

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Adriana Lima Ferreira

Caracterização do perfil inflamatório do secretoma das células de medula óssea na obesidade e sua influência na expressão de TNF-α no tecido adiposo de camundongos obesos.

> Rio de Janeiro 2024

Adriana Lima Ferreira

Caracterização do perfil inflamatório do secretoma das células de medula óssea na obesidade e sua influência na expressão de TNF- α no tecido adiposo de camundongos obesos.

> Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole Coorientadora: Prof.^a Dra. Erika Cortez

> Rio de Janeiro 2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F383 Ferreira, Adriana Lima.

Caracterização do perfil inflamatório do secretoma das células de medula óssea na obesidade e sua influência na expressão de TNF-α no tecido adiposo de camundongos obesos / Adriana Lima Ferreira. – 2024. 95 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole Coorientadora: Prof.^a Dra. Erika Afonso Costa Marques Cortez

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Obesidade – Complicações – Teses. 2. Síndrome metabólica – Diagnóstico – Teses 3. Medula Óssea – Fisiologia – Teses. 4. Secretoma – Metabolismo. I. Thole, Alessandra Alves. II. Cortez, Erika Afonso Costa Marques. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-056.2-08

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Adriana Lima Ferreira

Caracterização do perfil inflamatório do secretoma das células de medula óssea na obesidade e sua influência na expressão de TNF-α no tecido adiposo de camundongos obesos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de outubro de 2024.

Orientadora:	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ
Coorientadora:	Prof. ^a Dra. Erika Afonso Costa Marques Cortez
	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ
Banca Examinadora	a:
	Prof.ª Dra. Erica Patricia Garcia de Souza
	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ
	Prof.ª Dra. Karina Ribeiro da Silva
	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ
	Prof. ^a Dra. Aline Cordeiro Fernandes Ladeira
	Instituto de Traumatologia e Ortopedia
	Prof. ^a Dra. Juliana de Mattos Coelho Aguiar
	Universidade Federal do Rio de Janeiro
	Prof. ^a Dra. Juliana de Mattos Coelho Aguiar

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente ao nosso senhor Jesus Cristo, pela proteção e força durante esta jornada. Ao meu pai, irmãos e em especial minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao senhor Jesus Cristo, pela proteção ser meu protetor e guia.

Especialmente à minha mãe, Antonieta, que nos seus últimos 2 anos de vida me proporcionaram carinho, conselhos e motivação os quais levarei para sempre. Poderia escrever várias páginas sobre você, mas ainda assim não seriam suficientes para dizer o quanto sinto saudades. Te amo pra sempre.

Ao meu pai, Antonio, com nossas conversas diárias e ensinamentos de vida. Obrigada por todo suporte e por ter você como pai. Você e mamãe são minha inspiração! Aos meus irmãos, que orgulho de vocês, pelo que se tornaram! Alessandro e Bia, o quanto vocês são fortes e que agora estão construindo sua própria jornada. Amo vocês!

Ao meu namorado Daniel, pelo apoio, carinho e companheirismo.

À minha orientadora prof^a Dra Alessandra, coorientadora Erika Cortez e a prof^a Dr^a Laís, que no início, na iniciação científica me receberam de braços abertos na família LPCT e trilhar minha carreira trajetória acadêmica. Obrigada por confiarem em mim! À prof^a Dr^a Simone Nunes, pelas sugestões construtivas que me permitiram enriquecer meu trabalho e cordialidade.

As técnicas do LPCT Karina Ribeiro, Débora Ornelas e Genilza pela grande ajuda ao contribuírem com muitos *feedbacks* construtivos e discussões científicas!

Às ICs Gabi, Júlia e Andreza que me ajudaram nos experimentos. Foi um prazer poder compartilhar um pouquinho do meu conhecimento, neste mundo apaixonante que é ciência!

Aos alunos de pós do LPCT, Gustavo, Ane, Milena, Cris Bastos e Mateus pelos bate-papos com muitas trocas científicas construtivas e conversas descontraídas nos intervalos.

Aos membros do LUBT por me permitirem a utilização do espaço para executar alguns dos meus experimentos.

Aproveito também para agradecer a equipe técnica do departamento de Histologia e Embriologia, Ana Lúcia, Cherley, Verônica, Fábio, Marcelo, Zefa e Bárbara pela cordialidade. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CA-PES) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) pela realização deste projeto.

A coragem é a sua maior defesa. O Senhor dos Anéis: O retorno do rei.

RESUMO

FERREIRA, Adriana Lima. **Caracterização do perfil inflamatório do secretoma das células de medula óssea na obesidade e sua influência na expressão de TNF-α no tecido adiposo de camundongos obesos**. 2024. 95 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, configurando uma grave guestão de saúde pública. Hábitos alimentares inadeguados, sedentarismo, fatores genéticos e socioeconômicos predispõem ao desenvolvimento o quadro de síndrome metabólica na vida adulta, tornando o combate à doenca um desafio. A inflamação crônica no tecido adiposo branco (TAB) reverbera em alterações em diversos órgãos dentre eles a medula óssea (MO). A MO é um órgão difuso, constituído pelas células de medula óssea (CMO) sendo responsáveis pela produção do secretoma. O secretoma de MO é constituído por biomoléculas capazes de promover regulação imune, reparo tecidual e vem sendo considerada uma estratégia promissora no tratamento das doenças metabólicas. Contudo, estudos evidenciam que a obesidade é capaz modular a composição e função do secretoma. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia terapêutica do secretoma na resolução da inflamação crônica no TAB e hiperglicemia. Submetemos camundongos Swiss machos ao modelo de hiperalimentação (GH) ao 3º dia de vida. Aos 90 dias de vida coletamos e plaqueamos 1x10⁵ de CMO para cultivo por 2 dias em P0 e 2x10⁵ de CMO para cultivo em P1 no qual avaliamos o perfil de citocinas presentes no secretoma. Nos ensaios in vivo em animais de 90 dias realizamos aplicação terapêutica de 400µl secretoma ou de 2x10⁵ CMO por via intraperitoneal formando grupo submetidos a terapia com CMO ou secretoma (SB) de animais saudáveis (GH+SBc ou GH+CMOc) e CMO ou SB proveniente de animais hiperalimentados (GH+SBo ou GH+CMOo). Dez dias após a terapia os animais foram sacrificados para mensuração do ganho de massa corporal, peso final, parâmetros biométricos, glicemia e imuno-histoquímica para TNF-α no TAB. Nos resultados do secretoma em P0, as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17 e IL-4 permaneceram significativamente elevadas com redução significativa de IL-10 em GH. Em P1, o secretoma no GH permaneceu com presença significativa apenas do TNFα. Nos ensaios in vivo, o modelo de hiperalimentação foi eficiente na indução do quadro obesogênico, marcado pelo ganho significativo de massa corporal, peso final, hiperglicemia e índice de Lee em GH. A terapia contendo secretoma em GH+SBc promoveu melhora significativa no índice de Lee, glicemia e redução da expressão de TNF-α no TAB. Nem secretoma ou células de medula óssea proveniente de animais hiperalimentados foram eficientes na resolução da hiperglicemia e inflamação no TAB. Esta investigação pode abrir caminho para uma melhor compreensão dos impactos da obesidade nos mecanismos celulares e parácrinos do secretoma, permitindo seleção para fins clínicos e reforçando as pesquisas em prol da terapia com secretoma aplicado à nanotecnologia em portadores de doenças metabólicas.

Palavras-chave: obesidade; terapia celular; células estromais mesenquimais; tecido

adiposo branco; resistência à insulina.

ABSTRACT

FERREIRA, Adriana Lima. *Characterization of the inflammatory profile of bone marrow cells secretome in obesity and Its Influence on TNF-a expression in the adipose tissue of obese mice*. 2024. 95 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Obesity is characterized by excessive accumulation of body fat, representing a serious public health issue. Inadequate eating habits, sedentary lifestyle, genetic, and socioeconomic factors predispose individuals to the development of metabolic syndrome in adulthood, making the fight against this condition a significant challenge. Chronic inflammation in white adipose tissue (WAT) affects various organs, including bone marrow (BM). BM is a diffuse organ, consisting of bone marrow cells (BMCs), which are responsible for producing the secretome. The bone marrow secretome comprises biomolecules capable of promoting immune regulation and tissue repair and is considered a promising strategy for treating metabolic diseases. However, studies show that obesity can modulate the composition and function of the secretome. The objective of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of the secretome in resolving chronic inflammation in WAT and hyperglycemia. We subjected male Swiss mice to a model of overfeeding (OG) from the 3rd day of life. At 90 days, we collected and plated 1x10⁵ BMCs for 2-day culture in P0 and 2x10⁵ BMCs for culture in P1, where we evaluated the cytokine profile in the secretome. In the in vivo assays, animals with 90 days, we performed therapeutic application of 400 µL of secretome or 2x10⁵ BMCs intraperitoneally, forming groups subjected to therapy with BMCs or secretome (SB) from healthy animals (OG+SBc or OG+CMOc) and BMCs or SB from overfed animals (OG+SBo or OG+CMOo). After 10 days therapy, the animals were sacrificed for measurement of body mass gain, final weight, biometric parameters, glycemia, and immunohistochemistry for TNF- α in WAT. In the P0 secretome results, the cytokines TNF-α, IFN-y, IL-2, IL-6, IL-17, and IL-4 remained significantly elevated with a significant reduction in IL-10 in OG. In P1, the secretome in OG remained with a significative presence of TNF- α only. In the in vivo assays, the overfeeding model was effective in inducing an obesogenic condition, marked by significant body mass gain, final weight, hyperglycemia, and Lee index in OG. Therapy containing secretome in OG+SBc promoted significant improvement in Lee index, glycemia, and reduced TNF-α expression in WAT mice. Neither supernatant nor bone marrow cells from overfed animals were effective in alleviating hyperglycemia and inflammation in WAT. This investigation may pave the way for a better understanding of the impacts of obesity on the cellular and paracrine mechanisms of the secretome, allowing selection for clinical purposes and reinforcing research toward secretome-based therapy applied to nanotechnology in individuals with metabolic diseases.

Keywords: obesity; cell therapy; stromal stem cells; white adipose tissue; insulin resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Anatomia da medula óssea	21
Figura 2 -	Esquema ilustrativo dos nichos das células de medula óssea	22
Figura 3	llustração esquemática na hematopoiese na medula óssea	25
Figura 4 -	Secretoma das CEM/CMO e benefícios terapêuticos promovi-	
	dos	29
Figura 5 -	Secretoma e principais características das vesículas extracelulares	
	(VE) e fatores solúveis	32
Figura 6 -	Mecanismo de imunomodulador apresentado pelas CEM	34
Figura 7 -	TNF-α: síntese e liberação	39
Figura 8 -	Inflamação crônica no tecido adiposo branco na obesi-	
	dade	41
Figura 9 -	Obtenção dos grupos experimentais para modelo de obesidade por	
	meio da hiperalimentação	47
Figura 10 -	Obtenção das CMO para cultivo por 2 dias em P0	48
Figura 11 -	Formação dos novos grupos experimentais após o recebimento de	
	células tronco de medula óssea ou secretoma	51
Figura 12 -	Curva de ganho de massa corporal sema-	
	nal	56
Figura 13 -	Gráfico representativo da massa corporal ao fim dos 90 dias de ex-	
	perimento	57
Figura 14 -	gráfico representativo do peso final aos 10 dias após o recebimento	
	da terapia com o secretoma ou células de medula óssea	58
Figuro 15 -	Parâmotros biomótricos aos 00 dias	50
Figura 15 -	Farametros biometricos aos 90 días	09
Figura 16 -	Parâmetros biométricos 10 dias após o recebimento da terapia com	
	secretoma ou células de medula ós-	
	sea	60
Figura 17 -	Gráficos representativos do TITG e área sob a curva aos 90	
	dias	61

Figura 18 -	Gráficos representativos do TITG e área sob a curva após a tera-	
	pia	63
Figura 19 -	Morfologia das CMO em cultivo com 24h em P0	64
Figura 20 -	Expressão de citocinas no secretoma das CMO aos 2 dias em	
	P0	65
Figura 21 -	Morfologia das CMO em P1 aos D2, D5 e D10	67
Figura 22 -	Expressão de citocinas no secretoma de CMO em P1 aos 10	
	dias	68
Figura 23 -	Imuno-histoquímica para TNF-α no tecido adiposo branco epididi-	
	mal aos 90 dias	70
Figura 24 -	Porcentagem de imunomarcação para TNF-α no tecido adiposo	
	branco ependidimal aos 90 dias	70
Figura 25 -	Imuno-histoquímica para TNF-α no tecido adiposo branco epididi-	10
	mal 10 dias após a terapia com secretoma ou CMO	72
Figura 26 -	fotomicrografias das imunomarcação para TNF-α no tecido adiposo	
	branco epididimal 10 dias após a terapia com secretoma ou CMO	
		73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade
AVC	Acidente vascular cerebral
CBA	Cytometric Bead Array
CCL-2	Quimiocina de monócitos-1
CD	Célula dendrítica
CD34	Receptor de membrana 34
CD40	Receptor de membrana 40
CD 80	Receptor de membrana 80
CD 96	Recepto de membrana 96
CLP	Common lymphoid progenitor
CMO	Células de medula óssea
CMP	Common myeloid progenitor
CNA	Comprimento nasoanal
CEM	Células estromais mesenquimais
cKit	Receptor de tirosina cinase
СТМ	Célula-tronco mesenquimal
СТН	Célula-tronco hematopoiética
CXCL9	Fator ligante de quimiocina 9
CXCL10	Fator ligante de quimiocina 10
CXCL11	Fator ligante de quimiocina 11
DOHaD	Associação Brasileira das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da
Doença	
eNOS	Óxido-nítrico sintase 3
FADD	Domínio de morte associada a Fas
GE	Gordura epididimal
GLUT	Transportador de glicose
GLUT-4	Transportador de glicose do tipo-4
GMP	Precursores granulócitos-macrófagos bipotentes
GR	Gordura retroperitoneal

GCL	Ligase de Glutamato-Cisteína
HE	Hematoxilina e eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HLA-DR	Antígenos de histocompatibilidade do loco DR
HR	Hipertensão renovascular
IBRAG/UER	J Instituto de biologia Roberto Alcantara Gomes da Universidade do
	Estado do Rio de Janeiro
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-1RA	Antagonista do receptor de interleucina-1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IKKB	Inibidor do fator nuclear kappa B
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IDO-1	Indoleamina 2,3 Dioxigenase-1
iNOS	Óxido-nítrico sintase induzida
ILVs	Vesículas intraluminais
IRS-1	Receptor de insulina 1
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular
ISEV	Sociedade Intenacional de Vesículas Extracelulares
JNK	c-Jun N-terminal quinase
LT-HSC	Long Time Hematopoietic Stem Cells
ST-HSC	Short Time Hematopoietic Stem Cells
NF-κB	Fator nuclear kappa beta
OMS	Organização Mundial da Saúde
MCP	Precursores de megacariócitos-eritrócitos
MCP-1	proteína quimioatraente de monócitos-1
MEC	Matriz extracelular
MO	medula óssea
MPP	Multipotent progenitor
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	microRNA

MV	microvesículas
MVB	Corpos multivesiculares
NK	Célula natural killer
PRDX5	Peroxirredoxina 5
PRDX6	Peroxirredoxina 6
PDX-1	Homeobox pancreático e duodenal 1
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RI	Resistência à insulina
Sca-1	Antígeno de células-tronco 1
SLAM	Molécula de ativação linfocitária sinalizadora
SNARE	Proteínas solúveis de ligação ao fator sensível a N-etilmaleimida
TGF-β	Fator de transformação beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor de tnf alfa-1
TNFR2	Recepto de tnf alfa-2
TAB	Tecido adiposo branco
TACE	Enzima conversora de TNF-α
TAV	Tecido adiposo visceral
TRADD	Proteína de domínio de morte associado a TNFR1
TRAF-2	Fator 2 associado ao receptor de TNF
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VE	Vesícula extracelular
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por
Inquérito Tel	efônico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
х	Multiplicação
<	Menor
≤	Menor ou igual
α	Alfa
β	Beta
cm	Centímetro
٥C	Graus Celsius
g	Grama
H ₂ O	Molécula da água
KDa	Quilodalton
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mМ	Milimolar
mL	Mililitro
μl	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
rpm	Rotação por minuto
γ	Gamma

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	Terapia celular	19
1.2	Células de medula óssea	20
1.3	Células-tronco hematopoiéticas	23
1.4	Células estromais mesenquimais	25
1.5	Composição do secretoma das CMO	27
1.6	O secretoma e aplicações na imunomodulação	32
1.7	Obesidade	36
1.8	Obesidade e a inflamação do tecido adiposo	37
1.9	CMO na obesidade	42
2	JUSTIFICATIVA	44
3	OBJETIVO	45
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	Animais	46
4.2	Modelo experimental de indução a obesidade	46
4.3	Obtenção das Células de Medula Óssea	47
4.4	Coleta do secretoma em P0 para ensaio de CBA	48
4.5	Coleta do secretoma em P1 para ensaio de CBA e transplante	49
4.6	Transplante das células de medula óssea e do secretoma nos ani-	
	mais hiperalimentados	49
4.7	Ensaio de Cytometric Bead Array (CBA)	51
4.8	Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose (TITG)	52
4.9	Coleta de Dados Biométricos	52
4.10	Processamento histológico	53
4.11	Imuno-histoquímica para TNF-α	53
4.12	Quantificação da marcação de TNF-α	54
4.13	Análise estatística	55

5	RESULTADOS	56
5.1	Dados biométricos	56
5.1.1	Massa corporal	56
5.1.2	Peso final antes e após terapia com secretoma ou células de medula ós-	
	<u>sea</u>	57
5.1.3	Pesagem da gordura epididimal, gordura retroperitoneal, índice de Lee e	
	comprimento naso-anal antes e após terapia com secretoma ou células	
	<u>de medula óssea</u>	58
5.2	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG) antes e após te-	
	rapia com secretoma ou células de medula óssea	60
5.3	Morfologia da cultura de células de medula óssea em P0	64
5.4	Expressão de citocinas das CMO aos 2 dias em P0	64
5.5	Morfologia da cultura de células de medula óssea em P1	66
5.6	Análise do perfil inflamatório do secretoma das CMO em P1	68
5.7	Imuno-histoquímica do tecido adiposo branco	69
6	DISCUSSÃO	74
	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO A - CEUA	91
	ANEXO B - Artigo publicado	92
	ANEXO C - Artigo publicado	93
	ANEXO D - Artigo publicado	94
	ANEXO E - Artigo publicado	95

INTRODUÇÃO

A terapia celular tem se tornado uma importante aliada em tratamentos para reparo e regeneração de tecidos lesionados. Uma das fontes para obtenção de células para esta terapia é a medula óssea. Este tecido esponjoso é encontrado no interior dos ossos longos e esterno, sendo responsável pela hematopoiese(CHEN et al., 2020). Na medula óssea encontramos diferentes populações celulares: células-tronco hematopoiéticas, as células estromais mesenquimais, células endoteliais e adipócitos. Em particular, as células estromais mesenquimais produzem e secretam uma complexa maquinaria de biomoléculas, fatores de crescimento e citocinas capazes de modificar o comportamento de células vizinhas por efeito parácrino, interações célulacélula, além de modularem respostas imunes (VIZOSO et al., 2017; RAHIMI et al., 2021). Em conjunto, esses biofatores ativos compõem o secretoma. A utilização do secretoma das células da medula óssea (CMO) tornou-se uma importante vertente na terapia celular no tratamento de complicações comumente manifestadas na obesidade, como resistência à insulina, inflamação crônica nos tecidos periféricos e hiperglicemia.

