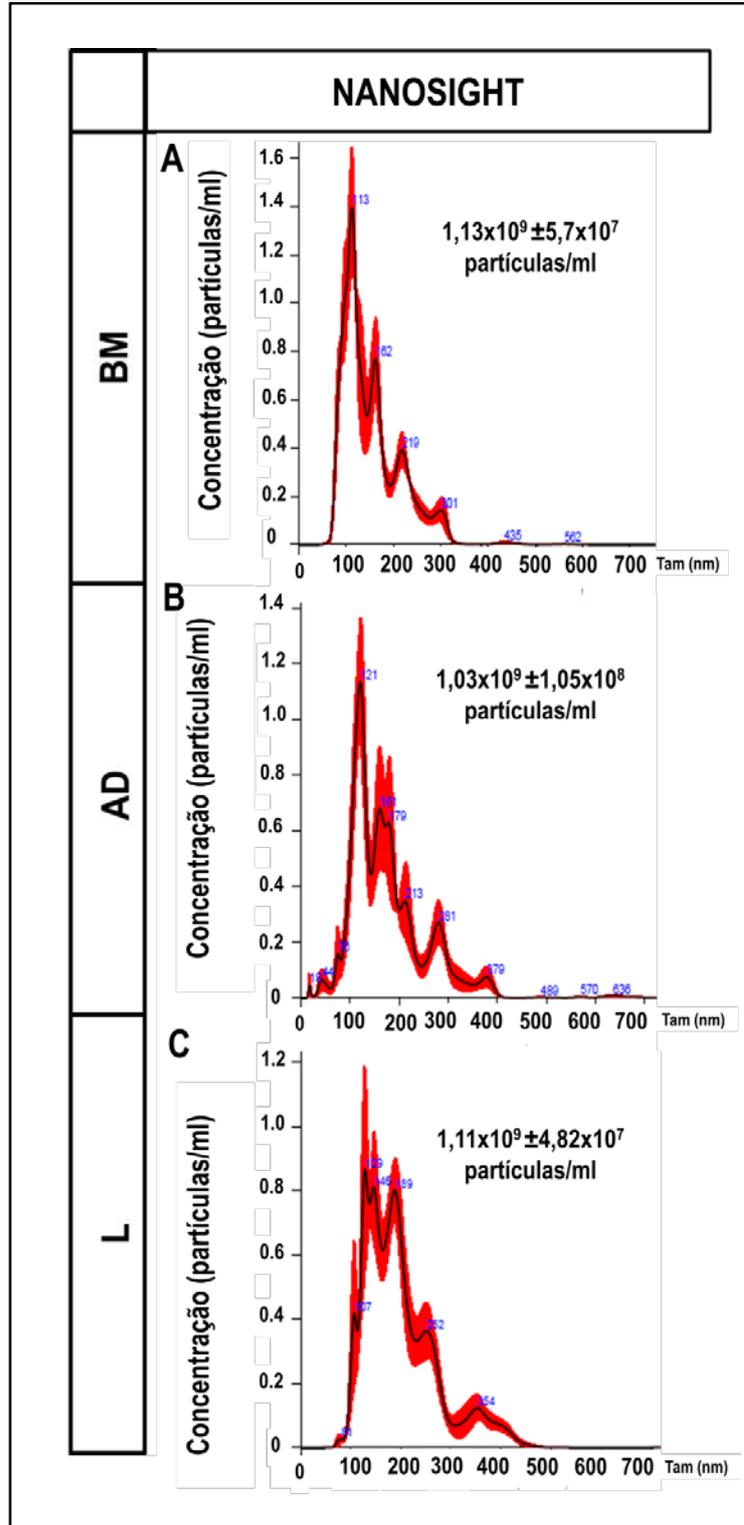


**Fonte:** O próprio autor.

**Legenda:** EVs: Vesículas extracelulares; MSCs: células mesenquimais estromais; BM: medula óssea; AD: Tecido adiposo; L: pulmão

**Nota:** A, B e C –Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de MSCs derivadas de BM (A), AD (B) e L (C) 12 horas após a privação de soro, apresentando vesículas extracelulares na superfície celular. A barra de escala equivale a 20µm. **D, E e F**- Maior ampliação das imagens A, B e C mostrando as vesículas extracelulares. A barra de escala equivale a 5µm.

**Figura 10** - Concentração e tamanho das vesículas extracelulares obtidas pela técnica de nanosight



**Fonte:** O próprio autor.

**Legenda:** BM: medula óssea; AD: Tecido adiposo; L: pulmão.

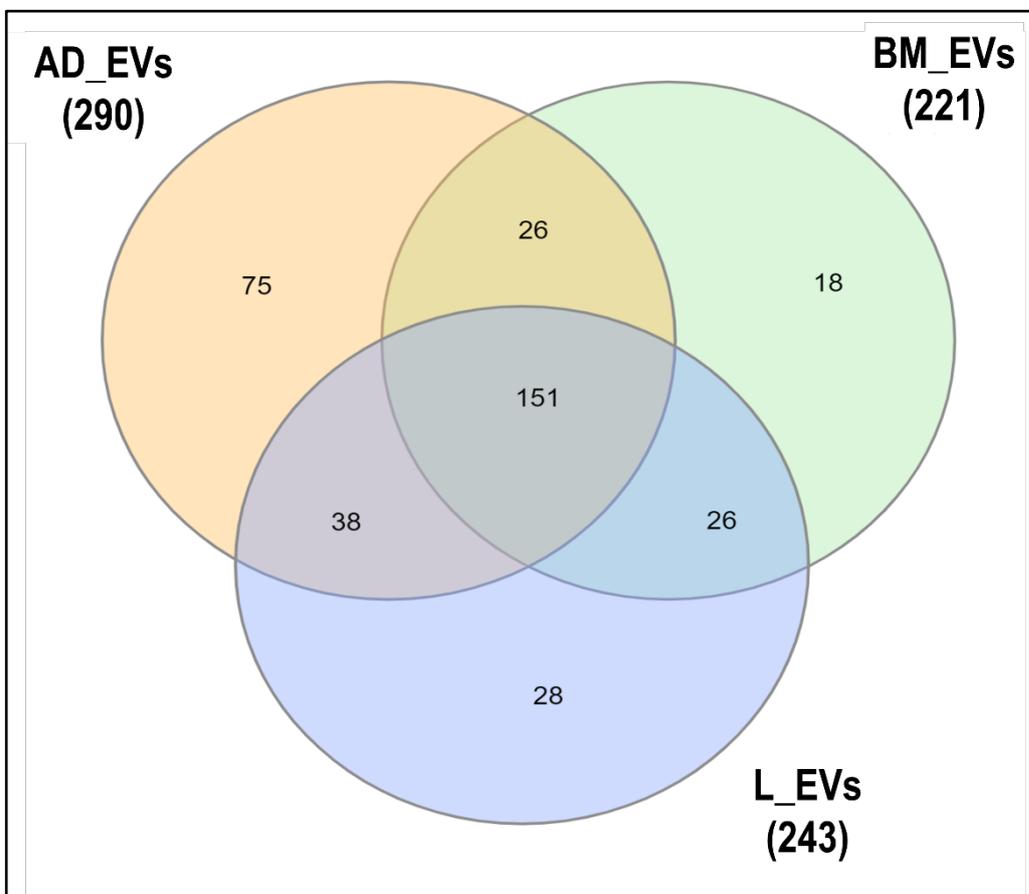
Nota: Gráficos representativos obtidos pela técnica Nanosight mostrando a concentração média das vesículas extracelulares (eixo Y) obtidas a partir de  $3 \times 10^6$  MSCs derivadas de BM (A), AD (B) e L (C). No eixo X, encontra-se representado o tamanho médio das vesículas encontradas nas amostras analisadas.

## 6.2 Proteômica

### 6.2.1 TEOR DE PROTEÍNAS

Em relação a todos os dados encontrados, um total de 362 proteínas (Figura 11) foram isoladas em triplicatas de EVs derivadas de medula óssea, tecido adiposo e pulmão.

**Figura 11** - Diagrama de Venn



**Fonte:** o próprio autor.

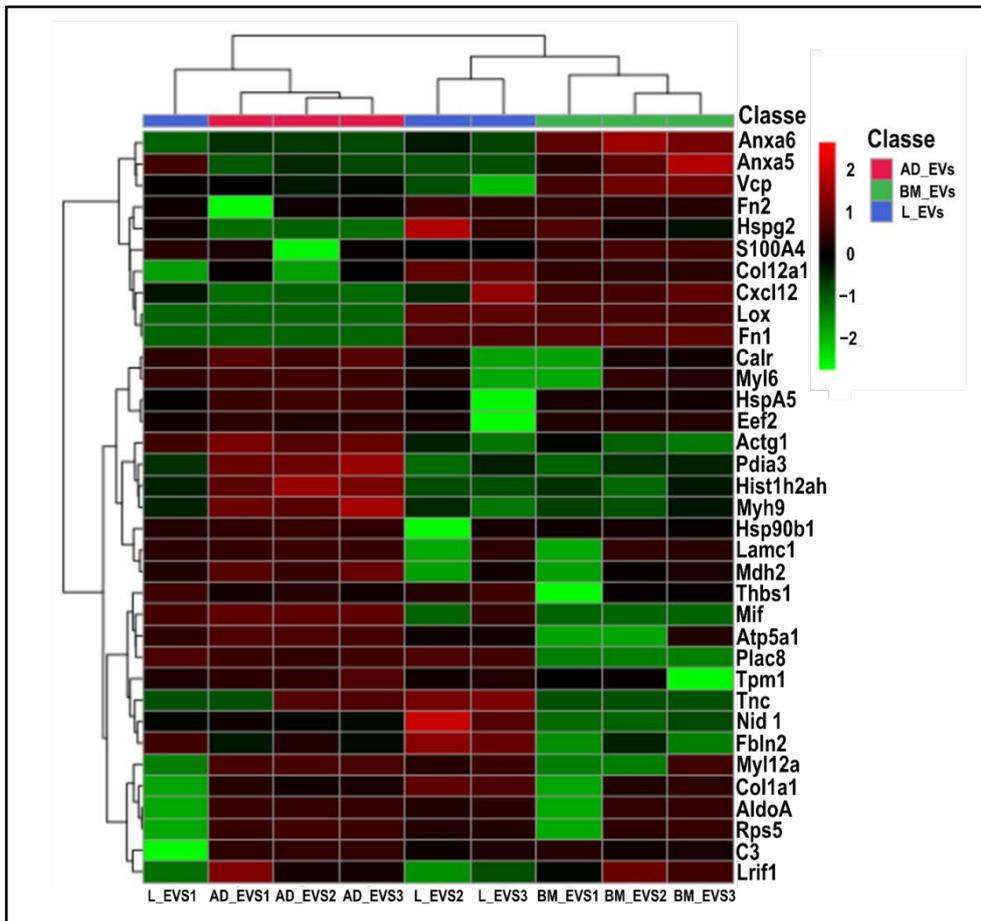
**Legenda:** EVs: vesículas extracelulares; MSCs: células mesenquimais estromais; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão.

**Nota:** Representação do número total de proteínas comuns e “exclusivas” identificadas nas vesículas extracelulares derivadas de BM-, AD- e L-MSCs.

Apesar disso, somente 44 proteínas foram consideradas estatisticamente abundantes (ANOVA,  $p$  valor  $<0,05$ ) e 9 delas foram classificadas como potenciais contaminantes. Assim, as 35 proteínas significativas restantes apresentaram concentrações diferentes ao compararmos as três fontes, como foi visualizado no

mapa de calor construído (Figura 12). Não foi identificada nenhuma proteína significativa exclusiva de uma única fonte de vesículas extracelulares.

**Figura 12 - Mapa de calor**



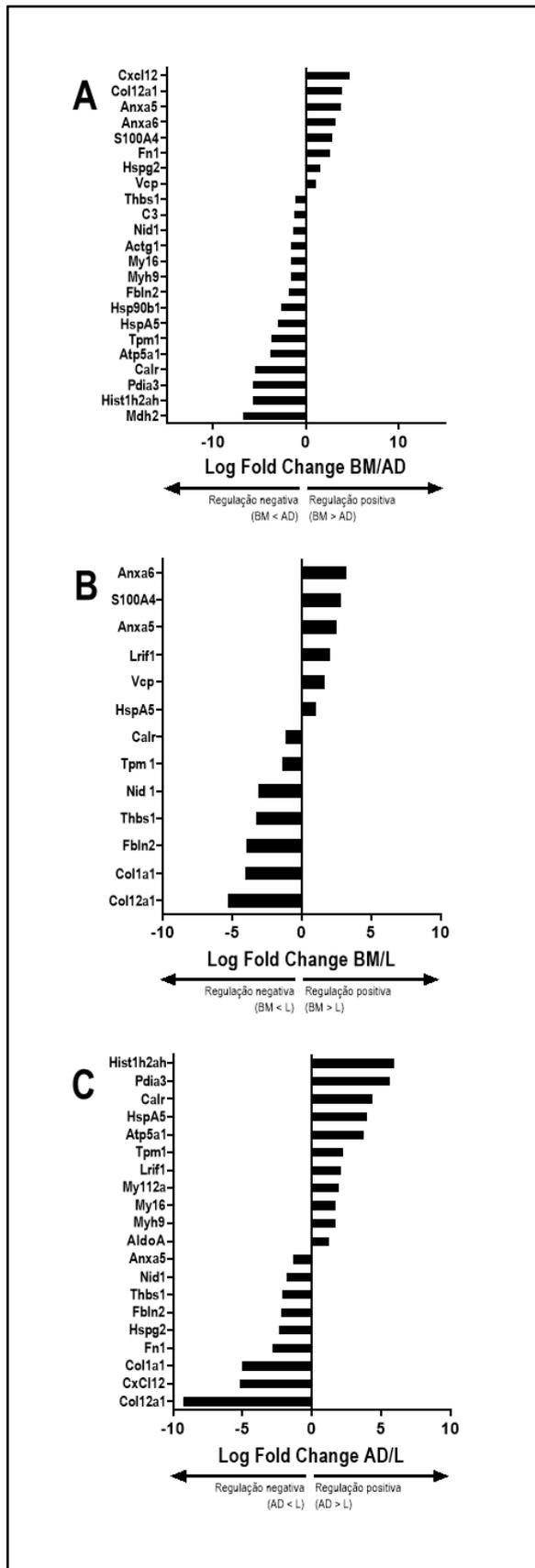
**Fonte:** o próprio autor.