A obesidade é uma enfermidade crônica que consiste principalmente no acúmulo de gordura corporal em razão da ingestão calórica excessiva, pouco déficit calórico e ausência ou pouca atividade física. Longe de ser apenas um problema estético, está ligada a várias doenças. Ela tem aumentado significativamente nos últimos anos, sendo declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma epidemia global. Um dos principais fatores do desenvolvimento do estado da obesidade é a inflamação no tecido adiposo, conhecida também como metainflamação, predispondo o risco de complicações cardiometabólicas e de mobilidade.

Estima-se que até 2030, 38% da população mundial estará com sobrepeso e mais de 20% será obesa¹. Diante desse cenário preocupante, a conscientização sobre os riscos associados à obesidade e a busca por um estilo de vida mais equilibrado

¹ Endereço eletrônico referente estimativa para obesidade mundial em 2030. https://www.fiocruzbrasilia.fiocruz.br/quase-metade-dos-adultos-brasileiros-viverao-com-obesidade-em-20-

anos/#:~:text=Em%202030%2C%20a%20estimativa%20para,38%2C2%25%20para%20sobrepeso. Acesso em 27 de agosto de 2024.

são essenciais para o combate da doença. Porém, é comum na prática clínica restrições alimentares severas que nem sempre possuem boa adesão por parte do paciente. O custo do tratamento, reganho de peso e efeitos colaterais indesejados pela medicação são obstáculos ainda existentes (ANDRADE; CESSE; FIGUEIRÓ, 2023). O secretoma tem sido amplamente investigado em ensaios pré-clínicos e clínicos como forma terapêutica no tratamento das doenças metabólicas como diabetes do tipo 2, resistência à insulina e hiperglicemia. Porém, a investigação acerca de como a obesidade poderia modular a capacidade terapêutica do secretoma ainda é pouco esclarecido. A compreensão das modificações geradas no perfil inflamatório e na eficiência terapêutica do secretoma das células de medula óssea pode ser primordial na tomada de decisão no desenvolvimento de estratégias terapêuticas na medicina personalizada.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Terapia celular

Nos últimos anos, a utilização de células-tronco (CT) tem se mostrado uma estratégia promissora no campo terapêutico. Essa terapia envolve a manipulação de células com auxílio da bioengenharia, visando a regeneração de tecidos lesionados, ou reposição de células não funcionais por células funcionais. As CT possuem a capacidade de se autorrenovar e diferenciar em diferentes tipos celulares, o que as torna muito atraentes para a terapia celular. Elas podem ser utilizadas para reparo tecidual ou para impedir a progressão de doenças específicas, como resistência à insulina (RI) e diabetes do tipo 2 (DT2) (Paris et al., 2021; Ferreira et al., 2022).

A utilização das CT ganhou força, inicialmente, com a descoberta de diferentes tipos de CT humanas: as CT embrionárias, derivadas da massa celular interna dos blastocistos (embrioblasto) de mamíferos, que se proliferam e preservam a pluripotência mesmo *in vitro*, sendo capazes de originar diferentes tecidos do organismo. Contudo, problemáticas que envolvam a possibilidade da geração de teratomas e rejeição imunológica causaram declínio do uso das CT embrionárias (Iltis et al., 2023). Outra categoria de CT, são as de células de pluripotência induzida (iPSC), aquelas provenientes de células adultas reprogramadas à pluripotência de maneira artificial, metodologia implementada por Takahashi e Yamanaka, em 2006. (Takahashi; Yamanaka, 2006; Teramura; Frampton, 2013). Ao passo que o uso dessas técnicas permitiu avanço em pesquisas na medicina regenerativa, questões éticas levantaram debates acerca do uso em humanos. (Rohban; Pieber, 2017).

As CT adultas, ou somáticas, são células raras e indiferenciadas distribuídas entre células especializadas em tecidos de um organismo desenvolvido. Possuem potencial de renovação e diferenciação mais limitado que as iPSC. Elas podem substituir células perdidas ou auxiliarem no crescimento das células vizinhas, dando origem a células precursoras ou progenitoras que formarão células diferenciadas. Elas podem ser encontradas no tecido adiposo, sangue periférico e medula óssea (Rohban; Pieber, 2017; Jovic et al., 2022). Esta última fonte, tem sido amplamente empregada, na substituição de células por lesão, doença ou mesmo na atenuação de respostas inflamatórias como na Covid-19 (Saldanha-Araujo et al., 2020; Paris et al., 2021). Nesse quesito, as CTs adultas mais investigadas são as célula-tronco hematopoiéticas (CTH) e células mesenquimais provenientes da medula óssea.

1.2 Células de medula óssea

As células de medula óssea (CMO) estão abrigadas no interior da medula óssea (MO), a qual é organizada anatomicamente no canal medular dos ossos longos e chatos, ocupando os espaços entre as trabéculas ósseas. A MO é um tecido heterogêneo que participa ativamente do metabolismo, abrigando e regulando a formação das células sanguíneas, como células da linhagem hematopoiética, os adipócitos, condrócitos, osteoblastos, células endoteliais e células estromais. Os vasos sanguíneos encontram-se distribuídos por todo o tecido ósseo, exceto em áreas cartilaginosas. O sangue oxigenado adentra a superfície óssea, ramifica-se para alimentar os sinusoides que se aglutinam formando o seio central da circulação venosa de capilares fenestrados. Isso permite que as células entrem e saiam da circulação, ao passo que também carreiam nutrientes e fatores de crescimento denominados fatores angiócrinos para interior medular. As fibras nervosas complementam a composição interna da MO (Morrison; Scadden, 2014; Calvi; Link, 2015; Sebo et al., 2019; Chen et al., 2020) (Figura 1).

A MO pode ser classificada em medula vermelha, que realiza renovação das células sanguíneas de forma ativa, ou medula amarela, rica em adipócitos que permeiam o espaço intertrabecular. Após o nascimento, todos os ossos longos e chatos são ricos em MO vermelha que, com o avançar da idade, é substituída pela MO amarela. A MO é o único tecido em que os adipócitos e as células ósseas estão em estreita justaposição. Sugere-se que os adipócitos presentes na medula são uma quarta população diferente de tecido adiposo, no qual possuem capacidade de modular positivamente ou negativamente a densidade óssea e a hematopoiese.



Figura 1 - Anatomia da medula óssea.

Legenda: A medula óssea é um órgão complexo contendo diferentes tipos celulares, que são circundados por osso vascularizado, inervado e com projeções das trabéculas ósseas em seu interior. Esta configuração é presente na metáfise óssea com presença de inúmeras células próximas a superfície óssea.

Fonte: Adaptado de Sabry et. al 2020.

A MO é o tecido mais amplamente descrito como a primeira fonte de isolamento de CT. Nela, encontramos duas grandes populações: as células-tronco hematopoiéticas (CTH), constituído pelas linhagens mieloide, linfoide e eritróide e as células-tronco mesenquimais (CTM). As CTM representam um número limitado de células com capacidade de autorrenovação e diferenciação comprovada *in vivo*. O termo foi primeiramente atribuído por Caplan em 1990, e passou por diferentes nomenclaturas para denominá-las. Todavia, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (2006) propôs a nomenclatura de células estromais mesenquimais (CEM) como terminologia mais adequada. Em 2017, Caplan propôs rebatizá-las de "células de sinalização medicinais" em razão do potencial terapêutico advinda das CEM, porém, este termo ainda se encontra em ampla discussão (Dominici *et al.*, 2006; Caplan, 2017).

A MO é um tecido altamente dinâmico que sustenta a homeostase e geração das CTM e CTH. Para isso, os nichos, são divididos principalmente em nichos endosteais, localizados próximos à superfície óssea, e nichos vasculares, próximos aos sinusóides, sendo sugeridas como um importante participante no nicho de CTHs. Ambos os nichos fornecem suporte estrutural e secretam fatores solúveis, como quimiocinas e citocinas. Essas células incluem células reticulares abundantes (células CAR) ricas em fator ligante de quimiocina 12 (CXCL12) e *stem cell factor* (SCF). Outros tipos celulares atuantes nos nichos das CMO são as células estromais que expressam LepR, células endoteliais, células perivasculares, adipócitos, osteoblastos, nervos simpáticos e células de Schwann não mielinizadoras e células estromais mesenquimais. Essas interações são críticas não apenas para a manutenção da hematopoiese, mas também para respostas a danos teciduais e condições inflamatórias (Asada; Takeishi; Frenette, 2017; Gomes Da Silva, 2017; Ferreira, 2020) (figura 2).



Figura 2 – Esquema ilustrativo dos nichos das células de medula óssea.

Legenda: A medula óssea contém diversos tipos celulares constitutivos como células-tronco hematopoiéticas (HSC), células estromais mesenquimais (CEM) e células peri-sinusoidais que expressam LepR que desempenham papéis importantes na manutenção ou mobilização das CMO em formação. (CMO) células de medula óssea. (LepR) Receptor de leptina. Fonte: Adaptado de Asada, Takeishi, & Frenette, 2017.

1.3 Células-tronco hematopoiéticas

As CTH possuem a capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em células especializadas do tecido sanguíneo, incluindo células da linhagem mieloide e linfoide. Podem ser encontradas no sangue periférico, medula óssea e cordão umbilical. Originam células progenitoras capazes de promover expansão de uma linhagem de células totalmente diferenciadas conforme o tipo celular. Em abordagens terapêuticas, as CTH são utilizadas na substituição ou repovoamento das células sanguíneas. Alguns dos marcadores clássicos que permitem identificar as CTH são o cluster de diferenciação 34 (CD34⁺), antígeno de células-tronco 1 (Sca-1), receptor de tirosina cinase (c-Kit) e o marcador da molécula de ativação linfocitária sinalizadora (SLAM), utilizados em diferentes linhas de pesquisa (Cheng et al., 2020; Lee; Hong, 2020). As CTH são uma ferramenta poderosa para tratamento de doenças como neoplasias hematológicas, doenças hepáticas e distúrbios sanguíneos. O tecido sanguíneo é altamente regenerativo e a MO fornece suporte para manter a homeostase das células sanguíneas como forma de compensar a apoptose celular diária (Lee; Hong, 2020). As CTH progenitoras ocupam a região endosteal subdividindo-se em 2 regiões: região de endósteo, próxima a superfície interna óssea e região perivascular, sendo esta última próximas às arteríolas e sinusóides com participação direta das CEM na regulação e diferenciação das CTH (Kunisaki et al., 2013; Lee; Hong, 2020). Numerosos trabalhos descobriram que a quiescência e ativação de CTH pode ocorrer por fatores genéticos, epigenéticos e moléculas-chave, bem como por fatores ambientais. As CTH podem ser subdivididas em CTH de longo prazo, do inglês long time hematopoietic stem cells (LT-HSC) e de curto prazo, do inglês short time hematopoietic stem cells (ST-HSC), além de progenitor multipotente ou multipotent Progenitor (MPP). As LT-HSC são quiescentes e sustentadas pela divisão celular interrompida no nicho endosteal, ao passo que as ST-HSC são prontamente diferenciadas em células da linhagem mieloide e linfoide no nicho vascular (Lee; Hong, 2020). A partir das MPPs, ocorre uma separação rigorosa entre os comprometimentos nos ramos dos progenitores mielóide ou common myeloid progenitor (CMPs) e progenitores linfoide, ou common lymphoid progenitor (CLPs) (Cheng; et al, 2020).

No ramo mielóide, darão origem a todas as células sanguíneas. As CMPs originarão os precursores de megacariócitos-eritrócitos (MEP) ou os granulócitos-macrófagos bipotentes (GMP). Por meio de estímulos específicos, essas 2 populações se comprometerão com linhagens de células maduras que formando os monócitos a partir dos monoblastos, eritrócitos de eritroblastos, plaquetas a partir dos megacariócitos, e granulócitos que originando neutrófilos, eosinófilos e basófilos por meio do processo denominado de mielopoiese. Vale ressaltar que a linhagem CMP é regulada por citocinas extrínsecas e fatores de transcrição intrínsecos(Kunisaki et al., 2013; Le; Hong, 2020).

No ramo linfoide teremos a formação de células do sistema imune inato e adaptativo que compreende as células T, B e natural killer (NK) no processo intitulado de linfopoiese (Kunisaki et al., 2013; Cheng et al, 2020) (Figura 3). À medida que se diferenciam, populações formam um modelo de hierarquia equilibrada, no qual fatoreschave de transcrição e de citocinas conduzem precisamente a diferenciação gradual das CTH para células sanguíneas maduras (Cheng et al., 2020). Por isso, conhecer as propriedades das CTH é muito importante para potencializar os efeitos terapêuticos nas aplicações clínicas.



Figura 3 – Ilustração esquemática na hematopoiese na medula óssea.

Legenda: Na medula óssea as CTH possuem capacidade de autorrenovação e diferenciação nas linhagens das células mielóide e das células linfoides. Este processo passa por diferentes etapas que ao fim gerarão as células sanguíneas maduras.

Fonte: Adaptado de Lee & Hong, 2020.

1.4 Células estromais mesenquimais

As CEM foram descritas por Friedenstein e colaboradores (1976). A partir daí, investigações realizadas para caracterização dessas células isoladas as identificaram como uma população de células aderentes, de morfologia fibroblastóide e capacidade de diferenciação *in vitro* em osso, cartilagem e tecido adiposo dentre outros tecidos mesenquimais. As CEM Podem ser obtidas de diferentes fontes como, polpa dentária, tecido adiposo, cordão umbilical e MO, sendo esta última a principal fonte de obtenção (Fernández-Francos *et al.*, 2021; Gugliandolo; Mazzon, 2022). Com o refinamento das técnicas de biologia molecular, desde 2006, a ISCT considera a classificação da CEM

conforme os seguintes critérios: expressão positiva (\geq 95%) de antígenos de superfície cluster de diferenciação 105 (CD105), cluster de diferenciação 73 (CD73) e cluster de diferenciação 90 (CD90). São negativas (\leq 2%) para cluster de diferenciação 45 (CD45), cluster de diferenciação 34 (CD34), cluster de diferenciação 14 (CD14), ou cluster de diferenciação 11b (CD11b), cluster de diferenciação 79α (CD79α) ou cluster de diferenciação 19 (CD19) e antígeno de classe II do complexo de histocompatibilidade (HLA-DR) (Dominici *et al*, 2006). Isto somada as características, como aderência ao plástico e de diferenciação em condroblastos, adipócitos e osteoblastos.

Durante o desenvolvimento embrionário, as CEM humanas podem ser identificadas no fígado fetal na 7ª semana, no sangue fetal e na medula óssea a partir da 10ª semana sendo originárias do mesoderma. Há evidências que as CEM são provenientes das células perivasculares que emigram para as paredes dos capilares nos tecidos fibrosos circundantes durante o desenvolvimento. Esse achado pode fornecer novos *insights* para melhor compreensão da origem e desenvolvimento das CEM(Li; Zhao; Wang, 2021). Há uma ampla discussão se as CEM são continuamente reabastecidas pela MO ou se seriam tecido específicas com destino determinado ao longo do desenvolvimento. Outro tipo de células-tronco atribuídas como mesenquimal/estromal são as células-tronco derivadas da polpa dentária (CDPD), que diferentemente, são originárias do ectoderma. Investigações recentes descrevem propriedades básicas entre a CEM e CDPD como semelhante, diferindo quanto a capacidade de resposta à inflamação (Zhou; Shi, 2023).

As CEM constituem uma população rara de progenitores multipotentes que participam da homeostase tecidual, renovação celular e sendo coadjuvantes na regulação da hematopoiese. Além disso, nos últimos anos, as CEM vêm sendo caracterizadas como importantes reguladoras de resposta imune quando utilizadas na forma terapêutica no tratamento de doenças, como acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão, DT2 e hiperglicemia. Em achados recentes na literatura, a interação das CEM com o sistema imune é descrita como reguladora de respostas do tipo TH₁/TH₂ mantendo o balanço anti e pró-inflamatório por meio da liberação de citocinas, fatores solúveis e interações com células do sistema imune de maneira a mitigar a ativação das células natural killer (NK) e células dendríticas (CD) (Gao *et al*, 2016; Ferreira *et al*, 2018, 2022; Paris *et al*, 2021).

Os mecanismos de como ocorre a interação entre CEM e o sistema imune ainda são um desafio a ser elucidado, e, diferentemente das propriedades constitutivas de diferenciação e proliferação, o fenótipo imunomodulador da CEM parece ser em razão do microambiente, em particular, a presença de células inflamatórias e citocinas (Chen et al, 2021). A ação imunomoduladora apresentada pelas CEM ocorre principalmente por ação parácrina ou interações célula-célula. Ainda que os efeitos promissores da terapia utilizando as CEM sejam inegáveis, foi mostrado que após infusão intravenosa, rota mais comumente utilizada, há retenção de células, principalmente nos pulmões, compondo áreas com acúmulo de células (Gao et al, 2001; Chen et al., 2021). Recentemente, outra alternativa de terapia que vem ganhando atenção na pesquisa é a utilização do subproduto das CEM, denominado secretoma constituindo grande vantagem por ser terapia livre de células, de não carcinogenicidade quando comparada a utilização das CEM. (Bochon et al., 2019; Harrell et al., 2019; Pittenger et al., 2019; Paris et al., 2021; Ferreira et al., 2022). Em razão das CEM por serem bastante responsivas a inflamação nos tecidos, reparo tecidual e imunomodulação para reprogramação do ambiente inflamatório. Uma outra hipótese descreve que as CEM após a injeção sofrem apoptose e são fagocitadas pelas células imunes como monócitos e macrófagos que por sua vez se tornariam células anti-inflamatórias (Zhou; Shi, 2023).

1.5 Composição do secretoma das CMO

Inicialmente, o interesse na utilização das CEM/CMO ocorreu em virtude da capacidade de diferenciação das células estromais, sendo utilizadas em modelos de reparo tecidual em órgãos lesionados e doenças. Porém, alguns dos obstáculos enfrentados para utilização das CEM/CMO são a plasticidade celular, disponibilidade limitadas, falta de padronização nas técnicas de isolamento e armazenamento no cultivo *in vitro* (ex: plaqueamento, passagens e coleta de células), o que pode gerar resultados divergentes entre autores. Além disso, pesquisadores esbarram na problemática de que as células não sobrevivem na região transplantada a longo prazo. Por isso, novas abordagens terapêuticas começaram a ser exploradas, e a terapia baseada no secretoma passou a entrar em ascensão (Pittenger *et al.*, 2019; Munoz-Perez *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2022).

O secretoma é definido como conjunto de biomoléculas liberadas pelas células, tecido e organismo por diferentes vias secretórias como forma de comunicação parácrina (Vabret et al., 2020; Munoz-Perez et al., 2021; Selvaraj et al., 2023). Nele compreendem: fatores de crescimento, citocinas, microvesículas, exossomos e microR-NAs, podendo sintetizados por meio de condicionamento no cultivo celular. Pesquisadores tem se debruçado na utilização do secretoma em aplicações locais nos tecidos/órgãos lesionados como estratégia terapêutica em modelos animais e em ensaios clínicos em humanos (Eleuteri; Fierabracci, 2019; Bari et al., 2020; Munoz-Perez et al., 2021; Verma et al., 2021; Ferreira et al., 2022). A utilização do secretoma oferece diversas vantagens frente a utilização das CTs, dentre elas incluem: minimização da formação de trombos, armazenamento sem a necessidade de utilização de criopreservadores que são citotóxicos, produção em larga escala conforme a demanda do laboratório produtor e ausência de procedimentos invasivos para retirada de células (Fernández-Francos et al., 2021). Um exemplo disso é que diferentemente a terapia utilizando células, são necessárias para obtenção seria realizada apenas uma coleta no doador para produção inicial secretoma e as subsequentes obtenções poderiam ser obtidas por metodologias de cultivo in vitro. Outras vantagens do uso dos secretoma incluem inibição da diferenciação celular indesejada, problema comum na terapia tradicional utilizando CT, o que confere uma alternativa farmacológica para tratamento de doenças inflamatórias, melhora da função cardíaca e alívio da severidade da Covid-19 (Harrell et al., 2019; Ferreira et al., 2022) (Figura 4).





Legenda: O secretoma é rico em fatores solúveis e vesículas extracelulares. As VE compreendem as microvesículas e exossomos ricos em RNAs e miRNAs. (VE) Vesículas extracelulares.

Fonte: Adaptado de Ferreira et. al 2022.

Os componentes do secretoma podem ser classificados em 3 diferentes partes. A primeira delas é formada pelas vesículas extracelulares (VE) em que segundo definição da Sociedade Internacional para Vesículas Extracelulares (ISEV), compreendem partículas envoltas por uma bicamada lipídica, sem capacidade de autorreplicação, rica em tetraspaninas, integrinas e proteínas envolvidas na adesão, circulação e atividade das VE (Welsh *et al.*, 2024). As VE podem ser subdividas em corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos. A classificação em subtipos de VE ocorre em razão do tamanho, diferença de marcadores específicos, e metodologias de separação. Dentre os métodos mais utilizados que permitem estudar os subtipos de VE estão a precipitação baseada em polímero, a cromatografia por exclusão de tamanho e a ultracentrifugação (Munoz-Perez *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2022).

Os corpos apoptóticos são os maiores tipos de VE. Possuem 1000nm, são formados em razão da morte programada com o condensamento da cromatina e fragmentação das organelas celulares para serem fagocitados. Possuem marcação característica para Capase-3 e Anexina-V (Fernández-Francos *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2022).

Baseado na aplicabilidade para terapia celular, os exossomos são uma categoria de VE que tem sido profundamente investigada. O padrão ouro para obtenção é por meio do método de ultracentrifugação. São formados por uma esfera de bicamada lipídica e possuem tamanho entre 30nm e 150nm. A biogênese dos exossomos envolve várias etapas, sendo sintetizados pela via endossomal. Primeiro, ocorre a invaginação da membrana plasmática ou brotamento das membranas das organelas intracelulares, formando endossomo inicial. Em seguida, ocorre a formação das vesículas intraluminais (ILVs) à medida que os endossomos iniciais invaginam para o interior da célula, dando origem aos corpos multivesiculares (MVBs). As ILVs contidas no interior dos MVBs podem seguir 2 caminhos: serem degradadas no lisossomo, ou, serem transportadas para membrana plasmática para serem liberadas por exocitose, quando passam a ser chamadas exossomos. Após a formação, os exossomos liberados podem chegar à célula-alvo de forma parácrina ou por meio da circulação. Ao final, eles são internalizados por endocitose ou fusão com a membrana da célula-alvo, liberando seu conteúdo capaz de modular as vias de sinalização intracelular. Isto permite estabelecer comunicação com células vizinhas, por meio da liberação de proteínas, DNA e miRNA não codificantes. Alguns dos marcadores já identificados são CD9, CD63, CD81 e CD79 (Zhu et al., 2015; Liu et al., 2017; Hu et al., 2022). Na literatura, a investigação em torno dos exossomos, especificamente dos miRNAs, vem atraindo destaque por apresentar papel imunomodulador e de regeneração. Em humanos, alguns ensaios clínicos de fase I/II vêm sendo realizados em pacientes de síndrome respiratória aguda, Alzheimer e diabetes (Sun et al., 2018; Ashrafizadeh et al., 2022). Em animais, a utilização dos exossomos tem sido aplicada em modelos como regeneração cutânea (Hu et al., 2022), diabetes mellitus e Covid-19 (Jamshidi et al., 2021). Este subtipo de VE vem sendo considerada uma abordagem promissora, porém, ainda requer maiores investigações para caracterização, preservação da estabilidade e padronização de dosagem terapêutica para futuras aplicações de forma personalizada (Fernández-Francos *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2022; Lotfy; Aboquella; Wang, 2023).

As microvesículas (MVs) também denominadas em inglês "shedding vesicles" possuem tamanho entre 100nm e 1000 nm. São formadas por meio de brotamento da membrana plasmática da célula de origem e requer reorganização do citoesqueleto (actina, microtúbulos e proteínas motoras) com liberação dependente de Ca²⁺ intracelular. Um dos principais marcadores de superfície já identificados é o CD40. Sua membrana é enriquecida em colesterol, esfingomielina, ceramidas e tetraspaninas. O interior das MVs é rico em mRNAs e miRNAs. A fusão entre as MVs e a membrana celular das células alvo ocorre por meio das proteínas de fusão denominada de proteínas solúveis de ligação ao fator sensível a N-etilmaleimida (SNAREs). O número de MVs pode variar em razão das características do doador. Da mesma forma, o número de VE consumidas depende do estado fisiológico e do microambiente das células receptoras. Assim como os exossomos, as MVs eram entendidas inicialmente como "lixo celular", sem função biológica relevante. Porém, desde que foi entendida como sendo capaz de alterar a atividade das células receptoras, estimularam o interesse global. Porém, lacunas ainda precisam ser preenchidas para melhor compreensão do potencial terapêutico apresentando por este subtipo VE. Propõem-se que as MVs possuam aplicações clínicas semelhantes aos exossomos (Doyle; Wang, 2019; Fernández-Francos et al., 2021; Ferreira et al., 2022).

Por fim, diferentemente das VEs, temos os fatores solúveis. Nesta categoria enquadram-se as citocinas, fatores de crescimento, fatores angiomoduladores, neutrotrofinas, fatores imunomoduladores que em conjunto com as VEs, compõem o potencial terapêutico do secretoma. Algumas das biomoléculas mais investigadas estão o fator de transformação- β (TGF- β), fator de crescimento de hepatócito (HGF), indolamina 2,3-dioxigenase-1 (IDO-1), interleucina 10 (IL-10), antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) e prostaglandina E₂ (PGE2) (Curley *et al.*, 2012; Harrell *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2022; Selvaraj *et al.*, 2023) (Figura 5).

Figura 5 - Secretoma e principais características das vesículas extracelulares (VEs) e fatores solúveis.



Legenda: O secretoma das CMO é composto por biomoléculas responsáveis pelos efeitos terapêuticos. As vesículas extracelulares podem ser classificadas em microvesículas ou exossomos com diferentes marcadores de superfície, composição e tamanho. Os fatores solúveis podem se diferenciar em citocinas e fatores de crescimento.

Fonte: A autora, 2024.

1.6 O secretoma e aplicações na imunomodulação

As CEM, evidentemente, apresentam papel imunomodulador na resposta imune inata e adaptativa. Elas não expressam receptores específicos que permitam o reconhecimento (MHC II, CD40, CD80 e CD96) e resposta imune do hospedeiro. Em razão disso, o secretoma exerce efeitos da resposta imune como: ativação, proliferação e diferenciação de subpopulações de células-T. Na imunidade inata, os efeitos parácrinos giram em torno das células natural killer (NK), células dendríticas (CD), neutrófilos e macrófagos. Até o momento, existem cerca de 22 ensaios clínicos no mundo (www.clinicaltrials.gov)² utilizando o secretoma das células estromais mesenquimais como terapia (sendo apenas 1 no Brasil)³ no tratamento de doenças como osteoartrite, Covid-19 e diabetes. Na fase pré-clínica, há uma tendência crescente nos estudos utilizando modelos animais, cultivo 3D e bioengenharia de tecidos para avaliar a eficácia e segurança da ação do secretoma na atenuação de resposta próinflamatórias (Harrell *et al.*, 2019; Pittenger *et al.*, 2019).

Alguns dos exemplos de biomoléculas que interagem com o sistema imune temos o IDO-1, IL-10, IL-1Ra e PGE2 (HARRELL *et al.*, 2019). Em um experimento utilizando o secretoma das CEM, o TGF- β foi capaz de atenuar a proliferação de linfócitos-T CD4⁺ helper e linfócitos-T CD8⁺ citotóxicos por meio da permanência em fase G1 do ciclo celular. No também é encontrada a trombospondina-1 (TSP1) que participa da supressão da via TGF- β /Smad2/3, atenuando a proliferação e citotoxicidade mediada pelas células NK. Riazifar e colaboradores (2019) constataram que os exossomos das CMO bioestimuladas com IFN- γ eram capazes de promover a liberação de idoleamina 2,3-desixogenase (IDO) e a proliferação de linfócitos T_{reg} em modelo de encefalomielite autoimune experimental (Riazifar *et al.*, 2019).

A indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima essencial envolvida na regulação imune e na tolerância imunológica. Ela atua metabolizando o aminoácido triptofano em quinurenina. Este processo enzimático exerce efeitos imunomoduladores profundos, especificamente na regulação das respostas nas células T e na promoção da tolerância imunológica. A IDO também é capaz de estimular a polarização dos macrófagos no tipo M2, caracterizado pela produção de IL-10, e por estimular a proliferação de células T_{reg} (Riazifar *et al.*, 2019; Munoz-Perez *et al.*, 2021). Já a prostaglandina-E₂ (PGE₂) e proteína do gene 6 estimulada por TNF (TSG-6), são biomoléculas anti-inflamatórias derivadas das células mononucleares de medula óssea e CEM provenientes do cordão umbilical de humanos/murinos. Juntas, a PGE₂ e TSG-6 partici-

² Endereço eletrônico referente com os estudos clínicos utilizando o secretoma das células estromais mesenquimais de forma terapêutica no mundo: https://clinicaltrials.gov/search?intr=Mesenchymal%20Stem%20Cell%20secretome/<u>.</u> Acesso em 25 julho de 2024.

³ Endereço eletrônico referente com os estudos clínicos utilizando o secretoma das células estromais mesenquimais de forma terapêutica no Brasil. https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04998058?term=conditioned+medium&map_cntry=BR&draw=2&rank=1. Acesso em 30 de agosto de 2024.

pam da inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios secretados pelas células NK e CD. Por último, quimiocinas como o fator ligante de quimiocina 9 (CXCL9), fator ligante de quimiocina 10 (CXCL10) e fator ligante de quimiocina 11 (CXCL11) participam no recrutamento de linfócitos T_{reg} para o local lesionado. Os linfócitos T_{reg} atuam estimulando a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS), liberando óxido nítrico (NO). Isto permite a atenuação da atividade dos linfócitos-T CD8⁺ (Riazifar *et al.*, 2019) (Figura 6).



Figura 6 - Mecanismo de imunomodulador apresentado pelas CEM.

Frente a presença de citocinas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL1- β e IL-17, as CEMs presentes nas células de medula óssea (CMO) exercem propriedade imunoreguladoras por meio da liberação de vesículas extracelulares e fatores solúveis. Esses componentes são responsáveis por atenuar a proliferação e função das células imunes pró-inflamatórias. Em contrapartida, temos o estímulo proliferativo dos macrófagos M2 e células T_{Reg}.

Fonte: Adaptado de Chen et. al, 2020.
Recentemente, publicamos um artigo relacionando o secretoma e as aplicações na nanotecnologia. Nesse campo, o emprego do secretoma vem sendo amplamente investigado no delineamento de diferentes estratégias: 1. Terapia livre de células, que consiste em selecionar biomoléculas adequadas de acordo com a necessidade terapêutica. Nesta alternativa, há ausência de procedimentos invasivos tornando-a uma alternativa eficiente e segura frente às terapias tradicionais que utilizam células. 2. Pré-condicionamento com citocinas específicas: esta técnica permite a modulação dos componentes do secretoma produzido pelas CEM utilizando citocinas ou fatores de crescimento. Esta abordagem visa a personalização do secretoma para atingir objetivos terapêuticos específicos. 3. Combinação com nanopartículas: Consiste na utilização das VE das CEM para aprimorar a entrega direcionada de medicamentos. A técnica utiliza as CEM combinadas as nanopartículas ou VE como carreadoras visando melhorar o acesso dos medicamentos aos tecidos-alvo, reduzindo a toxicidade e aumentando a eficácia terapêutica (Ferreira *et al.*, 2022).

Dias e colaboradores (2021) realizaram interessantes achados em análises comparativas do secretoma em cultivo 3D e 2D de células mesenquimais do tecido adiposo. No cultivo 3D, os níveis de IL-6 e IL-2 mostram-se elevados ao passo que a expressão de IL-4 foi diminuída em comparação ao cultivo 2D. Ao realizar a terapia em camundongos com diabetes do tipo 1, o secretoma proveniente do cultivo em 2D foi capaz de promover a expressão do homeobox pancreático e duodenal-1 (PDX-1) no pâncreas e redução da glicemia sanguínea (Dias *et al.*, 2021). O PDX-1 é uma importante proteína relacionada ao desenvolvimento do pâncreas, especificamente na neogênese (diferenciação) de células β para secreção de insulina e também atua na manutenção das células β já maduras (Zhang *et al.*, 2022).

Nos rins, a obesidade também é capaz de prejudicar a função renal. Em um estudo conduzido em camundongos com nefropatia diabética, caracterizada pela ativação e proliferação de fibroblastos e deposição de matriz extracelular (MEC), a infusão do secretoma de células estromais mesenquimais do cordão umbilical foi capaz de aliviar a albuminúria, lesão glomerular e fibrose renal (Li *et al.*, 2020). Em nosso grupo, as CEM da MO transplantadas na cápsula renal promoveram remodelação do parênquima renal em rins fibrosados de ratos com nefropatia hipertensiva, regulando o balanço das metaloproteinases da matriz (MMP) MMP-2/-9 e inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz (TIMP) TIMP-1/2, além de promover a mudança de um ambiente pró-inflamatório com presença de TNF-α para um ambiente anti-inflamatório com aumento de IL-10 (Almeida *et al.*, 2022). É inegável que o secretoma das CEM, assim como de outras fontes de obtenção de células estromais, detenha ações de modulação imunitária, modificação da morfologia e expressão de receptores (Harrel *et al.*, 2019).

Porém, paralelamente a expansão da aplicabilidade do secretoma em diferentes vertentes, houve um movimento crescente em busca de elucidar como complicações fisiopatológicas decorrentes da obesidade, poderiam alterar o potencial terapêutico do secretoma.