**Legenda:** EVs: vesículas extracelulares; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão; Anxa6: anexina A6; Anxa5: anexina A5; Vcp: ATPase do retículo endoplasmático transicional; Fn2: Isoforma 2 da fibronectina; Hspg2: núcleo de proteoglicano de heparan sulfato específico da membrana basal; S100A4: proteína de ligação de cálcio S100 A4; Col12a1: cadeia alfa 1 (XII) de colágeno; Cxcl12: fator 1 derivado de células estromais; Lox: proteína lisina 6 oxidase; Fn1: isoforma 1 da fibronetina; Calr: calreticulina; Myl6: polipeptídeo leve de miosina 6; HspA5: proteína de choque térmico de 78kDa regulada por glicose; Eef2: fator de alongamento eucariótico 2; Actg1: actina citoplasmática 2; Pdia3: proteína dissulfeto-isomerase A3; Hist1h2ah: histona H2A tipo 1-H; Myh9: miosina 9; Hsp90b1: endoplasmina; Lamc1: subunidade gama 1 da laminina; Mdh2: malato desidrogenase 2; Thbs1: trombospondina 1; Mif: fator inibidor da migração de macrófagos; Atp5a1: subunidade alfa mitocondrial de ATP sintase; Plac8: placenta específica 8; Tpm1: cadeia alfa-1 da tropomiosina; Tnc: tenascina; Nid1: nidogênio-1; Fbln2: fibulina 2; Myl12a: cadeia leve reguladora da miosina 12A; Col1a1: cadeia de colágeno alfa-1; AldoA: frutose-Bifosfato Aldolase A; Rps5: proteína ribossômica S5; C3: complemento C3 e Lrif1: fator de interação com o receptor nuclear dependente de ligante 1.

**Nota:** Mapa de calor dos coeficientes de correlação de Pearson derivados da comparação de triplicatas de EVs provenientes de MSCs da medula óssea (BM\_EVs), tecido adiposo (AD\_EVs) e pulmão (L\_EVs). Os valores referentes à intensidade do conjunto de proteínas (Log2 LFC) após a aplicação do filtro reverso foram usados para calcular o coeficiente de correlação através do software Perseus, e o mapa de calor foi construído utilizando a linguagem R com a função Heatmap3. O dendrograma foi estruturado utilizando-se distância Euclidiana com ligações completas.

Também foi realizada uma comparação de pares no que diz respeito à concentração de proteínas nas EVs derivadas de cada fonte (BM / AD, BM / L e AD / L) (Figura 13). Observamos que a anexina A5 (Anxa5), a proteína de ligação de cálcio S100 A4 (S100A4) e a ATPase do retículo endoplasmático transicional (Vcp) foram reguladas positivamente em EVs da medula óssea em comparação com outras fontes, enquanto a calreticulina (Calr), a cadeia alfa1 da tropomiosina (Tpm1), o nidogênio 1 (Nid 1), a trombospondina 1 (Thbs1) e a fibulina 2 (Fbln2) foram regulados negativamente. Com relação às EVs derivadas de AD, a histona H2A tipo 1-H (Hist1h2ah), a proteína dissulfeto-isomerase A3 (Pdia3), a calreticulina (Calr), a *proteína de choque térmico* de 78kDa regulada por glicose (HspA5), a subunidade alfa mitocondrial de ATP sintase (Atp5a1), a tropomiosina alfa 1 (Tpm1), o polipeptídeo leve de miosina 6 (Myf6) e a miosina-9 (Myh9) foram regulados positivamente, enquanto a anexina A5 (Anxa5), o fator 1 derivado de células estromais (Cxcl12), a cadeia alfa 1 (XII) de colágeno (Col12a1), a fibronectina (Fn1) e o núcleo de proteoglicano de heparan sulfato específico da membrana basal (Hspg2) foram regulados negativamente em comparação com EVs derivadas de BM e L. Vesículas extracelulares liberadas por células mesenquimais derivadas de pulmão expressaram menos trombospondina 1 (Thbs1), fibulina 2 (Fbln2), colágeno alfa 1 (Col1a1) e cadeia de colágeno alfa 1 (XII) (Col12a1) quando comparados àquelas liberadas por células mesenquimais derivadas da medula óssea e do tecido pulmonar. Os nomes de todas as proteínas identificadas com significância estatística nas EVs podem ser encontrados na Tabela 3.

**Figura 13** - Gráficos representam comparações pareadas da concentração de proteínas presentes nas vesículas extracelulares provenientes de diferentes fontes (BM/AD, BM/L e AD/L)



**Fonte:** o próprio autor.

**Legenda:** BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão; Anxa6: anexina A6; Anxa5: anexina A5; Vcp: ATPase do retículo endoplasmático transicional; Fn2: Isoforma 2 da fibronectina; Hspg2: núcleo de proteoglicano de heparan sulfato específico da membrana basal; S100A4: proteína de ligação de cálcio S100 A4; Col12a1: cadeia alfa 1 (XII) de colágeno; Cxcl12: fator 1 derivado de células estromais; Lox: proteína lisina 6 oxidase; Fn1: isoforma 1 da fibronectina; Carl: calreticulina; Myl6: polipeptídeo leve de miosina 6; HspA5: proteína de choque térmico 78kDa regulada por glicose; Eef2: fator de alongamento eucariótico 2; Actg1: actina citoplasmática 2; Pdia3: proteína dissulfeto-isomerase A3; Hist1h2ah: histona H2A tipo 1-H; Myh9: miosina 9; Hsp90b1: endoplasmina; Lamc1: subunidade gama 1 da laminina; Mdh2: malato desidrogenase 2; Thbs1: trombospondina 1; Mif: fator inibidor da migração de macrófagos; Atp5a1: subunidade alfa mitocondrial de ATP sintase; Plac8: placenta específica 8; Tpm1: cadeia alfa-1 da tropomiosina; Tnc: tenascina; Nid1: nidogênio-1; Fbln2: fibulina 2; Myl12a: cadeia leve reguladora da miosina 12A; Col1a1: cadeia de colágeno alfa-1; AldoA: frutose-Bifosfato Aldolase A; Rps5: proteína ribossômica S5 C3: complemento C3 e Lrif1: fator de interação com o receptor nuclear dependente de ligante 1.

**Nota:** **A-BM/AD:** O gráfico representa regulação positiva e negativa comparando as proteínas dos grupos BM e AD ( $p < 0,05$ ). **B - BM/L:** O gráfico representa regulação positiva e negativa comparando as proteínas dos grupos BM e L ( $p < 0,05$ ). **C- AD/L:** O gráfico representa regulação positiva e negativa comparando as proteínas dos grupos AD e L ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3** - Lista de proteínas identificadas nas vesículas extracelulares com intensidade significativa ( $p < 0,05$ )

Sigla	Nome da proteína
Actg1	Actina citoplasmática 2
AldoA	frutose-bifosfato Aldolase A
Anxa5	anexina A5
Anxa6	anexina A6
Atp5a1	subunidade alfa mitocondrial de ATP sintase
C3	complemento C3
Calr	calreticulina
Col12a1	cadeia alfa 1 (XII) do colágeno
Col1a1	cadeia alfa 1 do colágeno
Cxcl12	fator 1 derivado de células estromais
Eef2	fator de alongamento eucariótico 2
Fbln2	fibulina 2
Fn1	isoforma 1 da fibronectina
Fn2	isoforma 2 da fibronectina
Hist1h2ah	histona H2A tipo 1H
Hsp90b1	endoplasmína
HspA5	proteína de choque térmico de 78kDa regulada por glicose
Hspg2	núcleo de proteoglicano de heparan sulfato específico da membrana basal
Lamc1	Subunidade gama 1 da laminina
Lox	Proteína lisina 6 oxidase
Lrif1	fator de interação com o receptor nuclear dependente de ligante 1
Mdh2	Malato desidrogenase 2
Mif	fator inibidor da migração de macrófagos
Myh9	miosina 9
Myl12a	cadeia leve reguladora da miosina 12A
Myl6	Polipeptídeo leve de miosina 6
Nid 1	nidogênio 1
Pdia3	Proteína dissulfeto-isomerase A3
Plac8	placenta específica 8
Rps5	proteína ribossômica S5
S100A4	proteína de ligação de cálcio S100 A4
Thbs1	trombospondina 1
Tnc	tenascina
Tpm1	cadeia alfa-1 da tropomiosina
Vcp	ATPase do retículo endoplasmático transicional

**Nota:** Na tabela, visualizam-se a sigla e o nome completo correspondentes às proteínas identificadas

### 6.2.2 REGULAÇÃO POSITIVA E NEGATIVA DE VIAS METABÓLICAS

Com base no pool de proteínas com expressão aumentada ou diminuída em cada grupo, foi realizada a análise das vias metabólicas enriquecidas através do WikiPathways. As vias relacionadas ao pool de proteínas predominantes em cada fonte de vesículas foram descritas (Tabela 4).

**Tabela 4 -** Vias metabólicas (WikiPathways): Análise comparativa das vias metabólicas relacionadas ao conteúdo proteômico das vesículas extracelulares ( $p < 0,05$ ) (continua)

Fonte	Regulação	Via metabólica	<i>P</i> valor	<i>P</i> valor ajustado	Odds Ratio	Escore combinado	Genes
BM/ADxL	Positiva	Via de sinalização da IL-9 WP10	0,003596	0,004642964	434,2174	2443,769793	VCP
BM/ADxL	Positiva	Síntese e regulação de prostaglandinas WP374	0,004643	0,004642964	332,7833	1787,845974	ANXA5
BM/ADxL	Negativa	Via de resposta inflamatória WP458	0,007478	0,029119416	172,1207	842,6622961	THBS1
BM/ADxL	Negativa	Contração de músculo estriado WP216	0,0112	0,029119416	113,358	509,1809645	TPM1
BM/ADxL	Negativa	Via de sinalização do TGF- $\beta$ WP113	0,012934	0,029119416	97,76471	425,0726939	THBS1
BM/ADxL	Negativa	Via de sinalização do p53 WP2902	0,01664	0,029119416	75,48864	309,1988807	THBS1
BM/ADxL	Negativa	Regulação do cálcio no miócito WP553	0,036217	0,050703935	33,98801	112,7798428	CALR
BM/ADxL	Negativa	Adesão focal WP85	0,045406	0,052974231	26,91712	83,23043532	THBS1
BM/ADxL	Negativa	Adesão focal-PI3K-Akt-mTOR WP2841	0,078425	0,078425076	15,22601	38,7594974	THBS1
AD/BMxL	Positiva	Contração de músculo estriado WP216	0,022278	0,07086001	50,36869	191,6095305	TPM1
AD/BMxL	Positiva	Glicólise e gliconeogênese WP157	0,025215	0,07086001	44,31111	163,0792417	ALDOA
AD/BMxL	Positiva	Fosforilação oxidativa WP1248	0,030578	0,07086001	36,30055	126,5975833	ATP5A1
AD/BMxL	Positiva	Glomeruloesclerose segmentar e focal primária WP2573	0,03543	0,07086001	31,17214	104,1210777	MYH9
AD/BMxL	Positiva	Regulação do cálcio no miócito WP553	0,071131	0,087693392	15,10198	39,91798491	CALR
AD/BMxL	Positiva	Via de sinalização da MAPKinase WP493	0,076732	0,087693392	13,94655	35,80694267	HSPA5
AD/BMxL	Positiva	Adesão focal WP85	0,088762	0,088761986	11,96014	28,96504081	MYL6
AD/BMxL	Negativa	Via de resposta inflamatória WP458	0,007478	0,023180083	172,1207	842,6622961	FN1

**Tabela 4** - Vias metabólicas (WikiPathways): Análise comparativa das vias metabólicas relacionadas ao conteúdo proteômico das vesículas extracelulares ( $p < 0,05$ ) (conclusão)

Fonte	Regulação	Via metabólica	<i>P</i> valor	<i>P</i> valor ajustado	Odds Ratio	Escore combinado	Genes
AD/BMxL	Negativa	Síntese e regulação de prostaglandinas WP374	0,007727	0,023180083	166,375	809,0939625	ANXA5
AD/BMxL	Negativa	Regulação do citoesqueleto de actina WP523	0,03743	0,055932453	32,8543	107,9354587	FN1
AD/BMxL	Negativa	Adesão focal WP85	0,045406	0,055932453	26,91712	83,23043532	FN1
AD/BMxL	Negativa	Via de sinalização de citocinas WP2292	0,04661	0,055932453	26,19841	80,32255388	CXCL12
AD/BMxL	Negativa	Adesão focal-PI3K-Akt-mTOR WP2841	0,078425	0,078425076	15,22601	38,7594974	FN1
L/BMxAD	Positiva	Via de resposta inflamatória WP458	2,17E-05	1,52E-04	475,4048	5105,230681	COL1A1; THBS1
L/BMxAD	Positiva	Adesão focal WP85	8,36E-04	0,002924434	72,17486	511,5333734	COL1A1; THBS1
L/BMxAD	Positiva	Ativação de osteoblastos WP238	0,002498	0,004432993	555,1667	3326,770642	COL1A1
L/BMxAD	Positiva	Adesão focal-PI3K-Akt-mTOR WP2841	0,002533	0,004432993	40,73085	243,5010775	COL1A1; THBS1
L/BMxAD	Positiva	Desregulação de miRNA na sinalização de insulina/PI3K-AKT WP3855	0,006484	0,009077165	199,7	1006,181577	COL1A1
L/BMxAD	Positiva	Via de sinalização do TGF- $\beta$ WP113	0,012934	0,015089367	97,76471	425,0726939	THBS1
L/BMxAD	Positiva	Via de sinalização do p53 WP2902	0,01664	0,016639666	75,48864	309,1988807	THBS1