1.7 Obesidade

A obesidade é um problema enfrentado pela população global e tem sido enfrentada como um dos principais problemas de saúde pública, com crescimento mundial de maneira significativo e constante. Dados divulgados em 2022 pela Organização OMS mostraram que 2,5 bilhões de adultos em todo mundo estavam com sobrepeso, e mais de 890 milhões de pessoas conviviam com a obesidade sem distinção entre classe social ou nacionalidade (Francisqueti; Nascimento; Corrêa, 2015; WHO, 2022).

No Brasil, dados fornecidos pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM) apontam aumento da prevalência dos casos nas últimas décadas. Em 2021, uma pesquisa realizada pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) mostrou que a obesidade em adultos atingiu cerca de 22,4% da população brasileira, representando 22,6% das mulheres e 22% homens (Ministério Da Saúde, 2021; Sociedade Brasileira De Cirurgia Bariátrica E Metabólica, 2022). Indivíduos obesos têm três vezes mais chances de serem hospitalizadas com COVID-19, uma vez que é comum a coexistência das complicações metabólicas, que em casos mais graves elevam o risco de mortalidade (Abdelaal; Le Roux; Docherty, 2017; Paris *et al.*, 2021; Kirichenko *et al.*, 2022). Por ser de origem multifatorial, a etiopatogênese e evolução da doença apresentam grande complexidade. Para isso, é essencial a atuação da medicina preditiva para frear a evolução da comorbidade e dos casos fatais. No campo da ciência, pesquisadores se debruçam em torno de novas estratégias que possam ser utilizadas de forma combinada para mitigar os efeitos gerados pela síndrome metabólica (Vaamonde; Álvarez-Món, 2020).

1.8 Obesidade e a inflamação do tecido adiposo

No cenário endocrinológico é amplamente aceito que o tecido adiposo branco (TAB) é um importante órgão multifuncional. É constituído por adipócitos em desenvolvimento (pré-adipócitos), adipócitos maduros, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, neutorófilos, eosinófilos, células T e células B, constituindo um "crosstalk". O TAB também é conhecido por ser um órgão imunometabólico (Vieira-Potter, 2014; Lacerda; Malheiros; Abreu, 2016). Nele, são produzidos hormônios, fatores de crescimento e moléculas bioativas denominadas de adipocinas que, em conjunto, participam na regulação dos processos metabólicos, como oxidação de ácidos graxos, captação de glicose e regulação da ingesta alimentar (Smadja *et al.*, 2012; Biondi *et al.*, 2022).

O TAB possui ampla distribuição e de acordo com a localização pode ter diferentes classificações. O TAB localizado na região subcutânea encontra-se sob a pele, na região abdominal e coxas em que possui função protetora e com menor risco metabólico. Por outro lado, o TAB visceral que reveste os órgãos internos, como rins, intestino e coração e é relacionado ao maior risco de doenças cardiovasculares e metabólicas. Outro tipo de TAB é o bege, correlacionado a dissipação de energia quando ativado, caracterizado por inúmeras gotículas lipídicas e com mitocôndrias abundantes. O TAB bege é derivado de precursores do tecido adiposo branco, mas pode ser "ativado" para se comportar como tecido adiposo marrom, contribuindo para o balanço energético (Luong; Huang; Lee, 2019). Ele também é um dos principais responsáveis em alterações relacionadas a inflamação e modulação da sensibilidade à insulina (Lacerda; Malheiros; Abreu, 2016; Burhans *et al.*, 2018; Biondi *et al.*, 2022). Dentre as principais adipocinas atuantes nesse quadro, temos o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) também conhecida como ligante de quimiocina-2 (CCL-2), e interleucina 6 (IL-6) (Burhans *et al.*, 2018; Pham; Nguyen; Park, 2023). A hipertrofia e acúmulo do tecido adiposo visceral (TAV) modula negativamente a produção das adipocinas que exercem efeitos opostos às adipocinas anti-inflamatórias. Isso propicia a elevação dos níveis de ácidos graxos circulantes (conhecida como lipólise), inibição da sinalização de insulina e redução da angiogênese, culminando na lipotoxicidade tecidual e morte celular (Kirichenko *et al.*, 2022).

As adipocinas têm se destacado participarem do mecanismo de resistência à insulina (RI) e inflamação no curso evolutivo da obesidade. Pesquisas em indivíduos obesos e modelos animais revelam a associação das adipocinas na interferência da via de sinalização de insulina, exemplificadas pelo IL-6 e TNF-α. O TNF-α foi umas das primeiras adipocinas descritas há mais 20 anos. É traduzida como uma proteína de 26 kDa em que o TNF-α recém sintetizado expresso na membrana plasmática é então clivado no domínio extracelular pela ação de uma metaloproteinase de matriz para liberar a forma solúvel de 17 kDa. Em ambas as formas, a trimerização é requerida para que ocorra a atividade biológica. Tanto a forma membranar quanto a secretada são biologicamente ativas, sendo a membranar ocorrendo por meio de sinalização justácrina. Os adipócitos e macrófagos são os principais produtores de TNF-a. Eles expressam receptores responsáveis pela transdução do sinal da sinalização de TNF-α, designados pelos receptores para TNF do tipo 1 e 2 (TNFR1 e TNFR2) em que os denominados "domínios de morte" estão presentes apenas em TNFR1. Isso permite a ancoragem de proteínas acessórias, como proteína de domínio de morte associada a Fas (FADD), a proteína de domínio de morte associado a TNFR1 (TRADD) e o fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF-2). No TAB, ela modula a sinalização de insulina interferindo na transdução do sinal em razão da inibição da fosforilação dos receptores de insulina do tipo 1 (IRS-1), o que impede a translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) para superfície celular, bem como propicia transcrição do fator nuclear kappa B (NF-kB), que amplia respostas inflamatória

(Francisqueti; Nascimento; Corrêa, 2015; Lacerda; Malheiros; Abreu, 2016). O aumento de TNF-α também é relacionado ao estímulo da lipólise, elevando os níveis ácidos graxos presentes no plasma e na formação de radicais livres. Na literatura, são descritas alterações no metabolismo lipídico em proteínas de ligação de elemento regulador de esterol (SREBP-1c) e do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR-γ) (Samuel; Shulman, 2012; Martins, 2016) (Figura 7).





Legenda O TNF- α possui formas trimérica e a forma solúvel. A enzima TACE é responsável pela clivagem da forma trimérica responsável por ativar a via de NF-κB Adaptado de: (PALLADINO *et al.*, 2003)

Na literatura, outras adipocinas conhecidas por serem descritas benéficas, possuem atividade diminuída em razão da inflamação crônica de baixa intensidade promovida pelas citocinas pró-inflamatórias. A adiponectina, por exemplo, em condições fisiológicas normais, é responsável por mediar a liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais através do óxido nítrico sintase (eNOS), promovendo o tônus vascular. Frente ao microambiente pró-inflamatório, a diminuição dos níveis da adiponectina é correlacionada com a vasoconstricção, liberação de mediadores inflamatórios locais, o que favorece a migração de células imunes e estímulo a proliferação dos macrófagos M1 no TAB (Kirichenko *et al.*, 2022).

A resisitina e a leptina também são adipocinas bem estudadas no contexto da RI. A resistina é secretada por adipócitos e células imunes sendo responsável por induzir a expressão de proteínas de adesão celular, como molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), mobilizando células imunes da circulação sanguínea para o TAB. Já a leptina, foi a primeira adipocina descoberta, em 1994. Produzida e secretada pelo TAB, em indivíduos saudáveis age no hipotálamo na região ventromedial, regulando o equilíbrio energético ao ativar neurônios anorexigênicos que promovem a saciedade e o gasto energético, e inibindo neurônios orexigênicos que estimulam o apetite, aumenta a termogênese e o metabolismo de ácidos graxos. Todavia, em obesos é característico a elevação crônica dos níveis de leptina paralelamente à resistência central à ação da leptina dificultando ligação da leptina aos sítios de reconhecimento no cérebro prejudicando a regulação da ingesta alimentar (Ye, 2013; Vieira-Potter, 2014; Francisqueti; Nascimento; Corrêa, 2015). Além disso, a leptina secretada pelos adipócitos hipertrofiados promove a liberação de IFN-y pelas células T locais, e, parece atuar de forma inibitória na liberação de insulina pelas células β no pâncreas. (Vieira-Potter, 2014).

Além das adipocinas, a participação de células do sistema imune inato e sistema adaptativo tem sido amplamente descrita na literatura como atuantes na fisiopatologia da obesidade na RI e DT2. Em razão do excesso de nutrientes, há intensa hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos com hipersecreção de citocinas, tais como TNF-α, IL-6 e Interleucina-1β (IL-1β). Somado a isso, ocorre a vasoconstrição dos vasos sanguíneos que nutrem o tecido, gerando áreas de hipóxia com morte celular local, caracterizando um tecido disfuncional. Por sua vez, a ação de adipocinas como proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) liberadas pelo TAB, parecem envolver mudanças na composição celular, caracterizada pelo recrutamento de células imunes e mudança do fenótipo de macrófago tipo M2 (anti-inflamtório) para o macrófago do tipo M1 (pró-inflamatório), reverberando no a estímulo transcrição gênica da via NF-κB, correlacionada com produção de citocinas, ampliando o quadro de inflamação crônica (Francisqueti; Nascimento; Corrêa, 2015; Ruck; Wiegand; Kühnen, 2023) (Figura 8).



Figura 8 - Inflamação crônica no tecido adiposo branco na obesidade.

Legenda: Nesta hipótese, propõe-se que a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos gera privação nutricional, hipóxia e apoptose somado ao recrutamento de células inflamatórias para o TAB. A mudança do fenótipo nos macrófagos do tipo M2 para o fenótipo M1 também é característico na inflamação crônica.

Fonte: A autora, 2024.

A disfunção no sistema imune inato e adaptativo interfere diretamente na sinalização de insulina em outros tecidos além do TAB. Primeiramente, a polarização dos macrófagos para o subtipo M1 é correlacionada a disfunção das células-β no pâncreas. No fígado, essas modificações estimulam sinalização nas vias cinase c-Jun Nterminal (JNK) e transcrição do fator nuclear kappa-B (IKKB) e consequentemente ativam o NF-κB (Patel; Buras; Balasubramanyam, 2013). Na intenção de mitigar os efeitos gerados pelo processo inflamatório crônico em decorrência da obesidade, as células de medula óssea são uma das fontes mais exploradas no campo da terapia celular.

1.9 CMO na obesidade

Os primeiros experimentos avaliando o efeito da utilização das CMO na melhoria da RI foram por meio da administração na veia caudal durante estágios inicias da DT2 induzida por estreptozotocina (Si et al., 2012). Nos ensaios em camundongos, as CMO geraram melhoria na captação de glicose por estimularem a fosforilação dos receptores de insulina (IRS-1), proteína quinase B (AKT), resultando na ativação dos transportadores de glicose (GLUT-4). Já os níveis de IL-1Ra produzidos pelas CMO atenuaram a presença dos infiltrados inflamatórios, assim como restauraram o armazenamento de glicogênio no fígado (Si et al., 2012). Em nosso grupo, o transplante de CMO recém isoladas foi capaz de melhorar a glicemia, insulinemia e expressão de TNF- α no TAB em camundongos hiperalimentados (Ferreira, 2020). De maneira similar, foi revelado que administração dos exossomos presentes no secretoma de CEM do cordão umbilical humano foram capazes de atenuar a RI e restaurar a secreção de insulina em camundongos em modelo de DT2 (Sun et al., 2018; Chen et al., 2021). Em outro trabalho, Sabry e colaboradores (2020), utilizando exossomos das CEM em modelo de diabetes do tipo 1 em ratos, constataram a melhoria da glicemia, atenuação da hiperinsulinemia e indução da expressão gênica de TGF-β, PDX-1 e Smad2/3 no pâncreas. A superfamília do TGF-β é conhecida por regular a diferenciação tecidual, crescimento celular e proliferação. A interação do TGF-β com Smad2/3 é essencial para expressão de Pdx-1, responsável pela neogênese de células β (Sabry *et al.*, 2020).

Estudos recentes vêm demonstrando como modificações geradas pelo microambiente obesogênico refletem em alterações na expressão de antígenos de superfície e expansão das CMO. Modificações nos receptores de superfície dificultam as interações célula-célula e/ou sinalização parácrinas necessárias para promover o reparo tecidual (Alessio *et al.*, 2020; Zong *et al.*, 2023). Já o declínio na expansão das CMO em cultivo pode gerar produção insuficiente de pool de células necessárias para promover efeito terapêutico ao expandi-las em laboratório. Um trabalho publicado por nosso grupo ao analisar o perfil das CMO de camundongos obesos, descreveu aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e marcação acentuada de Anexina V (De Oliveira *et al.*, 2014). Na literatura, foi relatado o aumento da expressão de CXCL-2, uma quimiocina responsável pelo recrutamento de monócitos (Zong *et al.*, 2023).

De maneira similar as CMO, o secretoma pode ter suas propriedades modificadas. Zong e colaboradores (2023) ao conduzirem análises do secretoma em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica, relataram elevadas concentrações de IL-6. Esta citocina é relacionada a via de JAK/STAT3, descrita como uma via correlacionada à senescência celular, estágio que precede a apoptose (Zong *et al.*, 2023).

Já Ayaz-Guner e colaboradores (2020) ao compararem o secretoma de CEM proveniente de diferentes depósitos de tecido adiposo e da medula óssea de camundongos adultos observaram que o secretoma proveniente do TAB visceral e da MO dos camundongos obesos apresentaram redução da expressão de glutamato-cisteína ligase (GCL), peroxirredoxina-5 (Prdx5) e peroxirredoxina-6 (Prdx6), que são genes relacionados à atividade antioxidante da célula (Ayaz-Guner *et al.*, 2020).

Portanto, alterações morfofuncionais reverberam em modificações nas propriedades terapêuticas do secretoma reduzindo a capacidade terapêutica, e consequentemente comprometem aplicações clínicas (Ayaz-Guner *et al.*, 2020; Biondi *et al.*, 2022). Somado a isso, ainda são iniciais as pesquisas direcionadas na caracterização do secretoma em indivíduos que apresentam doenças pré-existentes, quando comparados aos estudos do secretoma provenientes das CMO/CEM dos indivíduos saudáveis. Uma vez que a obesidade é uma crescente na população, e indivíduos obesos poderão ser potenciais doadores em terapias autólogas ou alogênicas, urge a necessidade de uma profunda investigação no campo das fontes candidatas na terapia livre de células.

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com estimativas da Associação Brasileira de para o Estudo da Obesidade (ABESO) o quadro de obesidade no Brasil teve aumento em cerca de 72% nos últimos treze anos, saindo de 11,8% em 2006 para 20,3% em 2019⁴. A nível mundial, a estimativa é de que em 2025 cerca de 700 milhões de indivíduos adultos estejam acima do peso, sendo segundo dados da OMS. Dados da Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM)⁵ em 2022 apontam que cerca de 75% dos indivíduos que necessitam de acompanhamento de equipe especializada dependem exclusivamente do SUS. A carência de profissionais no acompanhamento nutricional e psicológico são obstáculos enfrentados por indivíduos que buscam tratamento da obesidade. Além disso, o excesso de dietas hiperpalatáveis e a grande ingesta alimentar resultam em consequências nefastas na saúde humana (Andrade; Cesse; Figueiró, 2023). Portanto, o estabelecimento de terapias combinadas que possam intervir no avanço da obesidade e das comorbidades relacionadas contribuiriam de forma significativa para as estratégias de controle de peso implantadas na prática clínica (Fruh, 2017). Atualmente, a terapia celular utilizando o secretoma representa uma alternativa para tratamento de diversas doenças, dentre elas a doenças metabólicas como diabetes do tipo 2 e inflamação crônica. Nos últimos 7 anos, o uso do secretoma proveniente das células estromais mesenquimais passou a ser bastante investigado (Konala et al., 2016). Portanto, a pesquisa desenvolvida propôs analisar o secretoma de CMO in vitro e investigar in vivo seu potencial no tratamento da inflamação do tecido adiposo branco e resistência à insulina em camundongos hiperalimentados.

⁴ Endereço eletrônico referente as estatísticas do mapa da obesidade no Brasil: <u>https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/</u>. Acesso em 19 de maio de 2024.

⁵ Endereço eletrônico referente a matéria publicada na SBCBM atendimento no SUS:

https://www.sbcbm.org.br/obesidade-atinge-mais-de-67-milhoes-de-pessoas-no-brasil-em-2022/. Acesso em 12 de julho de 2024.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Caracterizar, *in vitro*, o perfil inflamatório do secretoma das células de medula óssea (CMO), *in vivo*, o efeito da terapia com o secretoma ou com as CMO sobre os níveis glicêmicos e a inflamação do tecido adiposo branco em camundongos *Swiss* hiperalimentados durante a lactação.

3.2 Objetivos específicos:

A) Avaliar os parâmetros biométricos (massa corporal, comprimento nasoanal, peso da gordura epididimal e retroperitoneal) dos camundongos *Swiss* controle e hiperalimentados durante a lactação que receberam ou não a terapia com secretoma ou com CMO.

B) Analisar a glicemia dos camundongos *Swiss* controle e hiperalimentados após a terapia com secretoma ou com CMO.

C) Caracterizar o perfil inflamatório das CMO de camundongos controle e hiperalimentados após 2 dias em cultivo (P0).

 D) Caracterizar o perfil inflamatório do secretoma das CMO após 10 dias em cultivo (P1).

E) Analisar a expressão de TNF-α no tecido adiposo branco epididimal antes e após a terapia com o secretoma ou com CMO.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Células-Tronco do Departamento de Histologia de Embriologia (DHE) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* provenientes do biotério do Departamento. Todos os experimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na experimentação animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética para no cuidado e Uso de Animais Experimentais (protocolo CEUA/026/2018) (Anexo 1).

4.2 Modelo experimental de indução a obesidade

Para obtenção dos grupos, utilizamos o modelo experimental de redução de ninhada para três filhotes machos por nutriz durante lactação (Plagemann *et al.*, 1992) é amplamente utilizado por nosso grupo (Thole *et al.*, 2012; Gomes Da Silva, 2017; Ferreira, 2020). Este modelo consiste na utilização de camundongos *Swiss* grávidas condicionadas de forma individual em gaiolas. No terceiro dia após o nascimento dos filhotes a ninhada foi ajustada para formar os grupos controle (GC) e hiperalimentado (GH). Neste ajuste, GC permaneceram com 9 filhotes durante o período de lactação, enquanto que em GH permaneceram apenas com 3 filhotes machos. Aos 21 dias pósnatal, com o término da lactação, os animais foram separados em gaiolas contendo 3 machos cada para melhor acomodação dos animais. Todos os camundongos utilizados no experimento foram mantidos em condições padrão de ciclo claro/escuro de 12 horas na temperatura de 23°C, com água e ração comercial *ad libitum*. Os experimentos foram realizados preferencialmente no horário da manhã entre 8:00 e 12:00 horas. O tempo total de experimento foi de 90 dias (Figura 9).

Figura 9 - Obtenção dos grupos experimentais para modelo de obesidade por meio da hiperalimentação.



Legenda: Em D0, ocorre o nascimento das ninhadas. Em D3 ocorre a redução de ninhada com o ajuste para 3 machos filhotes por nutriz, que permanecem por todo período experimental, formando o grupo GH. O grupo GC compreende a ninhada de 9 camundongos machos que não recebem o ajuste. D0: Dia 0, D3 dia 3, D90 dia 90. (GC) Grupo controle e (GH) Grupo hiperalimentado. Fonte: Biorender.com

4.3 Obtenção das Células de Medula Óssea

Os fêmures e tíbias de camundongos *Swiss* machos controle e obesos com 3 meses de idade foram dissecados e as epífises cortadas para coleta das células da medula óssea por centrifugação a 1500 RPM durante 5 minutos para obtenção das células de medula óssea (CMO). Em seguida foram resuspendidas em 1ml de meio DMEM F12 suplementado com 15% de SFB, contadas e ajustadas para plaqueamento de 2X10⁶ e 1x10⁵ de CMO por poço em placa de 6 (com 5ml DMEM F12 suplementado com 15% de L-glutamina e antibióticos) e de 24 poços (com 1ml DMEM F12 suplementado com 15% de SFB com 1% de SFB com 1% de L-glutamina e antibióticos), respectivamente. Foram mantidas em estufa a 37ºC, com atmosfera de 5% de CO₂. Cada grupo experimental foi composto por 6 (n=6) animais.

4.4 Coleta do secretoma em P0 para ensaio de CBA

Após 24 horas de plaqueamento em passagem 0 (P0), as CMO de GC e GH foram submetidas ao condicionamento do meio para obtenção do sobrenadante, também denominado como secretoma (Sb). Os resquícios de células não aderentes foram retirados e o poço foi lavado cuidadosamente com PBS estéril. Em seguida, acrescentamos DMEM com 2% de SFB acrescido de antibióticos. Aos 2 dias de cultivo, os Sb das CMO do GC e GH foram coletados da placa de 24 poços, centrifugados a 1500 RPM por 10 minutos, filtrado com filtro de seringa 0,22µm e armazenado em alíquotas contendo 400 microlitros a -80°C para posterior ensaio de CBA (Cytometric Bead Array) por citometria de fluxo (Figura 10). Os grupos experimentais foram formandos por 6 animais (n=6) (Figura 10).



Figura 10 – Obtenção das CMO para cultivo por 2 dias em P0.

Legenda: Em D90, as MO dos camundongos dos grupos GC e GH foram isoladas, plaqueadas e cultivadas para obtenção do secretoma após 2 dias em P0. Fonte: Biorender.com

4.5 Coleta do secretoma em P1 para ensaio de CBA e transplante

Já na placa de 6 poços, alcançada a confluência em P0, a tripsinização foi realizada. As CMO foram lavadas com PBS EDTA 0,5% para retirada de debris celulares, hemácias e células não aderentes. Em seguida, foi aplicado 2ml de tripsina EDTA 0,05% (Gibco) por poço e deixado em estufa por 5 minutos. As células foram centrifugadas durante 10 minutos a 15000 RPM. Ao fim, as CMO foram resuspendidas, contadas e plaqueadas com 2x10⁵ células de medula óssea cultivadas novamente em placa de 6 poços em DMEM F12 suplementadas com 15% de SFB e mantida em estufa de 37°C, 5% CO₂.

Para obtenção do meio sobrenadante (secretoma) para transplante e ensaio de CBA em P1, no 8º dia de cultivo em Passagem 1 (P1) das CMO, os poços foram lavados com PBS estéril e mantidos em cultivo por dias em DMEM F12 suplementadas com 2% de SFB e antibióticos. Ao 10º dia o secretoma foi coletado, centrifugado a 1500 RPM por 10 minutos, filtrados com filtro de seringa 0,22µm separados em alíquotas contendo 400 µl para realização do transplante via intraperitoneal. As alíquotas excedentes foram armazenadas a -80°C para realização do ensaio de citometria por CBA em P1.

Após a coleta do secretoma, as células aderentes na placa foram tripsinizadas, centrifugadas por 5 minutos a 15000 RPM, resuspendidas em PBS e contadas para serem transplantadas 2x10⁵ células de medula óssea em 400µL PBS por via intraperitoneal.

4.6 Terapia com células de medula óssea ou secretoma nos animais hiperalimentados

A terapia com células de medula óssea (CMO) ou com secretoma (Sb) aos 10 dias de cultivo em P1 foram realizados por via intraperitoneal em camundongos *Swiss* submetidos a hiperalimentação nos primeiros de vida com 90 dias de idade (D90). Após 10 dias (D100), todos os grupos experimentais foram eutanasiados. Os animais

foram anestesiados com Xilazina (Anasedan – 5 mg/kg) e Cetamina (Virbac – 100 mg/kg) para coleta do tecido adiposo e mensuração dos parâmetros biométricos. Os grupos experimentais foram formandos por 6 animais (n=6) por grupo (Figura 11):

Grupo Controle (GC): formado pelas ninhadas que permaneceram com os 9 filhotes durante o período de lactação e que, aos 90 dias, receberam 400 µl de PBS via intraperitoneal.

Grupo Hiperalimentado (GH): formado pelas ninhadas reduzidas que permaneceram com 3 filhotes durante o período de lactação e que, aos 90 dias, receberam 400 µl de PBS via intraperitoneal.

Grupo Hiperalimentado + Células de Medula Óssea de animais controle (**GH+CMOc**): formado pelas ninhadas reduzidas que permaneceram com 3 filhotes durante o período de lactação e que, aos 90 dias, receberam o transplante, via intraperitoneal, de 2x10⁵ de CMO das culturas em P1 obtidas de animais controle.

Grupo Hiperalimentado + Secretoma de CMO de animais controle (GH+Sbc): formado pelas ninhadas reduzidas que permaneceram com 3 filhotes durante o período de lactação e que, aos 90 dias, receberam o transplante, via intraperitoneal, de 400 µl de secretoma obtido das culturas em P1 de CMO de animais controle.

Grupo Hiperalimentado + Células de Medula Óssea de animais hiperalimentados (**GH+CMOo**): formado pelas ninhadas reduzidas que permaneceram com 3 filhotes durante o período de lactação e que, aos 90 dias, receberam o transplante, via intraperitoneal, de 2x10⁵ de CMO das culturas em P1 obtidas dos animais hiperalimentados (obesos).

Grupo Hiperalimentado + Secretoma de CMO de animais hiperalimentados (**GH+Sbo**): formado pelas ninhadas reduzidas que permaneceram com 3 filhotes durante o período de lactação e que, aos 90 dias, receberam o transplante, via intraperitoneal, de 400 µl de secretoma obtido das culturas em P1 de CMO de animais hiperalimentados (obesos). Figura 11 - Formação dos novos grupos experimentais após o recebimento de células de medula óssea ou secretoma.



Legenda: Esquema experimental do transplante de células de medula óssea ou do secretoma de CMO em camundongos *swiss* hiperalimentados. Os camundongos foram divididos em seis novos grupos novos experimentais após serem submetidos a terapia via intraperitoneal. CMO: células de medula óssea, Sb: secretoma.

Fonte: Biorender.com

4.7 Ensaio de Cytometric Bead Array (CBA)

Para análise do perfil de citocinas do secretoma dos grupos experimentais GC e GH em P0 e P1, realizamos o ensaio de CBA utilizando o kit de citocinas da Th1/Th2/Th17 baseado em um ensaio citométrico com beads (Cytometric Bead Array (CBA) BD cat. no. 560484). As amostras do secretoma foram acondicionados em tubos previamente preparados contendo uma mistura de beads com anticorpos específicos para as citocinas: IL-17A, IFN-γ, TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2. Posteriormente, foi adicionado um reagente de detecção (anticorpos contra as citocinas acima conjugados com PE). As amostras foram deixadas por 2h em temperatura ambiente e protegidas da luz. Após esse tempo, foi adicionado 500 μl de tampão de lavagem do kit nos tubos e as amostras foram centrifugadas a 200 g refrigeradas a 4 °C por 5 minutos. O

pellet foi ressuspendido em 300 µL de "wash buffer". Os tubos foram lidos no citômetro BD Accuri C6 utilizando o template disponível no site https://www.bdbiosciences.com/en-us/applications/researchapplications/bead-based-immunoassays.A quantidade de eventos coletados foi de 2100 no gate R1 com um fluxo na velocidade média. Os dados foram analisados no software FCAP Array (BD Biosciences). Foram utilizados 6 (n=6) amostras de cada grupo experimental.

4.8 Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose (TITG)

A tolerância à glicose foi avaliada nos grupos experimentais antes e após a terapia com CMO ou secretoma. Para isso, o TITG foi realizado em dois momentos: sete dias antes da terapia e dois antes da eutanásia. Os animais foram submetidos a 6 horas de jejum para realização do teste. Foi injetada a concentração de 1g de Glicose/Kg e a glicemia foi mensurada nos tempos: 0 (jejum), 30, 60, 90 e 120 minutos após administração via intraperitoneal. Os níveis de glicose foram medidos utilizando tira reagentes do aparelho Accu-Chek Active (Roche Diagnostics, Alemanha).

4.9 Coleta de Dados Biométricos

Aos 100 dias, a eutanásia foi realizada nos animais utilizando Cetamina e Xilazina. Foram coletados os dados dos animais referente a peso da gordura retroperitoneal e epididimal. Já o comprimento naso-anal foi aferido com auxílio de paquímetro. A partir dos dados de massa corporal e comprimento naso-anal, mensuramos o índice de Lee, que permite calcular o índice de massa corporal em roedores (Bastías-Pérez; Serra; Herrero, 2020).

Índice de Lee =
$$\frac{\sqrt[3]{Massa Corporal (g)}}{Comprimento Naso - Anal (cm)}$$

Fonte: A autora, 2024.

4.10 Processamento histológico

Durante a dissecção do animal, coletamos a gordura epididimal de todos os grupos experimentais, no qual foram identificados e acondicionados em potes individuais contendo formalina tamponada por 3 semanas. Após esse período, as amostras foram transferidas para cassetes para processamento histológico. O material passou por 3 banhos de álcool 100% seguido por 2 banhos em xilol. Todos os materiais processados foram incluídos em parafina líquida no aparelho HistoCore Arcadia H e resfriados para formação dos blocos no aparelho HistoCore Arcadia C para serem cortados micrótomo com espessura de 3µm.

4.11 Imuno-histoquímica para TNF-α

Com intuito de analisar a presença do processo inflamatório no tecido adiposo branco epididimal, realizamos imunomarcações para TNF-α nos cortes histológicos. Os cortes permaneceram na estufa por 40 minutos e desparafinizados com banhos de xilol. Em seguida, as lâminas histológicas foram imersas em banhos com concentrações decrescentes de álcool por 2 minutos para rehidratação dos cortes. Depois foram incubados com peróxido de hidrogênio a fim de inativar a atividade de peroxidase endógena, minimizando as chances de marcações inespecíficas. Após essa etapa, os cortes foram lavados e imersos em tampão citrato pH 6,0 a 60°C por 20 minutos seguida pela aplicação de BSA 3% por 20 minutos. Por fim, foi aplicado o

anticorpo primário goat-policional anti-TNF-α (Santa Cruz Biotechnology na diluição de 1:200), *overnight*. No dia seguinte, após lavagem em PBS, utilizamos anticorpo secundário biotinilado (VectaStain Kit Universal Quick HRP Kit, Vector Laboratories) juntamente com a streptavidina por 30 minutos. Em seguida, revelamos os cortes com DAB (ImpacPACT® DAB Substrate Kit, Peroxidase Vector Laboratories). Ao final, os cortes foram lavados em água destilada e corados com hematoxilina. As lâminas foram montadas em Entellan para visualização ao microscópio de luz. A aquisição das imagens foi no microscópio Olympus DP72 em formato TIFF.

O tecido adiposo foi quantificado para a imunomarcação de TNF-α. Foram adquiridas imagens de 5 lâminas por grupo (n=6) na objetiva de 40x (5 campos aleatórios de cada lâmina). A quantificação das imagens foi realizada no software ImageProplus 7.0. Por meio da ferramenta *image histrogram*.

4.12 Quantificação da marcação de TNF-α

Foram analisados 7 campos aleatórios (5 lâminas por grupo) do tecido adiposo branco epididimal de cada animal (n=6) no software Image Pro Plus. Com a imagem foi a aberta no software seguimos os seguimos passos:

- A. Foi selecionada a ferramenta zoom para ampliação de imagem.
- B. Com a imagem ampliada, clicou-se no ícone p*erform segmentation* para abertura da aba de segmentação. As células foram segmentadas com auxílio da ferramenta em que as marcações para TNF-α foram designadas na cor vermelha.
- C. Em seguida, clicou-se em *new mask* para que as células TNF-α positivas fossem designadas para a cor branca enquanto que o restante da imagem foi designado na cor preta.
- D. A porcentagem de área marcada pela cor branca foi definida pela ferramenta *image histogram* no software Graph Pad Prisma 8®.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± Erro Padrão da Média (EPM) de 6 animais por grupo. Foi feito o T-test, One-Way ou Two-Way ANOVA seguido de pósteste de Holm-Sidak com análises realizadas pelo Graph Pad Prism 8 em que P<0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 **RESULTADOS**

5.1 Dados biométricos

5.1.1 Massa corporal

Os animais submetidos ao modelo de hiperalimentação apresentaram ganho significativo de massa corporal. A diferença a partir dos 10 dias foi de 22,7% no grupo GH quando comparado aos animais do grupo GC. A diferença entre a média de peso dos animais hiperalimentados perdurou ao longo dos 90 dias anteriores ao recebimento da terapia com CMO ou secretoma (Figura 12).

Figura 12- Curva de ganho de massa corporal semanal.



Massa corporal

Legenda: Curva de massa corporal semanal dos animais dos grupos GC e GH. (GC) Grupo controle (GH) Grupo hiperalimentado.

Nota: Os resultados representam média + EPM de cada grupo ****P <0.00005. Analisado pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A autora, 2024

Ao fim dos 90 dias de vida a diferença entre a massa corporal dos animais GH foi significativa em cerca de 26% a mais do que quando comparados aos animais GC (GC: 38,45±0,65; GH: 44,84±0,72) anteriormente a terapia (Figura 13).

Figura 13 - Gráfico representativo do peso final ao fim dos 90 dias de experimento.





Legenda: peso final aos 90 dos animais dos grupos GC e GH. (GC) Grupo controle (GH) Grupo hiperalimentado,

Nota: Valores apresentados como média ±EPM ****P <0.00005. Analisado pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A autora, 2024.

Uma única terapia contendo o secretoma (SB) ou CMO não foi capaz de promover redução de peso corporal final em nenhum dos grupos analisados após os 10 dias da terapia (D100). Os grupos GH, GH+CMOc, GH+SBc, GH+CMOo e GH+SBo apresentaram ganho significativo no peso final quando comparados o GC (GC: 37.44±0.55; GH: 45.12±0.56; GH+CMOc: 42.92±1.28; GH+SBc: 42.83±2.06; GH+CMOo: 44.42±1.63; GH+SBo: 44.33±0.85) (Figura 14). **Figura 14 -** Gráfico representativo do peso final aos 10 dias após o recebimento da terapia com o secretoma ou células de medula óssea.



Legenda: peso final dos grupos experimentais ao fim de 10 dias após a terapia contendo secretoma ou CMO.

Nota: Valores apresentados como média ±EPM **P<0.005; ***P <0.0005; ****P<0.00005. a: Vs grupo controle (GC). Peso final aos 100 diais analisado pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A autora, 2024.

5.1.3 Pesagem da gordura epididimal, gordura retroperitoneal, índice de Lee e comprimento naso-anal antes e após terapia com secretoma ou células de medula óssea

Ao fim dos 90 dias, o grupo hiperalimentado apresentou ganho significativo no peso das gorduras retroperitoneal e epididimal comparados ao grupo controle (GC: 0.19±0.02; GH: 0.42±0.05) (GC: 0.42±0.04; GH: 0.83±0.06). Na mensuração do comprimento naso-anal, não encontramos diferenças significativas entre os grupos (GC:

10.07±0.07; GH: 10.42±0.06), o que comprova o ganho de massa associada ao modelo de hiperalimentação. O grupo GH também apresentou diferenças significativas no valor do índice, que permite estimar a obesidade em roedores, confirmando o estabelecimento no quadro de obesidade nos animais submetidos ao modelo de hiperalimentação (GC: 319.3±2.22; GH: 347.7±2.91) (figura 15).

Figura 15 – Parâmetros biométricos aos 90 dias.

Animais	Controle	Hiperalimentado	
Gordura Retroperitoneal (g)	0.19±0.02	0.42±0.05****	
Gordura Epididimal (g)	0.42±0.04	0.83±0.06****	
Índice de Lee (g/cm)	319.3±2.22	347.7±2.91****	
Comprimento naso-anal (cm)	10.07±0.07	10.42±0.06	

Nota: Valores apresentados como média ±EPM ****P <0.00005. Analisado pelo teste Oneway ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak. Fonte: A autora, 2024.