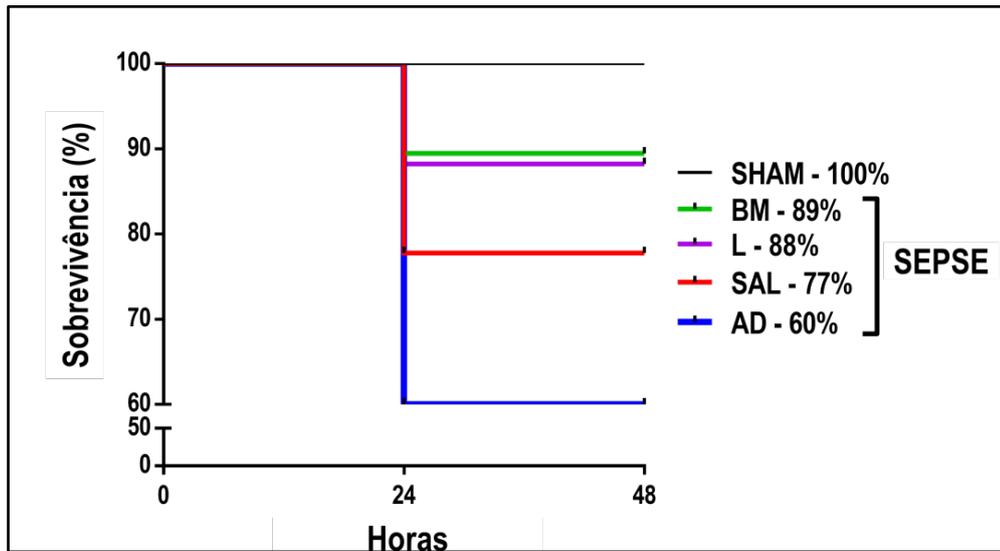
**Legenda:** AD: tecido adiposo; BM: medulla óssea; L: pulmão; IL: interleucina; TGF: Fator de transformação do crescimento; VCP: ATPase do retículo endoplasmático transicional, ANXA: Anexina 5; THBS1: trombospondina 1; TPM1: , CARL: ; ALDOA: ; ATP5A1: cadeia alfa-1 da tropomiosina; MYH9: miosina 9; HSPA5: proteína de choque térmico de 78kDa regulada por glicose; MYL6: polipeptídeo leve de miosina 6; FN1: isoforma 1 da fibronectina; COL1A1: cadeia alfa 1 do colágeno

Vesículas liberadas por MSCs da medula óssea parecem estar associadas à ativação da sinalização IL-9, através da ATPase do retículo endoplasmático transicional (Vcp), bem como à síntese e regulação de prostaglandinas, através da Anexina A5 (Anxa5). Elas também parecem estar ligadas à regulação negativa da resposta inflamatória, da sinalização via TGF $\beta$  e P53 e das vias de adesão focal, através da ação da trombospondina 1 (Thbs1).

Em relação às EVs provenientes do tecido adiposo, vale mencionar o provável aumento da atividade da via de fosforilação oxidativa e das vias de transporte de elétrons, através subunidade alfa mitocondrial sintase (Atp5a1) e também a redução da atividade das vias de resposta inflamatória, regulação do citoesqueleto (actina) e de adesão focal, que estão, neste caso, relacionados à fibronectina (Fn1). Observa-se também redução da atividade das vias da prostaglandina mediadas por Anexina A5 (Anxa5).

### **6.3 Taxa de Sobrevida**

O Grupo AD foi associado a uma tendência ( $p=0,107$ ) de menor sobrevida (60%) em comparação ao grupo BM (89%), L (88%) e até mesmo ao SAL (77%) , 48 horas após a indução da sepse. O grupo SHAM apresentou 100% da taxa de sobrevivência. (Figura 14)

**Figura 14 - Taxa de sobrevivência em 48 horas**

**Fonte:** o próprio autor.

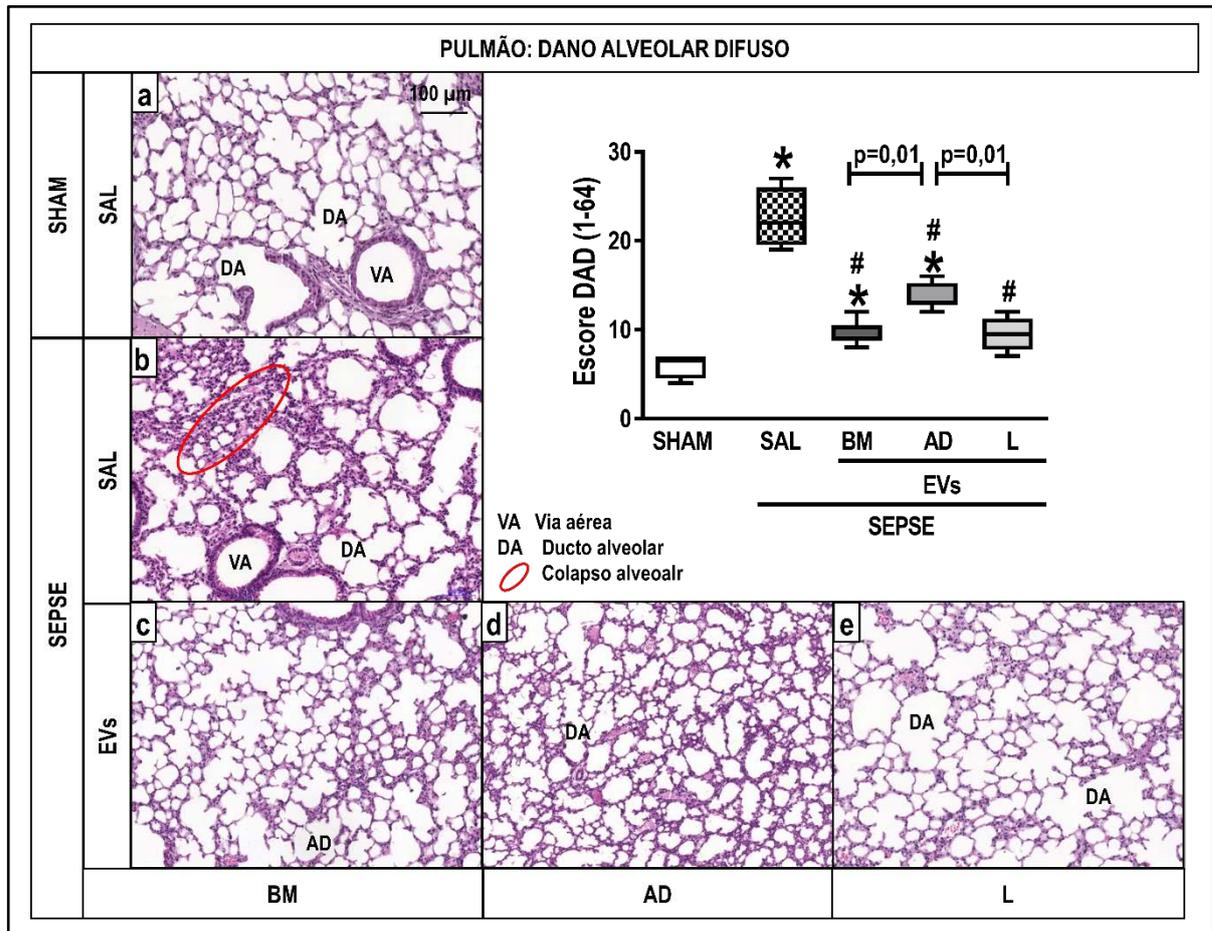
**Legenda:** EVs: vesículas extracelulares; SAL: salina; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão.

**Nota:** As curvas de sobrevivência foram desenhadas a partir do método de Kaplan-Meier e comparadas através de regressão logística. Os óbitos foram registrados em 24 e 48 horas após a administração de salina (grupo SAL) ou das vesículas extracelulares (grupos BM, AD e L). Animais do grupo SHAM (curva preta) apresentaram 100% de taxa de sobrevivência, enquanto os do grupo BM (curva verde) 89%, L (curva roxa) 88%, SAL (curva vermelha) 77% e AD (curva azul) 60%, com  $p$  valor = 0,10. Um total de 50 animais foram utilizados para o ensaio da mortalidade.

#### 6.4 Histologia pulmonar e biologia molecular

Os resultados foram organizados na forma de gráfico de caixa, com mediana e intervalo interquartil [mediana (intervalo interquartil 25-75%)]. A pontuação acumulada no escore DAD foi maior no grupo SAL [22 (19,5-26)] que no grupo SHAM [6,5 (5,5-7)] ( $p < 0,0125$ ). Todas as fontes de EVs foram capazes de reduzir a pontuação no escore DAD, mas aquelas derivadas do tecido adiposo (grupo AD) apresentaram o pior desempenho [13 (12,75-15,25)] em comparação com SAL (Figura 15). BM e L apresentaram desempenho semelhante: [9 (8,75-10,5)] e [9,5 (7,75 e 11,25)], respectivamente.

**Figura 15 - Dano alveolar difuso (DAD)**

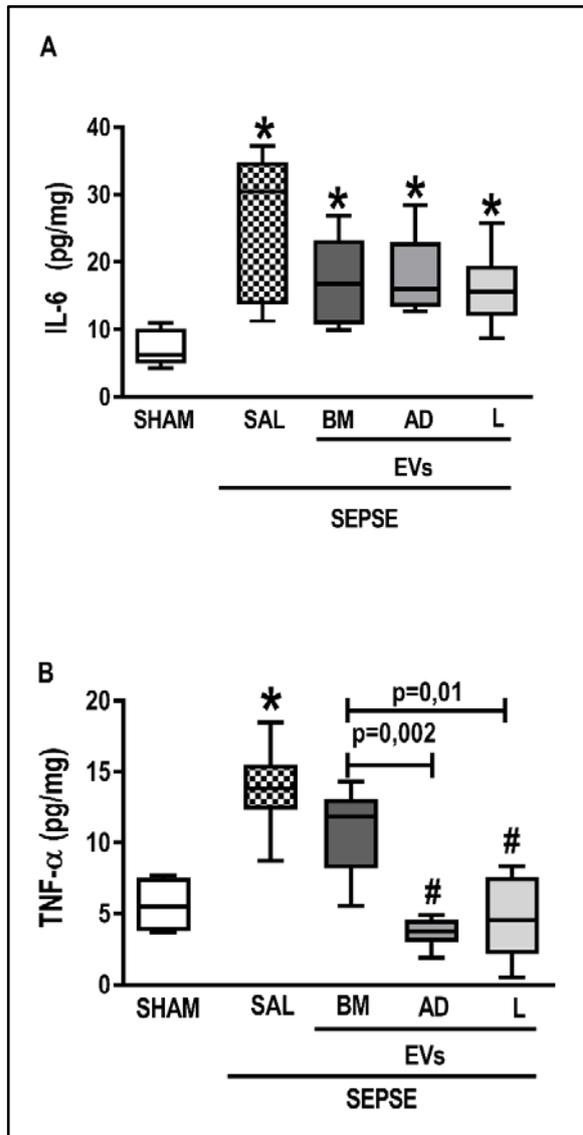


**Fonte:** o próprio autor.

**Legendas:** EVs: vesículas extracelulares; SAL: salina; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão; VA: via aérea; DA: ducto alveolar; HE: hematoxilina e eosina.

**Nota:** Gráfico de caixa (do inglês, box plot) e figuras representativas das lâminas de tecido pulmonar coradas com hematoxilina e eosina (HE), referentes aos grupos: (a) SHAM, (a) SAL, (c) BM, (d) AD e (e) L. \* Significativamente diferente de SHAM (p valor ajustado <0,0125). # Significativamente diferente de SAL (p valor <0,05). O grupo SHAM foi comparado aos animais do grupo SEPSSE pelo teste t com correção de Bonferroni para 4 comparações (p <0,0125). One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Šidák foi usado para comparar os grupos SEPSSE (SAL, BM, AD e L). Utilizou-se um n=6/grupo. A linha dentro da caixa representa a mediana, as extremidades da caixa representam o intervalo interquartil (25 e 75%) e as hastes, os valores máximo e mínimo. As barras representam 100 µm. Os contornos vermelhos representam a área de colapso alveolar.

Os níveis de IL-6 foram mais elevados no grupo SAL [30,40 (13,72-34,83)] em comparação com SHAM [6,14 (4,93-10,15)] (p<0,0125), porém não diminuiu com nenhum tipo de terapia. Os níveis de TNF-α foram mais elevados no grupo SAL [13,85 (12,31-15,5)] em comparação com SHAM [5,50 (3,77 – 7,53)] (p<0,0125) e encontraram-se depletados nos grupos BM [11,8 (8,17 – 13,07)], AD [3,74 (2,98-4,58)] e L [4,52 (2,19-7,60)] em comparação com SAL. (Figura 16).

**Figura 16 - Citocinas no parênquima pulmonar**

**Fonte:** o próprio autor.

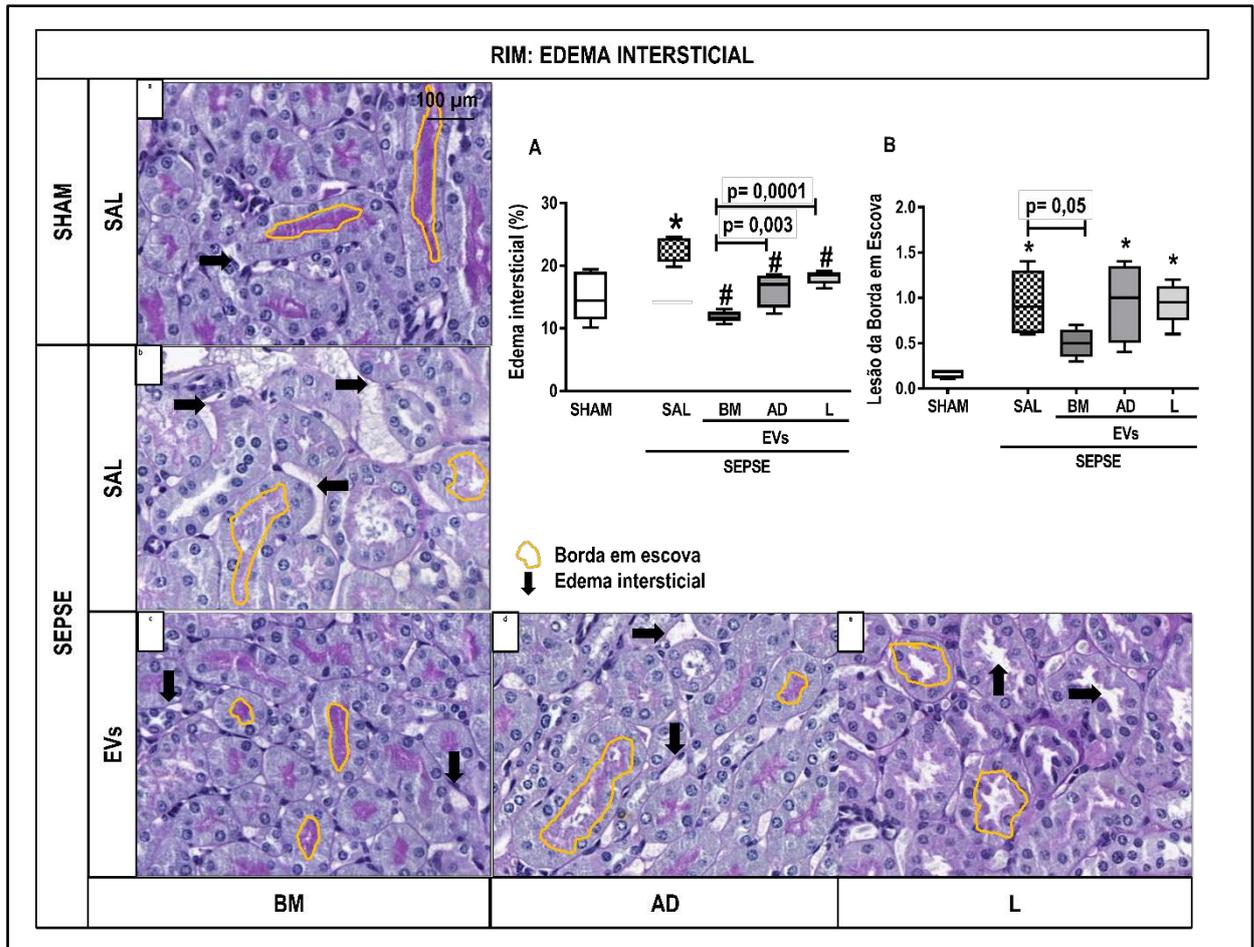
**Legenda:** EVs: vesículas extracelulares; SAL: salina; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão; TNF: fator de necrose tumoral; IL: interleucina.

**Nota:** Gráfico de caixa (do inglês, box plot) (A) Níveis de fator de necrose tumoral (TNF) - $\alpha$  quantificados por ELISA: \* Significativamente diferente de SHAM (p valor ajustado <0,0125). # Significativamente diferente de SAL (valor de p <0,002). (B) Níveis de interleucina (IL) -6 quantificados por ELISA: \* Significativamente diferente de SHAM (p valor <0,0125). O grupo SHAM foi comparado aos animais do grupo SEPSE pelo teste t com correção de Bonferroni para 4 comparações (p <0,0125). One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Šidák foi usado para comparar os grupos SEPSE (SAL, BM, AD e L). Utilizou-se um n=6/grupo. A linha dentro da caixa representa a mediana, as extremidades da caixa representam o intervalo interquartil (25 e 75%) e as hastes, os valores máximo e mínimo.

## 6.5 Histologia renal e biologia molecular

Os resultados foram organizados na forma de gráfico de caixa, com mediana e intervalo interquartil [mediana (intervalo interquartil 25-75%)]. O grupo SAL [24,22 (20,62 - 24,42)] desenvolveu edema intersticial em comparação ao SHAM [14,38 (11,44-14,38)], com valor de  $p < 0,0125$ , e as três fontes de EVs foram benéficas na melhoria dessa alteração em comparação ao grupo SAL, com destaque para o grupo BM [16,99 (13,28-18,43)]. O grupo SAL [0,99 (0,61-1,30)] evoluiu com lesão da borda em escova em comparação ao grupo SHAM [0,12 (0,11-0,20)], com melhora somente no grupo BM [0,50 (0,35-0,65)] (Figura 17).

**Figura 17 - Edema intersticial e destruição da borda em escova**



**Fonte:** o próprio autor.

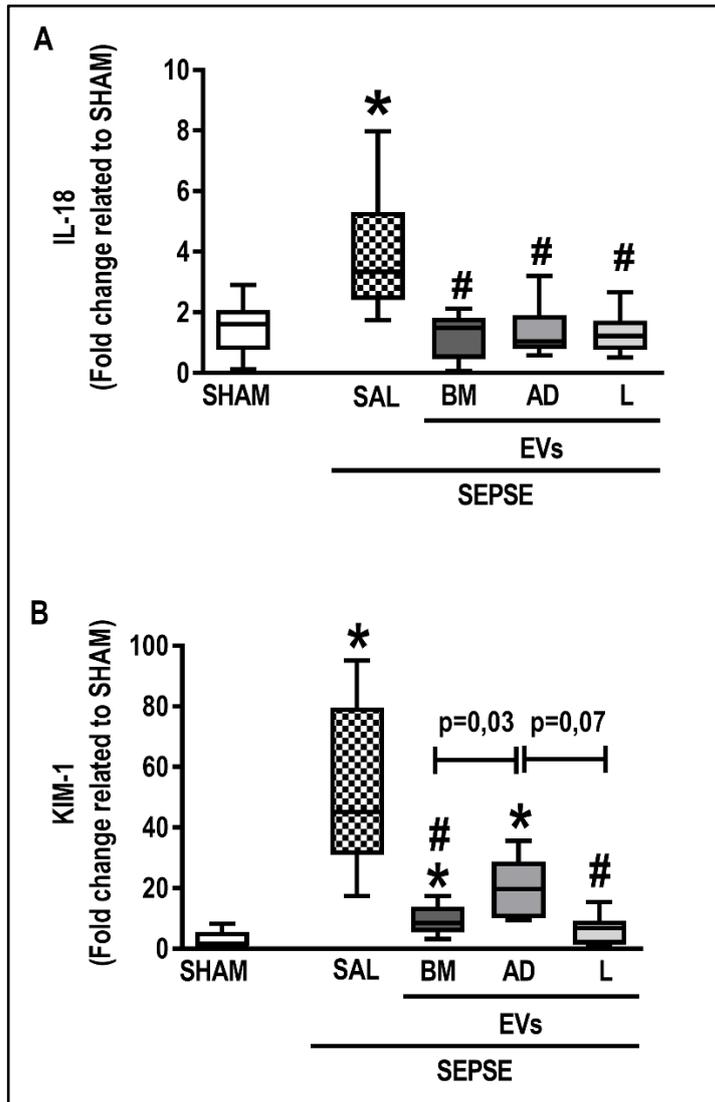
**Legenda:** EVs: vesículas extracelulares; SAL: salina; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão; PAS: ácido periódico de Schiff.

**Nota:** Gráficos de caixa (do inglês, box plot) representativos do edema intersticial (A) e da lesão da borda em escova (B). Identificam-se também figuras representativas das lâminas de tecido renal coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) correspondentes aos grupos: (a) SHAM, (b) SAL, (c) BM, (d) AD e (e) L. \* Significativamente diferente de SHAM (p valor ajustado <0,0125). # Significativamente diferente de SAL (p valor <0,001). As barras representam 100  $\mu$ m. O grupo SHAM foi comparado aos animais do grupo SEPSE pelo teste t com correção de Bonferroni para 4 comparações (p <0,0125). One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Šidák foi usado para comparar os grupos SEPSE (SAL, BM, AD e L). Utilizou-se um n=6/grupo. A linha dentro da caixa representa a mediana, as extremidades da caixa representam o intervalo interquartil (25 e 75%) e as hastes, os valores máximo e mínimo. As setas representam o edema intersticial e os contornos amarelos representam a lesão da borda em escova.

Interleucina (IL)-18 apresentou maior elevação em SAL [3,33 (2,42-5,31)] quando comparado com o grupo SHAM [1,61 (0,75-1,97)], com valor de p ajustado < 0,0125. A administração de EVs derivadas das três fontes foi capaz de reduzir IL-18 em comparação ao grupo SAL: BM [1,49 (0,46-1,82)], AD [1,04 (0,79-1,91)] e L [1,22 (0,75-1,73)]. A molécula de injúria renal (KIM)-1 também apresentou maior elevação em SAL [45,10 (30,96-79,62)], quando comparado ao o grupo SHAM [1,19 (0,84-

5,50)], com valor de  $p < 0,0125$ , porém apenas as EVs de BM [8,48 (5,34-13,90)] e L [6,77 (1,33-9,31)] foram capazes de diminuir KIM-1 em comparação com animais SAL ( $p$  valor  $< 0,0001$ ) (Figura 18).

**Figura 18** - Citocinas no parênquima renal



**Nota:** Gráfico de caixa (do inglês, box plot) (A) Níveis de interleucina (IL)-18 quantificados por PCR: \* Significativamente diferente de SHAM ( $p$  valor ajustado  $< 0,0125$ ). # Significativamente diferente de SAL (valor de  $p < 0,0001$ ). (B) Níveis de molécula de lesão renal (KIM) -1 quantificados por PCR: \* Significativamente diferente de SHAM ( $p$  valor ajustado  $< 0,0125$ ). # Significativamente diferente de SAL ( $p$  valor  $< 0,005$ ). O grupo SHAM foi comparado aos animais do grupo SEPSE pelo teste t com correção de Bonferroni para 4 comparações ( $p < 0,125$ ). One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Šidák foi usado para comparar os grupos SEPSE (SAL, BM, AD e L). Utilizou-se um  $n=6$ /grupo. A linha dentro da caixa representa a mediana, as extremidades da caixa representam o intervalo interquartil (25 e 75%) e as hastes, os valores

**Fonte:** o próprio autor.

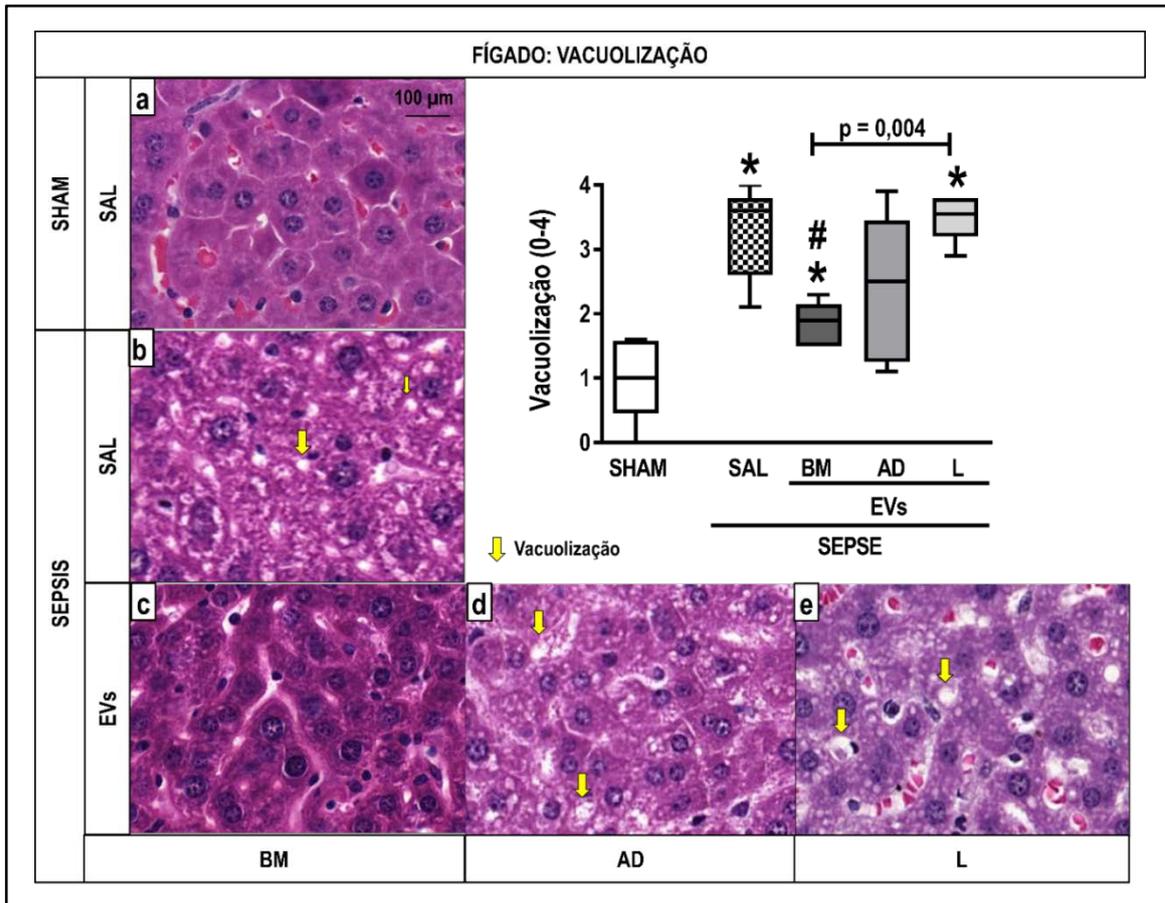
**Legenda:** EVs: vesículas extracelulares; SAL: salina; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão; KIM: molécula de lesão renal; IL: interleucina.