Na análise dos parâmetros biométricos mensurados 10 dias após a terapia, os animais do grupo GH apresentaram os pesos da gordura retroperitoneal, gordura epididimal e índice de Lee significativamente elevados quando comparados ao grupo GC. Já os grupos GH+CMOo e GH+SBo apresentaram diferença significativa no peso da gordura epididimal quando comparados ao grupo GC (GC: 0.42±0.03; GH+CMOo: 0.93±0.13; GH+SBo: 0.85±0.14). Na gordura retroperitoneal, apenas o grupo GH+CMOo apresentou ganho significativo quando comparado ao GC. Em contrapartida, o recebimento da terapia contendo o secretoma de animais saudáveis (GH+SBc) foi capaz de promover a redução do índice de Lee de maneira significativa comparado GC, GH e GH+CMOc (GC: 326.7±3.5; GH: 347.4±2.66; GH+SBc: 264.3±3.1; GH+CMOc: 348.6±2.8). Nos grupos GH+CMOo e GH+SBo mesmo após receberem a terapia com secretoma ou células de medula óssea de animais hiperalimentados, ainda apresentavam índice de Lee significativamente elevados (GH+CMOo: 339.1±2.98; GH+SBc: 352.9±3.24). Por fim, no comprimento naso-anal, não encontramos diferenças significativas entre os grupos (figura 16).

Animais	GC	GH	GH+CMOc	GH+SBc	GH+CMOo	GH+SBo
Gordura Retroperitoneal (g)	0.18±0.01	0.41±0.04 ^{a****}	0.32±0.02	0.20±0.04	0.47±0.07 ^{a**}	0.29±0.07
Gordura Epididimal (g)	0.42±0.03	0.85±0.06 ^{a****}	0.71±0.09	0.62±0.02	0.93±0.13 ^{a**}	0.85±0.14 ^{a*}
Índice de Lee (g/cm)	326.7±2.22	347.4±2.66 ^{a*}	348.6±2.89	264.3±3.1 a****; b***	** 339.1±2.98 ^{d****}	352.9±3.24 ^{d****}
Comprimento naso-anal (cm)	10.07±0.07	10.42±0.06	9.9±0.13	10.07±0.10	10.30±0.19	10.17±0.27

Figura 16 – Parâmetros biométricos aos 10 dias após o recebimento da terapia com secretoma ou células de medula óssea.

Legenda: Tabela com valores do peso da gordura epididimal, gordura retroperitoneal, índice de Lee que estima a obesidade em roedores e comprimento naso-anal. (a) Vs. GC, (b) Vs. GH, (c) GH+CMOc e (d) Vs. GH+SBc.

Nota: Valores apresentados como média ±EPM *P<0.05; ****P <0.00005. Analisado pelo teste Oneway ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A autora, 2024.

5.2 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG) antes e após terapia com secretoma ou células de medula óssea

Os valores da glicemia obtidos no teste da curva glicêmica de jejum em diferentes tempos mostraram que os animais do grupo GH apresentaram valores significativamente elevados quando comparados aos animais do grupo GC no tempo 0 (GC: 129.3±6.63; GH: 170.6±6.3) 30 minutos (GC:178.6.9±11.5; 227.8±7.4), 60 minutos (GC:168.5±8.8; GH: 201.5±7.3), 90 minutos (GC:146.7±8.7; GH: 189.6±8.7) e aos 120 minutos (GC:135.0±8.2; GH:167.2±6.00). Notamos que a glicemia de jejum se encontrava significativamente elevada antes mesmo na administração da glicose intraperitoneal. O quadro hiperglicêmico do grupo GH perdurou até o fim do teste (Figura 17a). O cálculo da área sob a curva é uma ferramenta útil que permite diagnosticar o quadro de diabetes. No grupo GH, vemos diferença significativa no valor da curva glicêmica comparado a GC (GC: 576±37; GH:774±26) (Figura 17b).





Legenda: Gráficos referentes a glicemia (A) e a área sob a curva (B) aos 90 dias nos grupos experimentais. (GC) Grupo controle e (GH) grupo hiperalimentado.

Nota: Valores apresentados como média ±EPM *P<0.05; **P<0.005; ***P <0.0005. TITG analisado pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak. Área sob a curva analisado pelo teste-T.

Fonte: A autora, 2024.

Após a terapia, os grupos GH, GH+CMOo e GH+SBo apresentaram glicemia no tempo inicial (tempo 0), com valores de TITG significativamente elevados quando comparados ao grupo GC (GC: 128.5±6.6; GH: 170.8±6.3; GH+CMOc: 161,1±10.5; GH+SBc: 164.1±12.1; GH+CMOo: 163±5.8; GH+SBo:167.5±6.4). O recebimento da terapia contendo o secretoma no grupo GH+SBc, foi capaz de promover melhoria significativa dos valores glicêmicos quando comparados ao grupo GH aos 30 minutos (GC:175.8±11.2; GH:230±7.7; GH+CMOc:218.7±10.5; GH+SBc:178±0.6; GH+CMOo: 200±13.9; GH+SBo: 218.3±16.9) e 60 minutos após administração da glicose (GC: 168.5±8.8; GH: 204.3±7.5; GH+CMOc: 196.8±25.2; GH+SBc: 169.3±5.2; GH+CMOo: 187.6±5.4; GH+SBo: 191.2±6.4). Aos 90 minutos pós administração, a diferença significativa ocorre apenas em GH, em que permanece com a glicemia de jejum elevada (GC: 146±8.6; GH: 191.3±7.1; GH+CMOc: 182.6±27.7 GH+SBc: 167±6.9; GH+CMOo: 173.5±2.9; GH+SBo: 176.5±4.5). Por fim, aos 120 minutos pós administração, a redução glicêmica de forma significativa ocorre apenas em GH+CMOc (GC: 136.1±8.1; GH: 167.2±6; GH+CMOc: 138.6±5.8 GH+SBc: 131.8±8.3; GH+CMOo: 151.2±7.2; GH+SBo: 160.6±6.4) (Figura 18a). Para confirmação dos achados, o cálculo da área sob da curva glicêmica indica que a grupo que recebeu a terapia com secretoma apresentou melhora significativa da tolerância à glicose (GH+SBc: 665±13.6) quando comparado ao grupo GH, que não recebeu a terapia contendo secretoma ou células de medula óssea (GH: 819±21.9). Já os grupos GH, GH+CMOc, GH+CMOo, GH+SBo ainda detinham a presença do quadro hiperglicêmico quando comparados do grupo GC (GH: 819±21.9; GH+CMOc: 754±36.6; GH+CMOo: 733.4±14.3; GH+SBo: 760±21.9) (Figura 18b).



Figura 18 - Gráficos representativos do TITG e área sob a curva após a terapia.

Legenda: Legenda: Gráficos referentes a glicemia (A) e área sob a curva (B) após a terapia contendo o secretoma ou CMO nos grupos experimentais.

Nota: Valores apresentados como média ±EPM **P<0.005; ***P <0.0005; ****P<0.00005. a: Vs grupo controle (GC) b: Vs grupo hiperalimentado (GH). Peso final aos 100 diais analisado pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: A autora, 2024.

5.3 Morfologia da cultura de células de medula óssea em PO

As células de medula óssea obtidas através do isolamento dos fêmures e tíbias de camundongos saudáveis (GC) ou submetidos ao modelo de redução de ninhada (GH) ficaram em cultivo em P0 por cerca de 24h, até que 80% de confluência fosse alcançada. As CMO em P0 no GC e GH apresentaram morfologia arredondada e com presença de pequenos debris provenientes do isolamento feito no dia anterior (Figura 19).



Figura 19 – Morfologia das CMO em cultivo com 24h em P0.

Legenda: CMO provenientes da medula óssea GC (A) e GH (B) com 24h de cultivo. (GC) Grupo controle (GH) Grupo hiperalimentado, Objetiva de 10x. Fonte: A autora, 2024.

5.4 Expressão de citocinas das CMO aos 2 dias em P0

2 dias após plaqueamento em P0, o sobrendante das CMO do grupo GC e GH foram analisadas quanto à expressão de citocinas TH1/TH2 e TH17. Os níveis de TNF-α (GC: 38.6 ± 4.7 ; GH: 98.5 ± 26.6), INF-γ (GC: 0.11 ± 0.02 ; GH: 0.42 ± 0.14), IL-2 (GC: 1.52 ± 0.09 ; GH: 1.83 ± 0.07), IL-6 (GC: 8.48 ± 0.93 ; GH: 28.4 ± 12.1), IL-17 (GC: 0.09 ± 0.01 ; GH: 0.20 ± 0.05) e IL-4 (GC: 1.12 ± 0.09 ; GH: 1.66 ± 0.19) apresentaram-

se significativamente elevados no grupo GH. De maneira inversa, a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (GC:76.2±12.3; GH:31.7±14.5) encontra-se significativamente reduzida no grupo GH em relação ao grupo GC (Figura 20).



Figura 20 - Expressão de citocinas no secretoma das CMO aos 2 dias em P0.





Legenda: Ensaio de análise de citocinas presentes no secretoma de CMO provenientes da medula óssea aos 2 dias em P0. GC (A) e GH (B) com 24h de cultivo. (GC) Grupo controle (GH) Grupo hiperalimentado,

Nota: Valores apresentados como média ±EPM *P<0.05. CMO total de GC e GH analisados por Testt.

Fonte: A autora, 2024.

5.5 Morfologia da cultura de células de medula óssea em P1

Alcançada a confluência em P0, foi realizada a primeira passagem (P1) das CMO nos grupos GC e GH para obtenção do secretoma e das células para realização do transplante. Após o plaqueamento, as fotomicrografias aos 2º (Figura 15 A e B), 5º (Figura 15 C e D) e 10º dias (Figura 15 E e F) de cultivo, vemos a expansão das CMO subcultivadas com morfologia heterogênea, marcada pela presença de células de formato fibroblastóide e de células de formato estrelado (setas brancas), o que sugere a presença de macrófagos. (Figura 21)





10d

Legenda: Fotomicrografias do cultivo in vitro das CMO aos D2, D5 e em D10. Em A, C e E representadas por GC aos 2, 5 e 10 dias de cultivo in vitro. Em B, D e F representadas por GH aos 2, 5 e 10 dias de cultivo in vitro. CMO (células de medula óssea), (GC) Grupo controle, (GH) grupo hiperalimentado. (D2) dia 2, (D5) dia 5 e (D10) dia 10. As setas brancas evidenciam células morfologia sugestiva de macrófagos. Objetiva de 20x.

5.6 Análise do perfil inflamatório do secretoma das CMO em P1

Em primeira passagem (P1), o secretoma liberado pelas CMO cultivadas ao longo de 10 dias do grupo GC e GH foram analisados quanto a expressão de citocinas TH1/TH2 e TH17. Os níveis de INF- γ (GC:3.07±0.21; GH: 4.50±1.01), IL-2 (GC: 3.48±0.28; GH:3.18±0.14), IL-6 (GC: 19.9±2.02; GH: 42.7±11.7), IL-17 (GC:3.98±0.14; GH: 4.02±0.10) e IL-4 (GC:3.79±0.22; GH:3.59±0.21) e IL-10 (GC:2.17±0.38; GH:1.21±0.50) não apresentaram diferenças significativas entre GH comparado a GC. Em contrapartida, a expressão da citocina pró-inflamatória de TNF- α encontravase significativamente elevada no GH comparada a GC (GC: 62.3±13; GH: 98.5±186.1) (Figura 22).

Figura 22 - Expressão de citocinas no secretoma das CMO em P1 aos 10 dias.





Legenda: Ensaio de análise de citocinas presentes no secretoma de CMO 10 dias em P0. GC (A) e GH (B) aos 10 dias de cultivo. (GC) Grupo controle (GH) Grupo hiperalimentado, Nota: Valores apresentados como média ±EPM *P<0.05. CMO total de GC e GH analisados por Testt. (GC) Grupo controle, (GH) grupo hiperalimentado. Fonte: A autora, 2024.

5.7 Imuno-histoquímica do tecido adiposo branco

Com intuito de observar o efeito do modelo de hiperalimentação aos 90 dias no TAB, realizamos imuno-histoquímica para TNF-α. Nas fotomicrografias da imuno-histoquímica para tecido adiposo branco epididimal observamos a presença da marcação da citocina pró-inflamatória TNF-α no grupo GH, cabeças de seta (figura 20B), comparado GC, no qual não há presença do marcador (figura 23A).



Figura 23 - Imuno-histoquímica para TNF-α no tecido adiposo branco epididimal aos 90 dias.

Fotomicrografias da imuno-histoquímica para TNF- α no tecido adiposo branco epididimal. Em A indica ausência da presença do marcador para TNF- α e em B as cabeças de seta indicam a presença da citocina pró-inflamatória TNF- α . (GC) Grupo controle e (GH) grupo hiperalimentado. Fonte: A autora, 2024.

Ao realizar a quantificação da porcentagem de área marcada para a citocina, confirmamos a expressão significativa do marcador pró-inflamatório no grupo GH (330.8±4.19) comparada ao GC (64.6±2.92) (Figura 24).

Figura 24 – porcentagem de imunomarcação para TNF-α no tecido adiposo branco epididimal aos 90 dias.



Nota: Valores apresentados como média ±EPM **P<0.005. porcentagem de TNF- α de GC e GH analisados por Test-t. (GC) Grupo controle e (GH) grupo hiperalimentado. Fonte: A autora, 2024
Com intuito de observar o efeito parácrino após a terapia com sobrenadante ou CMO aos 100 dias, realizamos imunomarção para TNF- α no TAB. Nas fotomicrografias da imuno-histoquímica observamos a presença proeminente do marcador (cabeça de seta) em GH (25B), GH+CMOo (25D) e GH+SBo (25F). O secretoma obtido de animais controle (GH+SBc) a presença de TNF- α no tecido adiposo branco epididimal encontrou-se reduzida (25E), semelhante ao grupo GC (figura 25A).



Figura 25 - Imuno-histoquímica para TNF-α no tecido adiposo branco epididimal 10 dias após a terapia com secretoma ou CMO.

Legenda: Fotomicrografias da imuno-histoquímica para TNF-α no tecido adiposo branco epididimal. A (GC), em B (GH), C (GH+CMOc), D (GH+SBc), E (GH+CMOo) e F (GH+SBo). CMO (células de medula óssea), SB (secretoma), (GC) Grupo controle e (GH) grupo hiperalimentado. As cabeças de seta evidenciam a presença do marcador. Objetiva de 40x. Fonte: A autora, 2024.

Na quantificação da presença do marcador, os grupos GH, GH+CMOo e GH+SBo permaceram significativamente elevados quando comparados ao grupo GC, sendo que GH+CMOc a expressão de TNF-α se mostrou significativamente elevada tanto quando comparada a GC quanto a GH+SBc. Já o grupo que recebeu o secretoma das CMO de animais saudáveis (GH+SBc), apesar de não significativa, vemos uma tendência de redução na marcação para a citocina TNF-α, após o recebimento da terapia única contendo o secretoma (GC: 64.7±2.92; GH: 330.8±4.1; GH+CMOc: 367±3.2; GH+SBc: 207.7±5.2; GH+CMOo: 357.4±1.44; GH+SBo: 352.2±2.57) (figura 26).

Figura 26 – Porcentagem da imunomarcação para TNF-α no tecido adiposo branco epididimal 10 dias após a terapia com secretoma ou CMO.



Nota: Valores apresentados como média ±EPM *P<0.05; **P<0.005; ***P<0.0005. Em (a) Vs. GC, em (B) Vs. GH+SBc. Porcentagem de TNF- α analisados por One-way ANOVA com pós-teste de Holm-Sidak.

Fonte: Autora, 2024.

6 DISCUSSÃO

A terapia livre de células pode vir como importante aliada no campo da bioengenharia tecidual de forma combinada ou isolada em tratamentos para desordens metabólicas na obesidade. Para melhor compreender os fenômenos que envolvem a evolução dessa doença, modelos animais e ensaios clínicos em humanos vêm sendo amplamente empregados. A hiperalimentação precoce possui estreita correlação entre o ganho de peso corporal na infância e obesidade na vida adulta. Ao longo do último meio século, o progresso científico permitiu a gestão da obesidade e das doenças associadas através de diversas medidas. Contudo, opções de manejo dos casos não estão isentas das limitações. Há necessidade de novas intervenções, dado que nas últimas décadas, a prevalência global de sobrepeso/obesidade atingiu um nível pandêmico. (Jaber et al., 2021; Souza; Moura; Lisboa, 2022; Zong et al., 2023). A terapia celular utilizando as CMO e a terapia com seu secretoma emerge como importante estratégia em postergar a evolução do quadro inflamatório e o deseguilíbrio metabólico. Para testar nossa hipótese, analisamos comparativamente o transplante das CMO ou do seu secretoma em camundongos saudáveis e hiperalimentados na me-Ihoria do perfil inflamatório no tecido adiposo branco e também avaliamos o quadro inflamatório presente no secretoma anteriormente ao transplante.

O modelo de hiperalimentação na lactação por meio da redução de ninhada ao 3º dia pós-natal, é considerado de fácil implementação, custo mínimo de manutenção (Gomes Da Silva, 2017; Ferreira, 2020). Observamos o ganho significativo de peso desde os primeiros dias de vida (figura 10) até os 90 dias no grupo GH, em que o ganho de massa corporal foi superior a 20% comparado ao GC (figura 12). Isso reforça que a exposição à ingesta alimentar excessiva nos primeiros dias de vida predispõe ao desenvolvimento o quadro de síndrome metabólica na vida adulta, segundo informações do Desenvolvimento de Origem de Saúde e Doença (DOHaD) (De Souza Rodrigues Cunha *et al.*, 2009; Souza; Moura; Lisboa, 2022). A redução de ninhada nos primeiros dias pós-natais induz maior ingesta alimentar na prole ocasionando modificações na composição do leite da nutriz e gerando maior produção de triglicerídeos e decréscimo na produção de proteínas (Plagemann *et al.*, 1992; Harder *et al.*, 1999; De Souza Rodrigues Cunha *et al.*, 2009).

O ganho de peso substancial ao fim dos 90 dias em GH (figura 13) pode ser justificado pela exposição precoce à hiperalimentação no início da vida, que causa modificações epigenéticas e hormonais alterando o controle da ingesta alimentar e balanço energético, favorecendo o aumento da adiposidade. Roedores criados em pequenas ninhadas encontram-se acima do peso no desmame, mas os níveis podem variar entre as cepas, origem geográfica e tamanho da ninhada de 56% a 10% em ratos Wistar e Sprague Dawley a quase 30% em camundongos (C57BI / 6 ou Swiss) (Habbout et al., 2013). Lisboa e colaboradores mencionam que a hipearlimentação precoce favorece ganho acentuado de adiposidade já nos primeiros dias de vida e que o estado hiperfágico permanece mesmo após o desmame. Estas alterações são resultado de modificações adaptativas em resposta a hiperalimentação precoce (aumento do consumo de leite) conferindo modificações epigenéticas e hormonais nos mecanismos centrais e periféricos de controle da ingesta alimentar (Souza; Moura; Lisboa, 2022). Um fato interessante abordado na literatura é que em camundongos submetidos ao modelo de redução de ninhada, além de apresentarem maior adiposidade, apresentam resistência central à leptina, que é correlacionada com o estado hiperfágico presente na vida adulta (Lacerda; Malheiros; Abreu, 2016; Da Silva et al., 2019; Souza; Moura; Lisboa, 2022). Após 10 dias do recebimento da terapia com o secretoma ou CMO proveniente de camundongos cultivadas em P1, o peso final, aos 100 dias de vida, mostrou-se significativamente maior em todos os grupos hiperalimentados analisados quando comparados ao GC. As terapias contendo CMO ou secretoma, portanto, não foram eficientes em reverter o peso corporal ao fim dos 100 dias (figura 14). Porém, vale lembrar que o peso corporal se trata de uma medida que representa toda composição corporal (tecidos, órgãos e quantidade de fluidos corporais) constituída por componentes mais estáveis e como outros que podem variar ao longo do tempo. Portanto, outras formas de mensuração devem ser utilizadas em conjunto ao peso para avaliar o estado nutricional (Sousa Lacerda et al., 2016; Vaamonde; Álvarez-Món, 2020; Souza; Moura; Lisboa, 2022).

Os resultados dos parâmetros biométricos das gorduras epididimal, retroperitoneal e índice de Lee (figura 15) confirmaram o aumento nos depósitos de tecido adiposo branco no grupo GH aos 90 dias e corroborados pelos achados referentes ao ganho de massa corporal e elevado índice de Lee. Não houve diferenças no comprimento naso-anal entre os grupos GH e GC. Porém, ao verificarmos os parâmetros

relacionados ao índice de Lee, o grupo GH+SBc apresentou redução de maneira significativa desse índice (figura 16). O índice de Lee estima a obesidade em roedores, de forma similiar ao IMC em humanos. Apesar de nenhuma mudança no peso corporal total ao final do tratamento, a terapia com secretoma foi eficiente ao reduzir a gordura corporal em camundongos hiperalimentados. Este resultado é semelhante a outros estudos utilizando componentes dos secretoma, como por exemplo, o uso dos exossomos oriundos das CEM do tecido adiposo que foram capazes de reduzir a adiposidade corporal em camundongos obesos (Zhao et al., 2018; Jaber et al., 2021). Resultados preliminares com a terapia proveniente das CEM do tecido adiposo já demonstravam efeitos semelhantes (Mikłosz; Nikitiuk; Chabowski, 2022). Em trabalho prévio do nosso grupo, o transplante das CMO advindas da medula óssea de camundongos sadios foi capaz de reduzir a adiposidade corporal de camundongos hiperalimentados (Ferreira, 2020). Isso sugere, que a utilização do secretoma das CMO, também possui potencial terapêutico na tratativa da redução e modulação de adiposidade corporal por meio das biomoléculas presentes em sua composição. Quanto ausência da redução do tecido adiposo em GH+CMOo e GH+SBo, nem secretoma ou CMO provenientes dos animais hiperalimentados foram eficientes na redução dos depósitos de TAB refletidos pelos resultados significativamente elevados do índice Lee. Sugerimos que o secretoma/CEM possa ter tido modificações das propriedades terapêuticas em razão da intervenção nutricional aos quais animais doadores submetidos. Um estudo clínico com pacientes obesos expostos ao tratamento com agentes anti-TNF-α, foi possível observar a influência da obesidade na resposta à terapia, visto que os pacientes obesos obtiveram uma chance 60% maior de falha no tratamento. Ainda não se sabe ao certo por que pacientes obesos reagem menos ao tratamento, mas é nítido o impacto negativo que a obesidade traz à terapia (Singh et al., 2018).

A hiperglicemia nos animais GH (Figuras 17 A e B) é uma das consequências da hiperalimentação no início da vida pós natal e corresponde ao que é visto na literatura em relação ao modelo (Thole *et al.*, 2012; Ferreira, 2020). A hipernutrição em momentos cruciais do desenvolvimento aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento de hiperglicemia, resistência à insulina e diabetes do tipo 2 em virtude das alterações no sistema endócrino (Kammoun; Kraakman; Febbraio, 2014; Vieira-Potter, 2014; Francisqueti; Nascimento; Corrêa, 2015; Da Silva *et al.*, 2019). Sugere-se que o quadro hiperglicêmico ocorra em virtude das interferências advindas da redução da

ativação da via de insulina prejudicando a externalização dos transportadores de glicose (GLUTs) (Freitas; Ceschini, 2014; Kammoun; Kraakman; Febbraio, 2014; Da Cunha De Sá *et al.*, 2020). A hiperalimentação na infância também é capaz de promover alterações no desenvolvimento do pâncreas, neogênese de ilhotas β-pancreáticas e na regulação da secreção insulina na vida adulta (Cortez *et al.*, 2013; Patel; Buras; Balasubramanyam, 2013; Bonfante *et al.*, 2015; Sippel *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2019; Yaribeygi *et al.*, 2019).

A glicemia dos grupos de animais hiperalimentados que receberam células (GH+CMOo) ou secretoma (GH+SBo) obtidos de animais obesos permaneceram com quadro hiperglicêmico mesmo após a aplicação da terapia. A programação metabólica, afeta o equilíbrio glicêmico e contribui para o desenvolvimento dos distúrbios metabólicos, como hiperglicemia e hiperinsulinemia na fase adulta. Essa relação destaca a importância da nutrição adequada durante a lactação para prevenir consequências adversas na saúde metabólica dos indivíduos ao longo da vida. A redução glicêmica significativa no grupo GH+SBc, que recebeu secretoma obtido de animais sadios, pode estar relacionada com a característica do secretoma em possuir amplo repertório de biomoléculas anti-inflamatórias, como a IL-10, que age nos receptores IRS-1 e auxilia na fosforilação de Akt, permitindo sinalização e internalização da glicose nas células. A IL-10 contrapõe ações pró-inflamatórias do IL-6 e do TNF-α (Gao et al., 2016; Zhao et al., 2018; Tsuchiya et al., 2020). Uma única aplicação contendo secretoma nos animais GH+SBc, foi capaz de promover efeito positivo no quadro hiperglicêmico, ao reduzir a glicemia e melhorar a tolerância à glicose (figura 18). Esses efeitos benéficos produzidos possuem grande vantagem frente ao uso das células estromais mesenquimais na melhoria da glicemia, por ser uma terapia livre de células com riscos mínimos na formação de trombos, reações e comprometimento da ação terapêutica (Ferreira, 2020; Paris et al., 2021; Ferreira et al., 2022).

A morfologia das CMO nas culturas em 2 dias em P0 e aos 10 dias em P1 (figuras 19 e 21) não apresentaram diferenças morfológicas. Durante os 10 dias de cultivo em P1, sugerimos a presença indicativa de macrófagos, com morfologia tipicamente "estrelada" característica deste tipo celular foi observada. Os macrófagos expressam vários receptores, que monitoram e detectam as mudanças ambientais. São altamente plásticos e heterogêneos e pode ser um indicador de várias doenças inflamatórias. Em um importante trabalho de revisão sobre caracterização de macrófagos no contexto de doenças inflamatórias como a obesidade, o subtipo pró-inflamatório não clássico M1, é caracterizado pela expressão da integrina CD11b. Os macrófagos não clássicos são o principal agente inflamatório na inflamação aguda e crônica. O CD11b contribui para o extravasamento de macrófagos para os tecidos. Eles se distinguem pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-6 e contribuem para a degradação tecidual e ativação de células T. Além disso, a cultura em P1 ainda possui morfologia bastante heterogênea em ambos os grupos, indicativo da presença de outros tipos celulares compondo as CMO, como CTH, células progenitoras endoteliais e as próprias células estromais mesenquimais *et al(Todosenko et al., 2023; Zhang et al., 2024)*. Abordagens por meio da citometria de fluxo com marcadores específicos que permitam identificar populações de interesse, ensaios de proliferação, senescência celular e de estresse oxidativo seriam importantes aliadas para investigar de que forma obesidade afetaria as populações celulares presentes no cultivo em P1.

Em P0 do secretoma de CMO recém isoladas (figura 20), o grupo GH apresentou expressão significativa de citocinas pró-inflamatórias. Esses resultados convergem com achados na literatura analisando o perfil inflamatório da CMO na obesidade. As células apresentavam senescência acelerada (marcadores de senescência p53, p21), aumento de ROS e expressão acentuada IL-6 (Zong et al., 2023). Trabalho anteriores realizados por nosso grupo já descreviam a presença da imunomarcação para TNF-α na medula óssea de camundongos Swiss hipearalimentados. Portanto, a presença de TNF-α no secretoma confirmaria a presença do atividade pró-inflamatória das CMO dos animais hiperalimentados (Gomes Da Silva, 2017; Ferreira, 2020). A IL-6 é produzida por várias células, incluindo células T, células B, macrófagos e células estromais mesenquimais na medula óssea. Ela está envolvida na regulação de respostas imunes, inflamação, hematopoiese e metabolismo ósseo. Na obesidade, elevados níveis de IL-6 e TNF-α prejudicam a diferenciação osteogênica em condições fisiológicas normais. Em contrapartida, há hiper estimulação da adipogênese e atividade dos osteoclastos ocasionando o aumento da reabsorção óssea (Zong et al., 2023). A IL-17 no contexto da obesidade é descrita como estimuladora da liberação das citocinas pró-inflamatórias e das moléculas pró-osteoclastogênicas, envolvidas em doenças inflamatórias ósseas. É secretada por linfócitos Th17 que secretam IL17-A e IFNy (Lee et al., 2013). Essas citocinas são fortemente correlacionadas a evolução da síndrome metabólica, aumentando a adiposidade na MO ao interromperem sinalizações biomoleculares e conexões físicas entre as células (Zong et al., 2023).

A quantificação das citocinas presentes no secretoma das CMO cultivadas em P1, apenas a citocina TNF-α apresentou-se significativamente elevada no GH em relação grupo GC (figura 22). O microambiente obesogênico é altamente pró-inflamatório e as CMO têm seu potencial terapêutico modulado assim como a produção do seu secretoma. Um trabalho analisando comparativamente o secretoma das CEM de camundongos obesos chegou à conclusão que as CEM do tecido adiposo visceral perderam suas funções específicas de desintoxicação e eliminação de ROS. Já o secretoma das CEMs do tecido adiposo subcutâneo e da medula óssea possuíam atividades antioxidantes prejudicadas (Ayaz-Guner et al., 2020). Ainda que ao 10º dia de cultivo os níveis do TNF-α tenham permanecido elevados na cultura do GH em P1, sugerimos investigações adicionais para confirmar se os níveis da citocina permaneceriam elevados ao fim das passagens, em P3, ou se o próprio microambiente 2D estimularia a reversão da produção da citocina pró-inflamatória TNF-α pelas CMO. Da mesma forma, seria de suma importância realizar a citometria das CMO tripsinizadas em P1 para identificar as populações presentes no momento do transplante e se há diferenças no pool de células entre animais saudáveis e hiperalimentados.

O TAB foi reconhecido como um órgão endócrino complexo que serve como regulador mestre da homeostase energética sistêmica, desempenhando funções metabólicas complexas. Ao quantificar a citocina inflamatória TNF-α no TAB anteriormente a terapia, os animais GH já apresentavam presença do quadro inflamatório crônico no TAB de forma significativa, ressaltada pela presença do marcador (Figuras 23 e 24). Os animais após receberem a terapia com CMO ou secretoma proveniente de animais obesos em GH+CMOo e GH+SBo (Figura 25 e 26) apresentaram marcação para TNF-α significativa. Portanto, a terapia única com secretoma ou CMO oriunda de animais hiperalimentados não obteve sucesso em atenuar a presença de TNF-α no tecido adiposo branco epididimal. Análises complementares serão necessárias para confirmar, primeiramente, se a administração de mais doses de CMO ou de SB proveniente dos animais hiperalimentados resultariam em respostas iguais ou mais efetivas na resolução do processo inflamatório no TAB. Em segundo, se maior permanência em cultivo (P0 a P3) seria capaz de melhorar a eficiência terapêutica das CMO ou secretoma ao selecionar populações específicas para permanecer em cultivo. Uma vez que as CMO eram provenientes de animais já com indicativo de alterações metabólicas. Quanto a marcação significativamente elevada de TNF-α em GH+CMOc em relação ao GC e GH+SBc, sugerimos que uma única dose não foi o suficiente para estimular os efeitos imunorreparadores e de remodelamento tecidual. A terapia utilizando células administradas por via endovenosa (veia caudal) ou no próprio local de lesão enfrentam obstáculos até que chegue ao órgão/tecido alvo. A falta de padronização das doses e escolha da rota de administração podem refletir na biodistribuição das células e tem gerado resultados divergentes entre os autores (Lee *et al.*, 2009; Zhuang *et al.*, 2021). Além disso, o próprio caráter sistêmico da obesidade nos animais hiperalimentados utilizados no trabalho, justifica a escolha da via de administração intraperitoneal do secretoma/CMO.

A obesidade está associada à expansão prejudicial e à disfunção do TAB, assim como na alteração do fenótipo dos macrófagos residentes liberando citocinas e fatores que desencadeiam resistência à insulina aumentando o risco de doenças metabólicas (Ying *et al.*, 2017). Apesar de não significativa, o tratamento com secretoma no grupo GH+SBc apresentou tendência de redução da expressão de TNF- α no TAB, com imunomarcação semelhante a GC (figura 25 e 26). Isso poderia explicar o mecanismo pelo qual o secretoma proveniente das CMO exerce os seus efeitos normoglicêmicos e de supressão do marcador inflamatório TNF- α . Semelhante ao nosso trabalho, outros achados demonstraram atenuação em marcadores inflamatórios após administração de CEM em modelos animais alimentados com dieta hiperlipídica (Jaber *et al.*, 2021). Os exossomos presentes no secretoma da CEM contêm miRNAs, como miR-181c e miR-146a, que inibem a sinalização do receptor-4 tipo Toll, estimulando a polarização dos macrófagos no subtipo M2, conhecido por ações anti-inflamatórias (Zhao *et al.*, 2018; Dabrowska *et al.*, 2021).

De forma complementar, para confirmar a eficiência do transplante do secretoma na melhoria do quadro hiperglicêmico e RI, sugerimos técnicas complementares como o western-blotting conhecida por ser uma técnica quantitativa permite detectar e mensurar proteínas. Com ela podemos analisar, por exemplo, funcionamento de vias envolvidas na sinalização de insulina, que permitiriam confirmar a eficiência do transplante do secretoma em ativar proteínas efetoras responsáveis pela translocação dos transportadores de glicose para a superfície celular do TAB, assim como a resposta pós-transplante do secretoma de outros tecidos insulina dependentes, como músculo, pâncreas e fígado. Não menos importante, análises futuras são necessárias para avaliar o tempo de permanência do efeito terapêutico a longo prazo. O potencial de direcionamento do uso do secretoma no tratamento da obesidade, RI e hiperglicemia vem ganhando interesse substancial na pesquisa translacional. Com base nos achados apresentados de que o secretoma das CMO de animais saudáveis controla a hiperglicemia, reduz a adiposidade e inflamação do TAB em camundongos hiperalimentados. Propomos que o secretoma atuaria como mensageiros naturais para a conversa cruzada entre as CMO e resolução da inflamação, prevenindo assim, distúrbios metabólicos envolvidos na progressão da obesidade.

CONCLUSÃO

O trabalho apresentou a importância da funcionalidade do uso do secretoma para o tratamento de doenças relacionadas à obesidade utilizando modelo animal experimental de hiperalimentação nos primeiros dias de vida pós natal. Observou-se que o secretoma das CMO de camundongos hiperalimentados apresentavam perfil próinflamatório diferentemente do secretoma de animais saudáveis. Ao decorrer do cultivo *in vitro*, o secretoma dos camundongos hiperaimentados apresentou mudança no perfil de citocinas, com presença significativa apenas de TNF-α aos 10 dias em P1. Além disso, o uso do secretoma proveniente CMO dos animais saudáveis mostrou-se como alternativa terapêutica vantajosa frente a utilização das CMO propriamente ditas. A terapia utilizando o secretoma foi capaz de promover redução do índice de Lee, quadro hiperglicêmico e inflamação do tecido adiposo branco nos animais hiperalimentados forma proeminente. Experimentos futuros devem ser realizados antes de avançarmos na avaliação do transplante de secretoma e seus derivados de forma combinada ou isolada no tratamento de doenças concomitantes a obesidade em humanos.

REFERÊNCIAS

ABDELAAL, M.; LE ROUX, C. W.; DOCHERTY, N. G. Morbidity and mortality associated with obesity.v.5, n.7. 2017.