## 6.6 Histologia hepática e biologia molecular

Os resultados foram organizados na forma de gráfico de caixa, com mediana e intervalo interquartil [mediana (intervalo interquartil 25-75%)]. Os camundongos submetidos à indução da sepse desenvolveram vacuolização de hepatócitos em

comparação com animais SHAM (valor de  $p < 0,0125$ ), o que foi atenuado pelo tratamento com EVs derivadas de BM [1,90 (1,50-2,15)], quando comparado ao grupo SAL [3,60 (2,60-3,80)] (Figura 19).

**Figura 19** - Vacuolização (esteatose e degeneração hidrópica)



**Fonte:** o próprio autor.

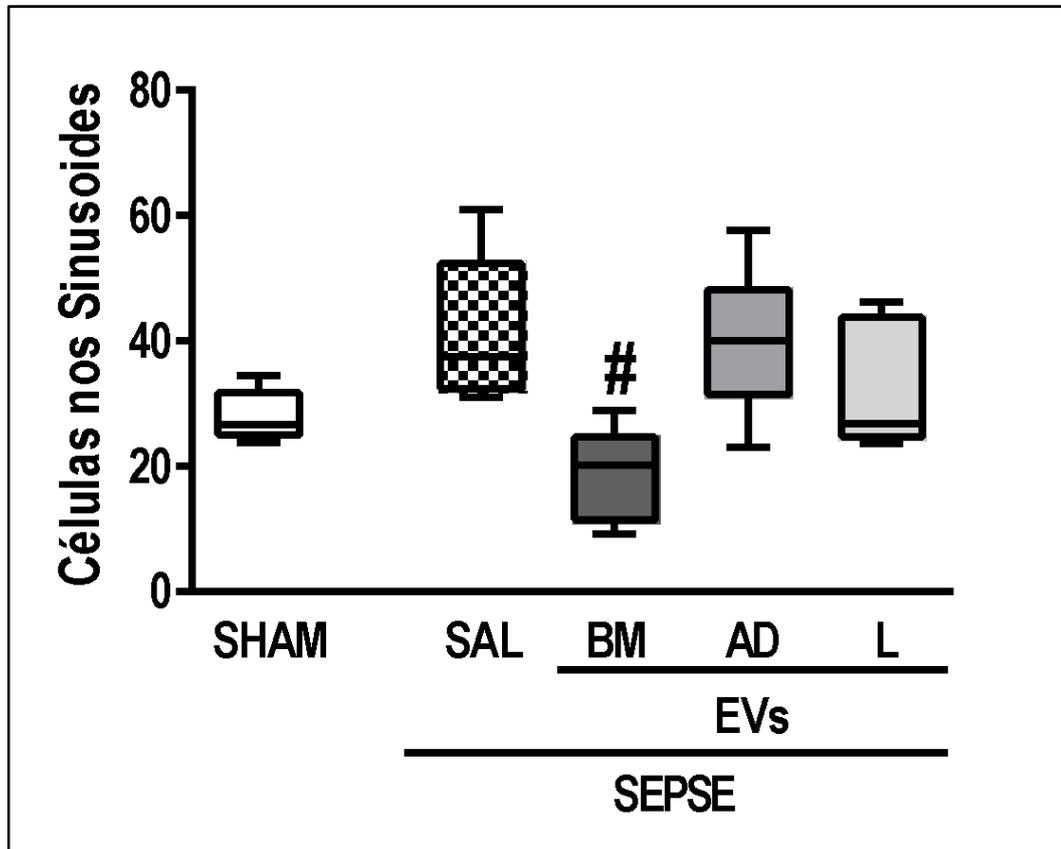
**Legenda:** EVs: vesículas extracelulares; SAL: salina; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão; HE: hematoxilina e eosina.

**Nota:** Gráfico de caixa (do inglês, box plot) representativo da vacuolização. Identificam-se também figuras representativas das lâminas de hepático renal coradas com hematoxilina e eosina (HE) correspondentes aos grupos: (a) SHAM, (b) SAL, (c) BM, (d) AD e (e) L. \* Significativamente diferente de SHAM ( $p$  valor ajustado  $< 0,0125$ ). # Significativamente diferente de SAL ( $p$  valor = 0,01). As barras representam 100  $\mu$ m. O grupo SHAM foi comparado aos animais do grupo SEPSE pelo teste t com correção de Bonferroni para 4 comparações ( $p < 0,0125$ ). One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Šidák foi usado para comparar os grupos SEPSE (SAL, BM, AD e L). Utilizou-se um  $n=6$ /grupo. A linha dentro da caixa representa a mediana, as extremidades da caixa representam o intervalo interquartil (25 e 75%) e as hastes, os valores máximo e mínimo. As setas representam o edema intersticial e os contornos amarelos representam a borda em escova.

Apenas o grupo BM [20,19 (10,90-25,30)] apresentou redução do número de células em sinusoides em comparação com animais SAL [37,44 (31,78-52,95)] (Figura 20), com  $p$  valor  $< 0,03$ . Não foram observadas diferenças nas citocinas

hepáticas (PD-1, IL-6 e IL-10) entre os cinco grupos estudados (Figura 21).

**Figura 20** - Avaliação quantitativa da infiltração de células inflamatórias nos sinusoides hepáticos

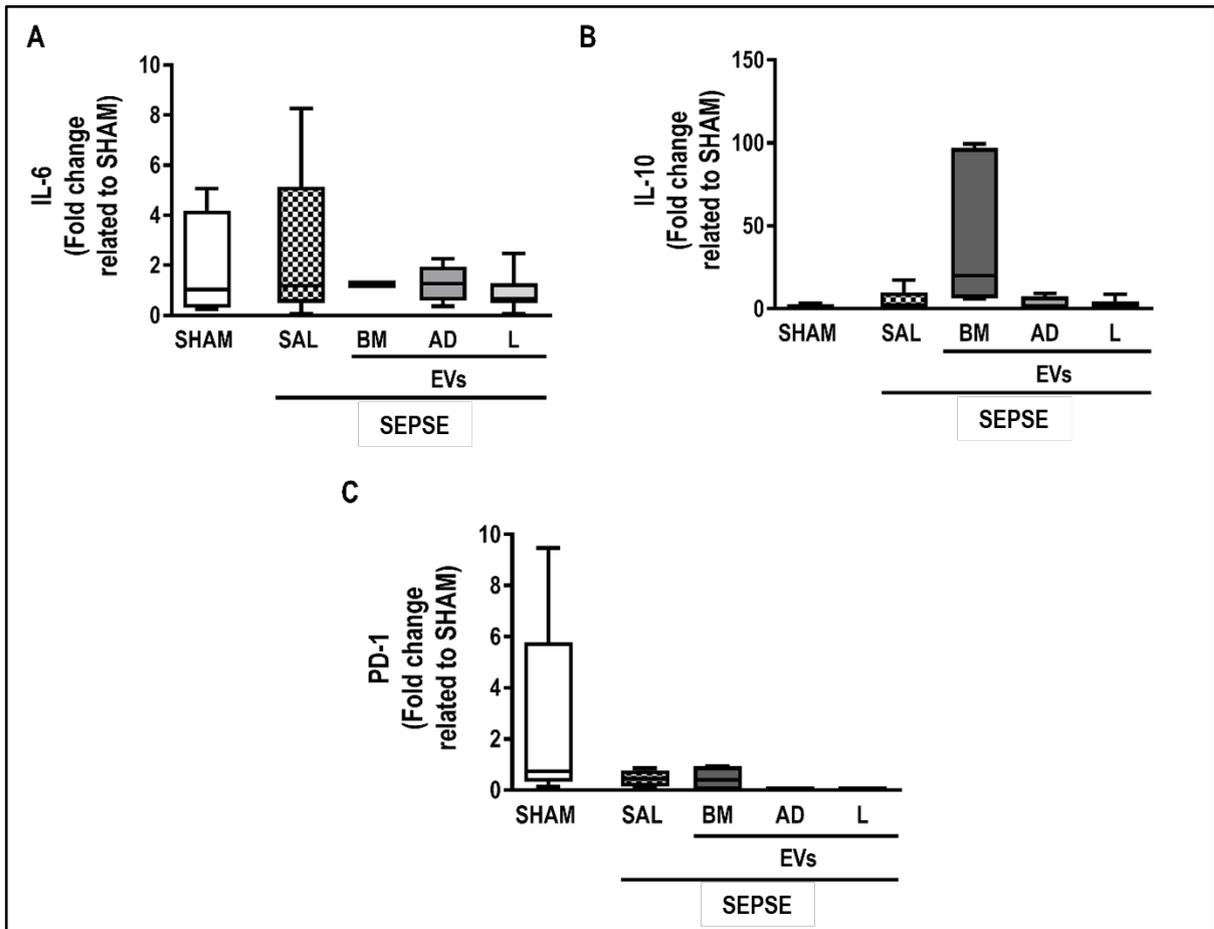


**Fonte:** o próprio autor.

**Legenda:** EVs: vesículas extracelulares; SAL: salina; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão; HE: hematoxilina e eosina.

**Nota:** Gráfico de caixa (do inglês, box plot) representativo da quantificação da infiltração de células inflamatórias nos sinusoides em lâminas de fígado coradas com hematoxilina e eosina (HE). # Significativamente diferente de SAL ( $p$  valor = 0,03). O grupo SHAM foi comparado aos animais do grupo SEPSE pelo teste  $t$  com correção de Bonferroni para 4 comparações ( $p < 0,125$ ). One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Šidák foi usado para comparar os grupos SEPSE (SAL, BM, AD e L). Utilizou-se um  $n=6$ /grupo. A linha dentro da caixa representa a mediana, as extremidades da caixa representam o intervalo interquartil (25 e 75%) e as hastes, os valores máximo e mínimo.

**Figura 21 - Citocinas no parênquima hepático**



**Fonte:** o próprio autor.

**Legenda:** EVs: vesículas extracelulares; SAL: salina; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; L: pulmão; IL: interleucina; PD: proteína de morte celular programada.

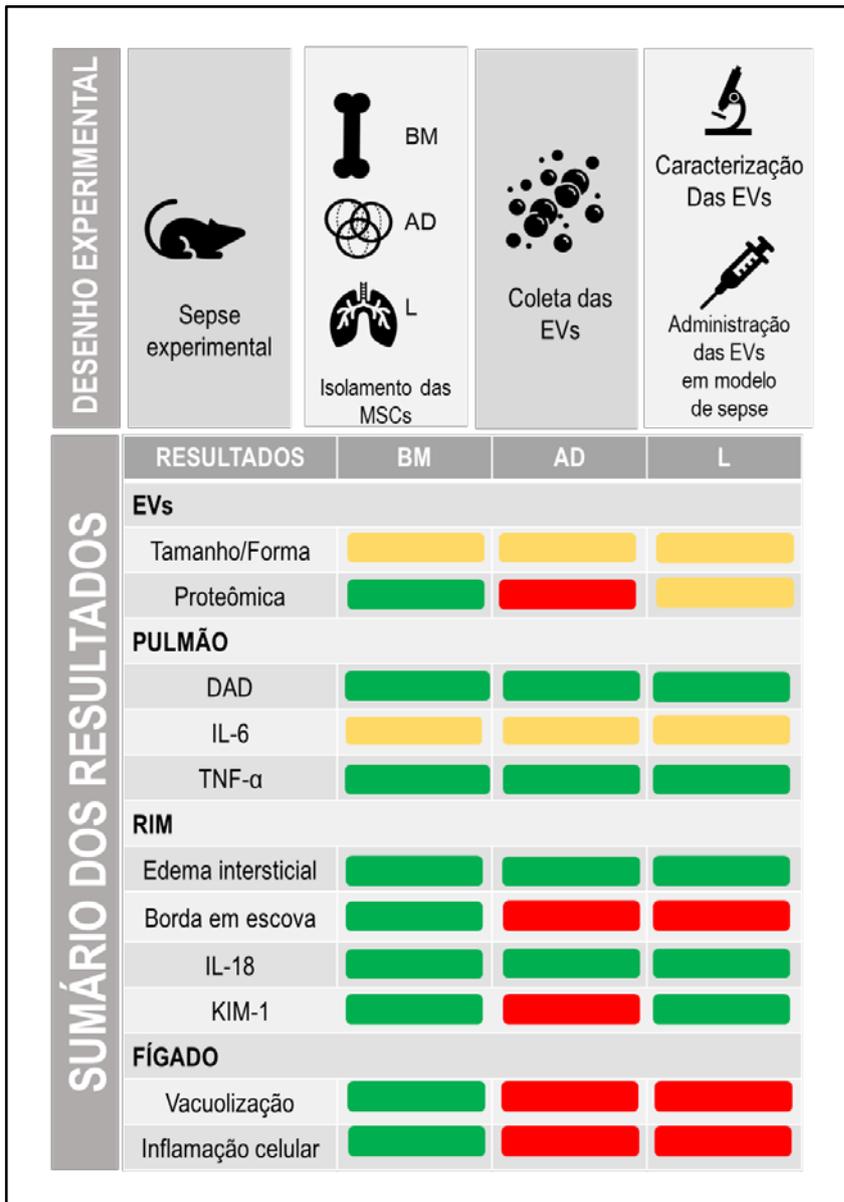
**Nota:** Gráficos de caixa (do inglês, box plot) representando (A) Níveis de interleucina (IL)-6 quantificados por PCR. (Níveis de interleucina (IL)-10 quantificados por PCR. (C) Níveis de proteína de morte celular programada (PD)-1 quantificados por PCR. O grupo SHAM foi comparado aos animais do grupo SEPSE pelo teste t com correção de Bonferroni para 4 comparações ( $p < 0,125$ ). One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Šidák foi usado para comparar os grupos SEPSE (SAL, BM, AD e L). Utilizou-se um  $n=6$ /grupo. A linha dentro da caixa representa a mediana, as extremidades da caixa representam o intervalo interquartil (25 e 75%) e as hastes, os valores máximo e mínimo.

## 7 DISCUSSÃO

---

Neste estudo, observamos performances distintas das vesículas extracelulares derivadas das diferentes fontes de MSCs na recuperação dos danos aos órgãos e nos marcadores de inflamação no modelo experimental de sepse. A terapia com EVs é uma alternativa promissora na abordagem da sepse, pois foi capaz de modular o sistema imunológico e a resposta inflamatória. Identificamos que EVs derivadas de BM, AD e L foram capazes de reduzir o escore DAD e a expressão de TNF- $\alpha$  no parênquima pulmonar. Nos rins, EVs das três fontes reduziram o edema intersticial. Os marcadores de lesão renal aguda (IL-18 e KIM-1) melhoraram após o tratamento com vesículas de BM e L. No fígado, EVs derivadas da medula óssea melhoraram o grau de vacuolização hepática e a infiltração de células nos sinusoides hepáticos. EVs derivadas de BM foram associadas a menor dano tecidual do pulmão, fígado e rim quando comparadas às provenientes de AD e L, o que possivelmente está associada às diferenças observadas no conteúdo proteômico, que varia a depender da fonte. O sumário dos nossos métodos e resultados pode ser observado no resumo gráfico abaixo (Figura 22):

**Figura 22 -** Sumário gráfico



**Fonte:** o próprio autor.

**Legenda:** EVs: vesículas extracelulares; BM: medula óssea; AD: tecido adiposo; IL: interleucina; KIM: molécula de injúria renal.

**Nota:**Resumo dos métodos: Utilizou-se um modelo de sepse experimental para avaliação do efeito terapêutico da administração intravenosa vesículas extracelulares (EVs) derivadas de células mesenquimais (MSCs) provenientes de medula óssea (BM), tecido adiposo (AD) e pulmão. Foi realizada caracterização ultraestrutural e proteômica das vesículas. Além disso, foi avaliado o efeito das diferentes fontes de EVs em alguns órgãos. No pulmão, analisou-se o impacto das EVs no dano alveolar difuso pulmonar (DAD) e na infiltração de interleucina (IL)-6 e fator de necrose tumoral (TNF)-alfa. No rim, o edema intersticial, a IL-18 e a molécula de injúria (KIM)-1. No fígado, avaliou-se o efeito da terapia com EVs na vacuolização e na inflamação celular, a partir da quantificação do infiltrado celular nos sinusóides hepáticos. A cor verde representa efeito benéfico de uma vesícula sobre determinado parâmetro analisado; a amarela, efeito neutro; em vermelho, efeito inferior.

Para indução de sepse experimental, foi escolhido o modelo bem estabelecido de ligadura e perfuração do ceco, uma vez que se assemelha à fisiopatologia da sepse em humanos, causando lesões pulmonares e em órgãos distais (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008). É um modelo de fácil execução, reproduzível, que permite a definição do grau de severidade da sepse que será induzida (a partir da variação do tamanho do jelco utilizado) e que mimetiza as alterações hemodinâmicas, metabólicas e imunológicas observadas na sepse em humanos (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005). Além disso, esse modelo é mais "fisiológico" quando comparado aos outros de sepse experimental, como a administração exógena de uma toxina (lipopolissacarídeo, LPS) ou da própria bactéria, na medida em que o CLP altera a barreira endógena de proteção colônica, permitindo a translocação bacteriana e a inflamação sistêmica, fato que observamos frequentemente na prática médica (na apendicite ou na diverticulite perfuradas, por exemplo). Em relação às suas limitações, destacam-se: alguns animais são capazes de conter a infecção sistêmica a partir da organização de um abscesso no local da perfuração, não progredindo para sepse; a gravidade da sepse induzida varia de acordo com o tamanho da perfuração, o que tenta ser contornado utilizando uma agulha de mesmo calibre para realizar a perfuração cecal nos animais, mas pode ocorrer em caso de inexperiência do pesquisador (que pode fazer lesões variáveis no ceco a despeito de utilizar uma agulha de mesmo calibre em todos os momentos) (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005). Uma crítica ao nosso desenho experimental, que cabe também a outros ensaios devido às dificuldades técnicas associadas, refere-se à ausência do suporte suplementar rotineiramente realizado em humanos sépticos, como administração adequada de fluidos para ressuscitação volêmica (somente 1 ml de salina subcutânea foi administrada após a cirurgia), aminas para controle hemodinâmico, oxigenioterapia, suporte ventilatório, entre outras.

Seis horas após a realização do modelo de CLP, a inflamação sistêmica já está presente e vinte e quatro horas após o procedimento, as principais alterações no pulmão, rim e fígado são observadas, o que se assemelha à sepse humana (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005). Nosso grupo administrou terapia antibiótica 6 e 24 horas após a realização do modelo de CLP, com o intuito de mimetizar – pelo menos em parte – a terapêutica básica administrada em humanos. A terapia com EVs foi administrada 24 horas após a indução da sepse, como descrito

anteriormente pelo nosso grupo (SILVA, J. D. *et al.*, 2019).

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular e Genética, as MSCs caracterizam-se pela capacidade de aderir em plástico e de se diferenciar em condroblastos, adipócitos e osteoblastos, bem como pela expressão de marcadores de superfície específicos (CD105, CD 73 e CD90) e pela ausência de CD45, CD34 e CD14 (DOMINICI *et al.*, 2006). As MSCs podem migrar para tecidos inflamados - através do efeito quimioatrativo realizado pela sinalização de moléculas liberadas por células imunes e células lesadas - e, em seguida, atuar na reparação de órgãos, fornecendo fatores tróficos e de crescimento, como o TGF1. Elas também possuem efeitos antimicrobianos, antiapoptóticos e antioxidantes, o que é crucial para o combate da sepse em sua fase inicial (MATTHAY; PATI; LEE, 2017). As MSCs são capazes de imunomodular respostas inflamatórias, secretando fatores anti-inflamatórios, alterando a polaridade do macrófago (tendência a se tornar M2) e aumentando a função dos linfócitos T Regulatórios (CHANG *et al.*, 2012; CHAO *et al.*, 2014; GOTTS; MATTHAY, 2016). A medula óssea ainda é a fonte mais estudada de MSCs, mas novas fontes estão surgindo, como tecido adiposo, pulmão, cordão umbilical, fluido menstrual, entre outros. Vale ressaltar que as propriedades fenotípicas, funcionais e imunológicas das MSCs dependem e variam de acordo com a fonte analisada (HO *et al.*, 2018; MENARD *et al.*, 2020).

As EVs são secretadas por diversos tipos de células e podem ser classificadas de acordo com suas características físicas como tamanho, sendo divididas em pequenas (<200nm) e médias/grandes (>200nm) (THERY *et al.*, 2018). Seu conteúdo inclui proteínas, lipídios, DNA, mRNA, miRNA e organelas celulares, com perfis semelhantes às suas células de origem (ABREU; WEISS; ROCCO, 2016; KESHTKAR; AZARPIRA; GHAREMANI, 2018) e que mudam de acordo com o órgão fonte de MSC, mesmo quando derivados do mesmo doador (VAN BALKOM *et al.*, 2019). As EVs liberadas por MSCs são capazes de promover contato indireto entre células, levando o conteúdo de sua origem para células receptoras, o que acontece por múltiplos mecanismos, como interações na superfície celular, internalização de compartimentos endocíticos e fusão entre membranas plasmáticas (ABREU; WEISS; ROCCO, 2016).

Para isolar vesículas extracelulares, selecionamos o método de ultracentrifugação de 100.000 x g, precedido por centrifugação em menor velocidade. De acordo com o consenso mais recente escrito pela Sociedade

Internacional de Vesículas Extracelular (THERY *et al.*, 2018), não há um método de separação ideal para isolar as EVs e o mesmo deve ser escolhido com base na experiência e no objetivo dos pesquisadores envolvidos. O protocolo escolhido neste estudo garante uma recuperação intermediária e a especificidade das EVs, o que é adequado para simular o mecanismo de ação de MSC desejado: a liberação de vesículas extracelulares na circulação. As vesículas obtidas no nosso estudo são classificadas como pequenas (tamanho médio de 150 a 200 nm) e possuem morfologia (contorno esférico) semelhante às definições encontradas no consenso (THERY *et al.*, 2018). Além disso, identificamos a presença de CD81, CD44 e anexinas nos ensaios de proteômica, que são marcadores de superfície de EVs provenientes de MSCs (THERY *et al.*, 2018). Neste estudo, optamos por avaliar os efeitos das vesículas analisando danos histológicos, infiltração celular e produção de citocinas no pulmão, fígado e rim.

A administração de EVs derivadas de MSCs provenientes de medula óssea (BM) e pulmão (L) associou-se a taxas de mortalidade menores quando comparadas ao SHAM. No entanto, surpreendentemente, AD-EVs apresentaram a maior taxa de mortalidade em comparação com todos os grupos, incluindo o SAL ( $p = 0,107$ ). Estudos prévios evidenciaram efeito benéfico das MSCs e EVs derivadas de tecido adiposo em modelos experimentais. Em fevereiro de 2023, Li e colaboradores publicaram um estudo onde avaliaram o efeito do tratamento da sepse experimental induzida por CLP com MSCs derivadas de tecido adiposo, que foi responsável pela redução da mortalidade (taxa de sobrevivência aumenta de 8,39% para 35,89%), da redução da inflamação e do dano tecidual (LI *et al.*, 2023). Cabe destaque que as células mesenquimais foram diluídas em 0,2 ml (200  $\mu$ L, volume 3 vezes maior que o administrado no nosso modelo), e a otimização da ressuscitação volêmica pode estar associada ao melhor desfecho observado. Além disso, as células foram administradas mais precocemente (6h após a indução da sepse, enquanto administramos com 24h). Em 2020, Bai e colaboradores evidenciaram que o tratamento da sepse experimental induzida por LPS intraperitoneal com EVs derivadas de MSCs do tecido adiposo reduziu a concentração de citocinas e o dano tecidual em pulmão, rim e fígado, sem relatar diferenças na taxa de mortalidade (BAI *et al.*, 2020).

Os dados encontrados no nosso estudo divergem com a literatura, na medida em que ainda não havia sido descrito um aumento da mortalidade pelo tratamento

com as AD-EVs. Tal fato reforça o fato que a ação das vesículas varia de acordo com sua célula de origem, forma de indução da liberação e meio no qual atuam, como descrito previamente (MENARD *et al.*, 2020). O pior desempenho das EVs derivadas de tecido adiposo também pode ser explicado pelo conteúdo das AD-EVs isoladas no nosso protocolo, que possui menos fibronectina, uma proteína que interage com a fibrina durante o processo de coagulação, em comparação com outras fontes. Foi descrito previamente que a depleção da fibronectina no plasma é um marcador prognóstico na sepse humana, o que pode estar relacionado à sua participação na resposta do hospedeiro à infecção (LEMANSKA-PEREK *et al.*, 2020; RUIZ MARTIN *et al.*, 2004). A fibronectina interage com macrófagos auxiliando na defesa imunológica, atua na integridade vascular e também parece modular a ativação do complemento, favorecendo a depuração bacteriana, o que pode nos ajudar a compreender as diferenças observadas na terapia com EVs de múltiplas fontes (BECKER; O'NEILL, 2007; KESKI-OJA; MOSHER; VAHERI, 1976; PROCTOR, 1987). Além disso, as AD-VEs apresentaram menor conteúdo de anexina A5.

As anexinas são proteínas que compõem a estrutura das membranas celulares, dependem de cálcio e estão associadas à ligação de fosfolípidos, sendo encontradas inclusive na superfície das MSCs e EVs, fazendo parte dos marcadores mínimos de superfície destas últimas (THERY *et al.*, 2018). Possuem como características adicionais os efeitos anti-inflamatórios, de imunidade inata, antiapoptóticos e anticoagulantes. Diversos componentes da família das anexinas estão associados a vias exocíticas e endocíticas (MUI *et al.*, 2021). A anexina 5 é altamente expressa por células que tem função de barreira no organismo, como células endoteliais, salivares e da placenta, o que reforça sua associação com os mecanismos da imunidade inata, enquanto a anexina 6 parece estar associada à agregação de endossomos e fusão de vesículas no epitélio secretor durante a exocitose (RAND *et al.*, 2012). Na sepse, a Anexina A5 melhora a função orgânica, reduz a liberação de citocinas inflamatórias e protege contra isquemia (MUI *et al.*, 2021). O mecanismo através do qual a anexina A5 possui efeitos anti-inflamatórios e anticoagulantes parece estar associado à ação do seu dímero dianexina, que é capaz de bloquear a fosfatidilserina, um fosfolípido intracelular que, quando externalizado na superfície celular – algo recorrente na fisiopatologia da sepse, mediante ao alto grau de apoptose, ativa a liberação de citocinas, fagocitose e

ativação da cascata de coagulação (BEATTIE et al., 2019). Em 2019, Beattie e colaboradores publicaram que a administração da dianexina em camundongos sépticos reduziu a disfunção vascular e a coagulopatia quando comparado aos animais não tratados (BEATTIE et al., 2019). Cabe destaque que há evidência de que a anexina A5 acople-se diretamente à superfície das bactérias gram-negativas via ligação com o lipídio A do LPS, interrogando-se seu possível efeito bactericidadireto (RAND et al., 2012). Dessa forma, especulamos que talvez o pior desempenho das AD-EVs também possa estar associado a uma menor concentração da anexina A5, quando comparada às demais BM-EVs e L-EVs.

EVs derivadas do tecido adiposo também ativam as vias relacionadas ao ATP, o que pode estar associado à produção maciça de espécies reativas de oxigênio e vias pró-inflamatórias. Juntos, esses dados nos ajudam a elaborar hipóteses sobre o motivo pelo qual EVs derivadas do tecido adiposo têm pior efeito na sepse quando comparados às outras duas fontes analisadas neste estudo, entretanto estudos adicionais para compreender essa associação são necessários.

Em relação aos efeitos das vesículas extracelulares nos pulmões, as três fontes foram capazes de reduzir o dano alveolar difuso (DAD). BM-EVs reduziram o edema intersticial renal e a presença de biomarcadores precoces de lesão proximal do túbulo, como KIM-1 e IL-18 (AMARAL PEDROSO *et al.*, 2020) de forma mais eficaz quando comparadas com EVs derivadas dos tecidos adiposo e pulmonar, além de terem sido a única fonte de EVs capaz de reduzir os danos hepáticos, como demonstrado pela quantificação da vacuolização dos hepatócitos e pela infiltração celular em sinusoides, embora não tenham sido observados efeitos positivos nos níveis de IL-6, IL-10 e PD1 hepáticas.

EVs derivadas da medula óssea apresentaram o melhor desempenho geral. Comparando o teor proteômico de BM-EVs com outras fontes, observou-se maior concentração de ATPase do retículo endoplasmático transicional (Vcp), proteína que estimula a via de sinalização do IL-9, como descrito na tabela 3. O aumento de IL-9 parece atuar protegendo os camundongos sépticos através de um mecanismo que envolve a modulação de mediadores pró e anti-inflamatórios (GROHMANN *et al.*, 2000). Além disso, foi demonstrado que as BM-VEs têm mais Anexina A5, uma proteína com múltiplos benefícios, como já citado previamente (BEATTIE et al., 2019).

O uso de EVs derivadas de MSC apresenta-se como uma terapia alternativa

na sepse para superar as limitações impostas pela terapia celular isolada, como os efeitos adversos tromboembólicos e o receio associado ao efeito pró-tumoral secundário à administração intravenosa de doses superiores a 10 milhões de MSCs/Kg de peso em indivíduos saudáveis (HOMMA et al., 2023). Cabe destacar que o efeito pró-neoplásico não foi confirmado em uma meta-análise recente, que avaliou os efeitos adversos da administração nas MSCs em humanos (WANG; YI; SONG, 2021). As vesículas apresentam ainda baixa imunogenicidade, toxicidade e permanecem estáveis na circulação (KHOSROJERDI et al., 2021).

Há um ensaio clínico publicado em 2022 (Identificador NCT05283317) que avaliou a terapia com MSCs derivadas de tecido adiposo na sepse em humanos, infundida na dose de  $1 \times 10^6$  células/Kg, administradas nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 em conjunto com terapia padrão (antibioticoterapia, expansão volêmica e medidas de suporte) em comparação ao grupo controle (que recebeu somente terapia padrão). Havia 10 pacientes no grupo tratamento e 20 no grupo controle. Houve melhora do escore SOFA ajustado e da função renal, entretanto sem alterações nas citocinas séricas e na taxa de mortalidade (ALP et al., 2022). Como o número de participantes foi reduzido, ensaios adicionais são necessários.

Em seres humanos, os estudos com EVs encontram-se um pouco menos avançados quando comparados aos estudos com MSCs. Há 8 ensaios clínicos registrados no ClinicalTrials.gov que utilizam terapia com vesículas extracelulares derivadas de MSCs. Dois deles são chineses e estão ativos e recrutando: o primeiro objetiva avaliar o efeito do tratamento com as EVs nebulizadas em pacientes com Covid-19 (IdentificadorNCT05787288) e o segundo, o efeito das EVs nebulizadas na tosse crônica após Covid-19 (IdentificadorNCT05808400). Os seis restantes ainda não estão ativos, mas objetivam avaliar: 1) Efeito da administração intravenosa da EVs em modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo (IdentificadorNCT05127122); 2) Efeito da administração intravenosa da EVs na Covid-19 leve (IdentificadorNCT05125562); 3) Efeito da administração intravenosa da EVs em modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo (IdentificadorNCT05127122); 4) Uso de EVs no reparo de regeneração de doenças ósseas segmentares (IdentificadorNCT05127122); 5) Impacto da infusão de EVs na redução da rejeição aguda ao transplante hepático (IdentificadorNCT05881668) e 6) Efeito das EVs na fístula perianal crônica na doença de Crohn (IdentificadorNCT05499156). Ainda não há proposta de ensaio clínico com o intuito

de avaliar o impacto da infusão das EVs na sepse listada na plataforma Clinical Trials.

Vale destacar algumas das limitações deste estudo: a sepse experimental foi desenvolvida através do modelo CLP, com o objetivo de mimetizar a sepse em humanos, entretanto ainda não é possível garantir o alto nível de fidelidade entre o modelo animal e o clínico. Além disso, utilizamos somente camundongos do sexo masculino em nosso ensaio e atualmente há evidência de que o sexo e as características hormonais modulam o sistema imune e a resposta à infecção: machos parecem estar mais vulneráveis aos efeitos deletérios da sepse e somente esse grupo foi avaliado neste estudo (ANGELE et al., 2014). Cabe destaque também o fato desses animais terem sido observados por somente 48h, não sendo possível registrar nesse intervalo de tempo diferença significativa na taxa de sobrevivência. Questionamos se uma observação mais prolongada, como 7 a 10 dias, não teria sido capaz de evidenciar tal diferença.

Outra limitação importante, especialmente quando consideramos expandir a terapia proposta para a prática clínica, merece destaque: a cultura de células mesenquimais estromais é um processo de alto custo e complexo, que exige uma tecnologia de alto nível para produção maciça de vesículas extracelulares. Além disso, as MSCs e a assinatura molecular das EVs variam não apenas dependendo da fonte tecidual, mas também dependendo do doador, o que poderia gerar inconstância nos resultados clínicos quando expandimos para uma terapia em larga escala. Objetivando confeccionar vesículas extracelulares para aplicação clínica, é necessária uma enorme quantidade de MSCs na cultura de células. Nosso trabalho evidenciou que os efeitos da terapia com EVs dependem da fonte celular e do órgão-alvo, portanto seria ideal fornecer, na terapia em humanos, vesículas extracelulares que apresentam o melhor desempenho sobre o órgão mais danificados em cada doença, orquestrando uma abordagem otimizada e mais custo-efetiva. Para isso, são necessários mais estudos para compreender a melhor fonte de vesícula extracelular em cada patologia e para cada órgão lesado.

## 8 CONCLUSÃO

---

No modelo experimental de sepse induzida por ligação e perfuração de ceco, as vesículas extracelulares derivadas da medula óssea apresentam melhor efeito terapêutico quando comparadas às EVs de AD e L-MSCs e isso parece estar associados ao seu conteúdo proteômico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABREU, S. C. et al. Bone Marrow, Adipose, and Lung Tissue-Derived Murine Mesenchymal Stromal Cells Release Different Mediators and Differentially Affect Airway and Lung Parenchyma in Experimental Asthma. **Stem Cells Transl Med**, v. 6, n. 6, p. 1557-1567, 2017.
- ABREU, S. C.; WEISS, D. J.; ROCCO, P. R. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: a therapeutic option in respiratory diseases? **Stem Cell Res Ther**, v. 7, n. 1, p. 53, 2016.
- ALHAZZANI, W. et al. Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Intensive Care Med**, v. 46, n. 5, p. 854-887, 2020.
- ALMEIDA, N. R. C. et al. Analysis of trends in sepsis mortality in Brazil and by regions from 2010 to 2019. **Rev Saude Publica**, v. 56, p. 25, 2022.
- ALP, E. et al. The Effect of Mesenchymal Stromal Cells on the Mortality of Patients with Sepsis and Septic Shock: A Promising Therapy. **Emerg Med Int**, v. 2022, p.9222379, 2022.
- AMARAL PEDROSO, L. et al. Acute kidney injury biomarkers in the critically ill. **Clin Chim Acta**, v. 508, p. 170-178, 2020.
- ANGELE, M. K. et al. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 12-9, 2014.
- ASMUSSEN, S. et al. Human mesenchymal stem cells reduce the severity of acute lung injury in a sheep model of bacterial pneumonia. **Thorax**, v. 69, n. 9, p. 819-25, 2014.
- AVERYANOV A, et al. First-in-human high-cumulative-dose stem cell therapy in idiopathic pulmonary fibrosis with rapid lung function decline. **Stem Cells Transl Med**, v. 9, n. 1, p. 6-16, 2020.
- AYALA, A. et al. Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency. **Am J Pathol**, v. 161, n. 6, p. 2283-94, 2002.
- BACHURSKI, D. et al. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis - An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. **J Extracell Vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1596016, 2019.
- BAI, X. et al. Extracellular Vesicles From Adipose Tissue-Derived Stem Cells Affect Notch-miR148a-3p Axis to Regulate Polarization of Macrophages and Alleviate Sepsis in Mice. **Front Immunol**, v. 11, p. 1391, 2020.

- BANDEIRA, E. et al. Effects of mesenchymal stem cell-derived nanovesicles in experimental allergic airway inflammation. **Respir Res**, v. 24, n.1, p. 3, 2023.
- BEATTIE, G. et al. Protective effect of phosphatidylserine blockade in sepsis induced organ dysfunction. **Surgery**, v. 166, n. 5, p. 844-848, 2019.
- BECKER, C. E.; O'NEILL, L. A. Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. **Semin Immunopathol**, v. 29, n. 3, p. 239-48, 2007.
- BIANCONE, L. et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, n. 8, p. 3037-42, 2012.
- BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, n. 1, p. 235-43, 1997.
- BOZZA, F. A. et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Crit Care**, v. 11, n. 2, p. R49, 2007.
- BRAGA, C. L. et al. Proteomics profile of mesenchymal stromal cells and extracellular vesicles in normoxic and hypoxic conditions. **Cytotherapy**, v. 24, n. 12, p. 1211-1224, 2022.
- BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 10, p. 854-65, 2005.
- CARNIELLI, C. M. et al. Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 3598, 2018.
- CHAMBERLAIN, G. et al. Mesenchymal stem cells exhibit firm adhesion, crawling, spreading and transmigration across aortic endothelial cells: effects of chemokines and shear. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25663, 2011.
- CHANG, C. L. et al. Impact of apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cells on attenuating organ damage and reducing mortality in rat sepsis syndrome induced by cecal puncture and ligation. **J Transl Med**, v. 10, p. 244, 2012.
- CHAO, Y. H. et al. An increase in CD3+CD4+CD25+ regulatory T cells after administration of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during sepsis. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110338, 2014.
- CHEN, J. et al. Human mesenchymal stromal cells small extracellular vesicles attenuate sepsis-induced acute lung injury in a mouse model: the role of oxidative stress and the mitogen-activated protein kinase/nuclear factor kappa B pathway. **Cytotherapy**, v. 23, n. 10, p. 918-30, 2021.
- CHI, D. et al. Human Amnion Epithelial Cells and Their Derived Exosomes Alleviate Sepsis-Associated Acute Kidney Injury via Mitigating Endothelial Dysfunction. **Front Med (Lausanne)**, v. 9, p. 829606, 2022.

CHOPRA, M.; REUBEN, J. S.; SHARMA, A. C. Acute lung injury:apoptosis and signaling mechanisms. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 234, n. 4, p. 361-71, 2009.

CINES, D. B. et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, v. 91, n. 10, p. 3527-61, 1998.

COSENZA, S. et al. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. **Sci Rep**, v. 7, p.16214, 2017.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 12, p. 1367-72, 2008.

COX, J. et al. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **J Proteome Res**, v. 10, n. 4, p. 1794-805, 2011.

DE CARVALHO, L. R.P. et al. Mitochondria-Rich Fraction Isolated From Mesenchymal Stromal Cells Reduces Lung and Distal Organ Injury in Experimental Sepsis. **Crit Care Med**, v. 49, n. 9, p. e880-e90, 2021.

DE CASTRO, L. L. et al. Human adipose tissue mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles act differentially on lung mechanics and inflammation in experimental allergic asthma. **Stem Cell Res Ther**, v. 8, n. 1, p. 151, 2017.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1285-95, 2007.

DEAR, J. W. et al. Sepsis-induced organ failure is mediated by different pathways in the kidney and liver: acute renal failure is dependent on MyD88 but not renal cell apoptosis. **Kidney Int**, v. 69, n. 5, p. 832-6, 2006.

DENNING, N. L. et al. DAMPs and NETs in Sepsis. **Front Immunol**, v. 10, p. 2536, 2019.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

DOSTERT, G. et al. How Do Mesenchymal Stem Cells Influence or Are Influenced by Microenvironment through Extracellular Vesicles Communication? **Front Cell Dev Biol**, v. 5, p. 6, 2017.

EVANS, L. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. **Intensive Care Med**, v. 47, n. 11, p. 1181-1247, 2021.

- FLEISCHMANN, C. et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 193, n. 3, p. 259-72, 2016.
- FONT, M. D.; THYAGARAJAN, B.; KHANNA, A. K. Sepsis and Septic Shock - Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. **Med Clin North Am**, v. 104, n. 4, p. 573-585, 2020.
- GONCALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. F. et al. Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153607, 2016.
- GOTTS, J. E.; MATTHAY, M. A. Sepsis: pathophysiology and clinical management. **BMJ**, v. 353, p. i1585, 2016.
- GROHMANN, U. et al. IL-9 protects mice from Gram-negative bacterial shock: suppression of TNF-alpha, IL-12, and IFN-gamma, and induction of IL-10. **J Immunol**, v. 164, n. 8, p. 4197-203, 2000.
- GUILLAMAT-PRATS, R. et al. Cell therapy for the treatment of sepsis and acute respiratory distress syndrome. **Ann Transl Med**, v. 5, n. 22, p. 446, 2017.
- HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1123-32, 2005.
- HATTORI, M. et al. Critical role of endogenous histamine in promoting end-organ tissue injury in sepsis. **Intensive Care Med Exp**, v. 4, n. 1, p. 36, 2016.
- HATTORI, Y. et al. Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges. **Pharmacol Ther**, v. 177, p. 56-66, 2017.
- HENNINGER, D. D. et al. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. **J Immunol**, v. 158, n. 4, p. 1825-32, 1997.
- HO, Y. T. et al. Chromatin accessibility identifies diversity in mesenchymal stem cells from different tissue origins. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 17765, 2018.
- HOMMA, K. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for treatment of sepsis. **Front Immunol**, v. 14, p. 1136964, 2023.
- HOTCHKISS, R. S. et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. **Crit Care Med**, v. 27, n. 7, p. 1230-51, 1999.
- IBRAHIM, Z. M. et al. On classifying sepsis heterogeneity in the ICU: insight using machine learning. **J Am Med Inform Assoc**, v. 27, n. 3, p. 437-443, 2020.

- ISLAM, M. N. et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 759-65, 2012.
- KATSUDA, T. et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. **Proteomics**, v. 13, n. 10-11, p. 1637-53, 2013.
- KEANE, C.; JERKIC, M.; LAFHEY, J. G. Stem Cell-based Therapies for Sepsis. **Anesthesiology**, v. 127, n. 6, p. 1017-1034, 2017.
- KESHTKAR, S.; AZARPIRA, N.; GHAHREMANI, M. H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. **Stem Cell Res Ther**, v. 9, n. 1, p. 63, 2018.
- KESKI-OJA, J.; MOSHER, D. F.; VAHERI, A. Cross-linking of a major fibroblast surface-associated glycoprotein (fibronectin) catalyzed by blood coagulation factor XIII. **Cell**, v. 9, n. 1, p. 29-35, 1976.
- KHOSROJERDI, A. et al. Immunomodulatory and Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells on Organ Dysfunction in Sepsis. **Shock**, v. 55, n. 4, p. 423-40, 2021.
- KIM, H. S. et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. **J Proteome Res**, v. 11, n. 2, p. 839-49, 2012.
- KISS, T. et al. Comparison of different degrees of variability in tidal volume to prevent deterioration of respiratory system elastance in experimental acute lung inflammation. **Br J Anaesth**, v. 116, n. 5, p. 708-15, 2016.
- KOBAYASHI, A. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and inflammatory cytokines in alveolar macrophages of ARDS following sepsis. **Chest**, v. 113, n. 6, p. 1632-9, 1998.
- KOLLEF, K. E. et al. Predictors of 30-day mortality and hospital costs in patients with ventilator-associated pneumonia attributed to potentially antibiotic-resistant gram-negative bacteria. **Chest**, v. 134, n. 2, p. 281-287, 2008.
- LEMANSKA-PEREK, A. et al. Plasma and Cellular Forms of Fibronectin as Prognostic Markers in Sepsis. **Mediators Inflamm**, v. 2020, p. 8364247, 2020.
- LI, K. et al. Dose-specific efficacy of adipose-derived mesenchymal stem cells in septic mice. **Stem Cell Res Ther**, v. 14, n. 1, p. 32, 2023.
- LUGER, D. et al. Intravenously Delivered Mesenchymal Stem Cells: Systemic Anti-Inflammatory Effects Improve Left Ventricular Dysfunction in Acute Myocardial Infarction and Ischemic Cardiomyopathy. **Circ Res**, v. 120, n. 10, p. 1598-1613, 2017.

MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017.

MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, v. 348, n. 16, p. 1546-54, 2003.

MATSUDA, N. et al. Therapeutic effect of in vivo transfection of transcription factor decoy to NF-kappaB on septic lung in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 287, n. 6, p. L1248-55, 2004.

MATSUDA, N. et al. Silencing of caspase-8 and caspase-3 by RNA interference prevents vascular endothelial cell injury in mice with endotoxic shock. **Cardiovasc Res**, v. 76, n. 1, p. 132-40, 2007.

MATTHAY, M. A.; PATI, S.; LEE, J. W. Concise Review: Mesenchymal Stem (Stromal) Cells: Biology and Preclinical Evidence for Therapeutic Potential for Organ Dysfunction Following Trauma or Sepsis. **Stem Cells**, v. 35, n. 2, p. 316-324, 2017.

MEI, S. H. et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 182, n. 8, p. 1047-57, 2010.

MENARD, C. et al. Integrated transcriptomic, phenotypic, and functional study reveals tissue-specific immune properties of mesenchymal stromal cells. **Stem Cells**, v. 38, n. 1, p. 146-159, 2020.

MONTRUCCHIO, G.; ALLOATTI, G.; CAMUSSI, G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 80, n. 4, p. 1669-99, 2000.

MORENO, S. E. et al. IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. **J Immunol**, v. 177, n. 5, p. 3218-24, 2006.

MUI, L. et al. Therapeutic Potential of Annexins in Sepsis and COVID-19. **Front Pharmacol**, v. 12, p. 735472, 2021

MURAO, A. et al. Exosomes in Sepsis. **Front Immunol**, v. 11, p. 2140, 2020.

OHARA, M. et al. Extracellular Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats. **Stem Cells Int**, v. 2018, p.3212643, 2018.

OPAL, S. M.; VAN DER POLL, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. **J Intern Med**, v. 277, n. 3, p. 277-293, 2015.

OSTANIN, A. A. et al. Multiplex analysis of cytokines, chemokines, growth factors, MMP-9 and TIMP-1 produced by human bone marrow, adipose tissue, and placental mesenchymal stromal cells. **Bull Exp Biol Med**, v. 151, n. 1, p. 133-41, 2011.

- OSUCHOWSKI, M. F. et al. Minimum Quality Threshold in Pre-Clinical Sepsis Studies (MQTiPSS): An International Expert Consensus Initiative for Improvement of Animal Modeling in Sepsis. **Shock**, v. 50, n. 4, p. 377-380, 2018.
- PANES, J. et al. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. **Am J Physiol**, v. 269, n. 6 Pt 2, p. H1955-64, 1995.
- PAROLINI, I. et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. **J Biol Chem**, v. 284, n. 49, p. 34211-22, 2009.
- PEI, Y. et al. Bone marrow-mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-141 targets PTEN and activates beta-catenin to alleviate myocardial injury in septic mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 43, n. 5, p. 584-93, 2021.
- PERCIE DU SERT, N. et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLoS Biol**, v. 18, n. 7, p. e3000410, 2020.
- PEREZ-RIVEROL, Y. et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. **Nucleic Acids Res**, v. 47, n. D1, p. D442-D450, 2019.
- PHINNEY, D. G. et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. **Nat Commun**, v. 6, p. 8472, 2015.
- PROCTOR, R. A. Fibronectin: an enhancer of phagocyte function. **Rev Infect Dis**, v. 9 Suppl 4, p. S412-9, 1987.
- QIU, G. et al. Functional proteins of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n.1, p. 359, 2019.
- RAND, J. H. et al. Annexin A5 binds to lipopolysaccharide and reduces its endotoxin activity. **mBio**, v. 3, n. 2, 2012.
- REMICK, D. G. Cytokine therapeutics for the treatment of sepsis: why has nothing worked? **Curr Pharm Des**, v. 9, n. 1, p. 75-82, 2003.
- RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 10, p. 776-87, 2008.
- RUIZ MARTIN, G. et al. Plasma fibronectin as a marker of sepsis. **Int J Infect Dis**, v. 8, n. 4, p. 236-43, 2004.
- SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEICA, R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 12, p. 2216-31, 2013.
- SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, v. 8, n. 4, p. R251-60, 2004.

SILVA, E. P. D. et al. Survival analysis of patients with sepsis in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 52, p. e20180121, 2019.

SILVA, J. D. et al. Mesenchymal Stromal Cells Are More Effective Than Their Extracellular Vesicles at Reducing Lung Injury Regardless of Acute Respiratory Distress Syndrome Etiology. **Stem Cells Int**, v. 2019, p. 8262849, 2019.

SILVA, J. D. et al. Respiratory and Systemic Effects of LASSBio596 Plus Surfactant in Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, n. 2, p. 821-35, 2016.

SILVA, L. H. A. et al. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases. **Stem Cell Res Ther**, v. 9, n. 1, p. 45, 2018.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-10, 2016.

SINGER, M.; SANSONETTI, P. J. IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of Shigella-induced colitis. **J Immunol**, v. 173, n. 6, p. 4197-206, 2004.

SOGAYAR, A. M. et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, v. 26, n. 5, p. 425-34, 2008.

SOLOMKIN, J. S. et al. Neutrophil dysfunction in sepsis. II. Evidence for the role of complement activation products in cellular deactivation. **Surgery**, v. 90, n. 2, p. 319-27, 1981.

SUNG, P. H. et al. Apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy protects against lung and kidney injury in sepsis syndrome caused by cecal ligation puncture in rats. **Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 6, p. 155, 2013.

THERY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **J Extracell Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nat Methods**, v. 13, n. 9, p. 731-40, 2016.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 9, p. 726-36, 2008.

VAN BALKOM, B. W. M. et al. Proteomic Signature of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Small Extracellular Vesicles. **Proteomics**, v. 19, n. 1-2, p. e1800163, 2019.

VISWANATHAN, S. et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT(R)) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. **Cytotherapy**, v. 21, n. 10, p. 1019-1024, 2019.

WAN, X. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles suppress the fibroblast proliferation by downregulating FZD6 expression in fibroblasts via micrRNA-29b-3p in idiopathic pulmonary fibrosis. **J Cell Physiol**, v. 235, n. 11, p.8613-25, 2020.

WANG, H.; MA, S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. **Am J Emerg Med**, v. 26, n. 6, p. 711-5, 2008.

WANG, X. et al. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate sepsis-induced lung injury in mice by inhibiting the secretion of IL-27 in macrophages. **Cell Death Discov**, v. 8, n. 1, p. 18, 2022.

WANG, Y.;YI, H.;SONG, Y. The safety of MSC therapy over the past 15years: a meta-analysis. **Stem Cell Res Ther**, v. 12, n. 545, 2021.

WANG, Z. G. et al. Comprehensive proteomic analysis of exosomes derived from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord mesenchymal stem cells. **Stem Cell Res Ther**, v. 11, n.1, p. 511, 2020.

WIERSINGA, W. J. et al. Host innate immune responses to sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 36-44, 2014.

YANG, S. et al. Protective properties of extracellular vesicles in sepsis models: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. **J Transl Med**, v. 21, n.1, p. 262, 2023.

YAVAGAL, D. R. et al. Efficacy and dose-dependent safety of intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells in a rodent stroke model. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e93735, 2014.

ZHANG, J.et al.The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy.**Stem Cell Res Ther**,v. 6, n. 234, 2015.

ZHANG, Z. et al. The protective effects of MSC-EXO against pulmonary hypertension through regulating Wnt5a/BMP signalling pathway. **J Cell Mol Med**, v. 24, n. 23, p. 13938-48, 2020.

ZHENG, D. et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles improve intestinal barrier function by restoring mitochondrial dynamic balance in sepsis rats. **Stem Cell Res Ther**, v. 12, n. 1, p. 299, 2021.

ZHOU, M.; SIMMS, H. H.; WANG, P. Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 attenuate vascular endothelial cell apoptosis in sepsis. **Ann Surg**, v. 240, n. 2, p. 321-30, 2004.

## ANEXO A - CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ  
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 16 de maio de 2017

Prezada Professora Patrícia Rieken Macedo Rocco

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: “Terapia com Vesículas Extracelulares derivadas de Células Mesenquimais Provenientes da Medula Óssea, Pulmão e Tecido Adiposo em Modelo Murino de Sepsis”, protocolo nº 025/17, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 25/04/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 30/05/2019
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> / C57BL6
Nº de animais	120 animais
Peso/idade	25-30g / 6-12 semanas
Sexo	Machos
Origem	Fundação de Desenvolvimento da UNICAMP (FUNCAMP) - Campinas/SP

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

**ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**

 International Journal of  
*Molecular Sciences*  
an Open Access Journal by MDPI

Indexed in PubMed CITESCORE 6.9 IMPACT FACTOR 6.208

## CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

Certificate of acceptance for the manuscript (ijms-2360157) titled:  
Extracellular Vesicles Released from Different Mesenchymal Stromal Cell Sources Present Distinct Effects on Lung, Kidney, and Liver in Experimental Sepsis

Authored by:  
Natália Goes Blanco; Natália Moura Machado; Ligia Lins Castro; Mariana Alves Antunes; Christina Maeda Takiya; Monique Ramos de Oliveira Trugilho;  
Luana Rocha da Silva; Adriana Franco Paes Leme; Romênia Ramos Domingues; Bianca Alves Pauletti; Beatriz Toja de Miranda; Jonhatas Dutra Silva;  
Claudia C Dos Santos; Pedro Leme Silva; Patricia Rieken Macedo Rocco; Fernanda Ferreira Cruz

has been accepted in *Int. J. Mol. Sci.* (ISSN 1422-0067) on 24 April 2023

 Academic Open Access Publishing  
SINCE 1996

Basel, April 2023