ALMEIDA, A. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation ameliorates renal injury through anti-fibrotic and anti-inflammatory effects in chronic experimental renovascular disease. *Biomedical Journal*, v. 45, n. 4, p. 629–641, 1 ago. 2022.

ANDRADE, R. S. de; CESSE, E. Â. P.; FIGUEIRÓ, A. C. Cirurgia bariátrica: complexidades e caminhos para a atenção da obesidade no SUS. *Saúde em Debate*, v. 47, n. 138, p. 641–657, 15 set. 2023. Disponível em: https://www.scielo.br/j/sdeb/a/HbznwLr9g4FhTkWFRS7Dv9N/s.

ASADA, N.; TAKEISHI, S.; FRENETTE, P. S. Complexity of Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche. *Int J Hematol*, v. 106, n. 1, p. 45–54, 2017. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28534115>.

ASHRAFIZADEH, M. et al. Exosomes as Promising Nanostructures in Diabetes Mellitus: From Insulin Sensitivity to Ameliorating Diabetic ComplicationsInternational Journal of NanomedicineDove Medical Press Ltd, , 2022. Disponível em: https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=dijn20>.

AYAZ-GUNER, S. et al. A comparative study on normal and obese mice indicates that the secretome of mesenchymal stromal cells is influenced by tissue environment and physiopathological conditions. *Cell Communication and Signaling*, v. 18, n. 1, 2020a. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s12964-020-00614-w.

BARI, E. et al. Mesenchymal Stromal Cell Secretome for Severe COVID-19 Infections: Premises for the Therapeutic Use. *Cells*, v. 9, n. 4, p. 924, 9 abr. 2020. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/924>.

BASTÍAS-PÉREZ, M.; SERRA, D.; HERRERO, L. Dietary Options for Rodents in the Study of Obesity. *Nutrients*, v. 12, n. 11, p. 3234, 1 nov. 2020. Disponível em: ">https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7690621/>.

BIONDI, G. et al. Adipose Tissue Secretion Pattern Influences β-Cell Wellness in the Transition from Obesity to Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 5522*, v. 23, n. 10, p. 5522, 15 maio 2022. Disponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/23/10/5522/htm.

BOCHON, B. et al. Mesenchymal Stem Cells—Potential Applications in Kidney Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 10, p. 2462, 18 maio 2019. Disponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/20/10/2462.

BONFANTE, I. L. P. et al. NOVOS ACHADOS RELACIONADOS AO TECIDO ADIPOSO: UMA REVISÃO DE LITERATURA SOBRE O BROWNING E IRISINA. *Revista Arquivos de Ciências da Saúde*, v. 22, n. 2, p. 9, 13 jul. 2015. Disponível em: ">http://www.>.

BURHANS, M. S. et al. Contribution of adipose tissue inflammation to the development oftype 2 diabetes mellitus. *Comprehensive Physiology*, v. 9, n. 1, p. 1, 12 dez. 2018.

Disponível em: </pmc/articles/PMC6557583/>.

CALVI, L. M.; LINK, D. C. *The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and diseaseBlood*American Society of Hematology, , 26 nov. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4661168/?report=abstract>.

CHEN, J. et al. *Mesenchymal stromal cell-mediated immune regulation: A promising remedy in the therapy of type 2 diabetes mellitusStem Cells* (), 1 jul. 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33621403/.

CORTEZ, M. et al. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF-α production by increasing NF-κB and attenuating PPAR-γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation*, v. 36, n. 2, p. 379–386, abr. 2013. Disponível em: ">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23079940/.

CURLEY, G. F. et al. Mesenchymal stem cells enhance recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat. *Thorax*, v. 67, p. 496–501, 2012. Disponível em: http://thorax.bmj.com/>.

DA CUNHA DE SÁ, R. D. C. et al. Fish oil reverses metabolic syndrome, adipocyte dysfunction, and altered adipokines secretion triggered by high-fat diet-induced obesity. *Physiological Reports*, v. 8, n. 4, 1 fev. 2020. Disponível em: ">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32109344/.

DA SILVA, N. I. et al. Adipocinas e sua relação com a obesidade. *Revista EVS - Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, v. 46, n. 1, p. 53–64, 24 jun. 2019. Disponível em: http://seer.pucgoias.edu.br/index.php/estudos/article/view/7179.

DABROWSKA, S. et al. *Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative DiseasesFrontiers in Immunology*Frontiers Media S.A., , 5 fev. 2021. . Disponível em: <www.frontiersin.org>.

DE OLIVEIRA, G. P. et al. Impaired mitochondrial function and reduced viability in bone marrow cells of obese mice. *Cell and Tissue Research*, v. 357, n. 1, p. 185–194, 2014. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24744266/>.

DE SOUZA RODRIGUES CUNHA, A. C. et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion - the role of GLUT-2. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 20, n. 6, p. 435–442, 1 jun. 2009.

DIAS, I. et al. Secretome effect of adipose tissue-derived stem cells cultured twodimensionally and three-dimensionally in mice with streptozocin induced type 1 diabetes. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, v. 2, p. 100069, 1 jan. 2021.

DOMINICI, M. et al. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>.

DOYLE, L. M.; WANG, M. Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysisCellsMultidisciplinary Digital Publishing Institute, , 15 jul. 2019. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/727/htm.

ELEUTERI, S.; FIERABRACCI, A. Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applicationsInternational Journal of Molecular SciencesInt J Mol Sci, , 2 set. 2019. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31533317/>.

FERNÁNDEZ-FRANCOS, S. et al. Mesenchymal stem cells as a cornerstone in a galaxy of intercellular signals: Basis for a new era of medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 7, p. 3576, 1 abr. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ijms22073576>.

FERREIRA, A. L. Efeito do transplante de células de medula óssea no perfil inflamatório e resistência à insulina em tecido adiposo de camundongos hiperalimentados. *Universidade do Estado do Rio de Janeiro*, v. 71, p. 0–71, 2020. https://www.bdtd.uerj.br:8443/handle/1/17529>.

FERREIRA, A. L. et al. Mesenchymal stem cell secretome and nanotechnology: Combining therapeutic strategies. *Biocell*, v. 46, n. 6, 2022.

FERREIRA, J. R. et al. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*, v. 0, p. 2837, 2018.

FRANCISQUETI, F. V. [UNESP]; NASCIMENTO, A. F. do; CORRÊA, C. R. [UNESP]. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. *Currículo Lattes*, p. 81–89, 2015. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/handle/11449/141079>. Acesso em: 1 fev. 2021.

FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L. Resistência À Insulina Associado À Obesidade: Efeitos Anti-Inflamatórios Do Exercício Físico - Doi: http://dx.doi.org/10.18511/0103-1716/rbcm.v22n3p139-147. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v. 22, n. 3, p. 139–147, 6 set. 2014. Disponível em: <https://portalrevistas.ucb.br/index.php/RBCM/article/view/4769>.

FRUH, S. M. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable longterm weight management. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, v. 29, n. S1, p. S3–S14, 1 out. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29024553/>..

GAO, F. et al. *Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospectsCell Death and Disease*Nature Publishing Group, , 21 jan. 2016. . Disponível em: https://www.nature.com/articles/cddis2015327>.

GAO, J. et al. The Dynamic in vivo Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Infusion. *Cells Tissues Organs*, v. 169, n. 1, p. 12–20, 1 jul. 2001. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1159/000047856>.

GOMES DA SILVA, C. Efeitos da obesidade na migração, proliferação e diferenciação de células-tronco da medula óssea de camundongos Swiss. 6 nov. 2017. Disponível em: https://www.bdtd.uerj.br:8443/handle/1/7886>.

GUGLIANDOLO, A.; MAZZON, E. Dental mesenchymal stem cell secretome: An intriguing approach for neuroprotection and neuroregenerationInternational Journal of Molecular SciencesInt J Mol Sci, , 1 jan. 2022. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35008878/>.

HABBOUT, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. *The Journal* of Nutrition, v. 143, n. 5, p. 553–562, 1 maio 2013.

HARDER, T. et al. Overweight And Increased Diabetes Susceptibility In Neonatally Insulin-Treated Adult Rats. *Endocr Regul.*, v. 33, n. 1, p. 25–31, 1999.< https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10200585/>.

HARRELL, C. et al. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*, v. 8, n. 5, p. 467, 2019. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/cells>.

HU, J. C. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel and potential remedy for cutaneous wound healing and regeneration. *World Journal of Stem Cells*, v. 14, n. 5, p. 318–329, 2022. Disponível em: https://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v14.i5.318>.

ILTIS, A. S. et al. Ethical, legal, regulatory, and policy issues concerning embryoids: a systematic review of the literature. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 14, n. 1, p. 1– 15, 1 dez. 2023. Disponível em: https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-023-03448-8>.

JABER, H. et al. The therapeutic effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on obesity and its associated diseases in diet-induced obese mice. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–9, 18 mar. 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-85917-9>.

JAMSHIDI, E. et al. Proposed Mechanisms of Targeting COVID-19 by Delivering Mesenchymal Stem Cells and Their Exosomes to Damaged OrgansStem Cell Reviews and ReportsSpringer, , 1 fev. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12015-020-10109-3.

JOVIC, D. et al. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. *Stem Cell Reviews and Reports 2022*, v. 1, p. 1–21, 28 mar. 2022. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s12015-022-10369-1.

KAMMOUN, H. L.; KRAAKMAN, M. J.; FEBBRAIO, M. A. Adipose tissue inflammation in glucose metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 15, n. 1 LB-Kammoun2014, p. 31–44, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11154-013-9274-4.

KIRICHENKO, T. V. et al. The Role of Adipokines in Inflammatory Mechanisms of Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 23, 1 dez. 2022. Disponível em: /pmc/articles/PMC9740598/>.

KONALA, V. B. R. et al. *The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regenerationCytotherapy*Taylor and Francis Ltd, , 1 jan. 2016.< https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26631828/>.

LACERDA, M. S.; MALHEIROS, G. C.; ABREU, A. de O. W. de. Tecido Adiposo, Uma Nova Visão: As Adipocinas E Seu Papel Endócrino. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 11, n. 2, p. 25–31, 16 dez. 2016. Disponível em: <http://www.fmc.br/ojs/index.php/RCFMC/article/view/6>. Acesso em: 1 fev. 2021.

LEE, R. H. et al. Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell*, v. 5, n. 1, p. 54–63, 2009. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590909002124>.

LEE, Y. The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases. *BMB Rep*, v. 46, n. 10, p. 479–483, 2013. Disponível em: <www.bmbreports.org>.

LI, H. et al. Mouse Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Paracrine Alleviates Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy by Reducing Myofibroblast Transdifferentiation and Cell Proliferation and Upregulating MMPs in Mesangial Cells. *Journal of Diabetes Research*, v. 2020, 2020.

LIU, L. et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Rescue Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury by Inducing Cardiomyocyte Autophagy Via AMPK and Akt Pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 43, n. 1, p. 52–68, 1 out. 2017. Disponível em: https://www.karger.com/Article/FullText/480317.

LOTFY, A.; ABOQUELLA, N. M.; WANG, H. *Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)derived exosomes in clinical trialsStem Cell Research and Therapy*BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2023. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-023-03287-7>.

LUONG, Q.; HUANG, J.; LEE, K. Y. Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. *Biology (Basel)*, v. 8, n. 2, 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30978929>.

MARTINS, F. S. M. MECANISMOS DE AÇÃO DA INSULINA 1 Introdução. *Rev Med* (São Paulo). 2006 out.-dez.;85(4) edição comemorativa:124-9, p. 1–13, 2016.

MIKŁOSZ, A.; NIKITIUK, B. E.; CHABOWSKI, A. Using adipose-derived mesenchymal stem cells to fight the metabolic complications of obesity: Where do we stand? *Obesity Reviews*, v. 23, n. 5, p. e13413, 1 maio 2022. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/obr.13413. Acesso em: 17 fev. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância De Fatores De Risco e Proteção Para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico Estimativas Sobre Frequência e Distribuição Sociodemográfica De Fatores De Risco e Proteção. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em: 21 fev. 2024.

MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. *The bone marrow niche for haematopoietic stem cellsNature*Nature Publishing Group, , 15 jan. 2014. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nature12984>.

MUNOZ-PEREZ, E. et al. *Mesenchymal stromal cell secretome for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: Latest trends in isolation, content optimization and delivery avenuesPharmaceutics*Multidisciplinary Digital Publishing Institute, , 27 out. 2021. Disponível em: https://www.mdpi.com/1999-4923/13/11/1802/htm.

PALLADINO, M. A. et al. Anti-TNF-α therapies: the next generation. *Nature Reviews Drug Discovery 2003 2:9*, v. 2, n. 9, p. 736–746, 2003. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nrd1175>.

PARIS, G. C. et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in multiple organs affected by COVID-19. *Life Sciences*, v. 278, p. 119510, 1 ago. 2021. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320521004951.

PATEL, P. S.; BURAS, E. D.; BALASUBRAMANYAM, A. *The role of the immune system in obesity and insulin resistanceJournal of Obesity* Hindawi Publishing Corporation, , 2013. Disponível em: ">http://dx.>.

PHAM, D. V.; NGUYEN, T. K.; PARK, P. H. Adipokines at the crossroads of obesity and mesenchymal stem cell therapyExperimental and Molecular Medicine, 2023. . Disponível em: https://doi.org/10.1038/s12276-023-00940-2>.

PITTENGER, M. F. et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regenerative Medicine*, v. 4, n. 1, p. 22, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>.

PLAGEMANN, A. et al. Obesity and Enhanced Diabetes and Cardiovascular Risk in Adult Rats due to Early Postnatal Overfeeding. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, v. 99, n. 3, p. 154–158, 1992. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1526266/>.

RIAZIFAR, M. et al. Stem Cell-Derived Exosomes as Nanotherapeutics for Autoimmune and Neurodegenerative Disorders. *ACS Nano*, v. 13, n. 6, p. 6670–6688, 25 jun. 2019. Disponível em: /pmc/articles/PMC6880946/>.

ROHBAN, R.; PIEBER, T. R. *Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: Tissue specificity and regenerative potentialStem Cells International*Stem Cells Int, , 2017. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28286525/>.

RUCK, L.; WIEGAND, S.; KÜHNEN, P. *Relevance and consequence of chronic inflammation for obesity developmentMolecular and Cellular Pediatrics*SpringerOpen, 14 nov. 2023. Disponível em: https://molcellped.springeropen.com/articles/10.1186/s40348-023-00170-6>.

SABRY, D. et al. The effect of exosomes derived from mesenchymal stem cells in the treatment of induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Biotechnology Letters*, v. 42, n. 8, p. 1597–1610, 1 ago. 2020. Disponível em: ">https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-020-02908-y>.

SALDANHA-ARAUJO, F. et al. Mesenchymal Stem Cells: A New Piece in the Puzzle of COVID-19 Treatment. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 1563, 3 jul. 2020.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. *Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing linksCell*Elsevier B.V., , 2 mar. 2012. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22385956/>.

SEBO, Z. L. et al. Bone Marrow Adiposity: Basic and Clinical Implications. *Endocrine Reviews*, v. 40, n. 5, p. 1187, 10 maio 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6686755/>..

SELVARAJ, C. et al. Exploring the macromolecules for secretory pathway in cancer disease. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, v. 133, p. 55–83, 1 jan. 2023.

SI, Y. et al. Infusion of Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Hyperglycemia in Type 2 Diabetic RatsIdentification of a Novel Role in Improving Insulin Sensitivity. *Diabetes*, v. 61, n. 6, p. 1616–1625, 1 jun. 2012b. Disponível em: https://dx.doi.org/10.2337/db11-1141. Acesso em: 17 abr. 2024.

SIPPEL, C. A. et al. PROCESSOS INFLAMATÓRIOS DA OBESIDADE. Revista

Brasileira de Ciências da Saúde - USCS, v. 12, n. 42, p. 48–56, 26 jan. 2015. Disponível em:

<https://seer.uscs.edu.br/index.php/revista_ciencias_saude/article/view/2310>. Acesso em: 1 fev. 2021.

SMADJA, D. M. et al. Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia. *Bone Marrow Transplantation*, v. 47, n. 7, p. 997–1000, 10 jul. 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1038/bmt.2011.196>. Acesso em: 15 dez. 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA. Obesidade atinge mais de 6,7 milhões de pessoas no Brasil em 2022. Disponível em: <https://www.sbcbm.org.br/obesidade-atinge-mais-de-67-milhoes-de-pessoas-nobrasil-em-2022/>. Acesso em: 21 fev. 2024.

SOUZA, L. L.; MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. *Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the OffspringNutrients*Nutrients, , 1 maio 2022. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35631188/. Acesso em: 23 maio. 2024.

SUN, Y. et al. Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving β -cell destruction. *ACS Nano*, v. 12, n. 8, p. 7613–7628, 28 ago. 2018a. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30052036/>. Acesso em: 27 abr. 2021.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from MouseEmbryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell, v. 126, n. 4, p. 663–676,25ago.2006.Disponívelem:<http://www.cell.com/article/S0092867406009767/fulltext>.

TERAMURA, T.; FRAMPTON, J. Induced pluripotent stem cells in reproductive medicineReproductive Medicine and Biology, 2013.

THOLE, A. A. et al. Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice. *Tissue and Cell*, v. 44, n. 4, p. 238–248, 2012. Disponível em: ">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22537687/>.

TSUCHIYA, A. et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells and their exosomes in severe novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases. *Inflammation and Regeneration*, v. 40, n. 1, p. 14, 2020. Disponível em: ">https://doi.org/10.1186/s41232-020-00121-y>.

VAAMONDE, J. G.; ÁLVAREZ-MÓN, M. A. Obesity and overweight. *Medicine (Spain)*, v. 13, n. 14, p. 767–776, 2020a. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight.

et al. N. Immunology of COVID-19: Current VABRET, State of the ScienceImmunityCell Press, 16 2020. Disponível jun. em: <a>https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002>. Acesso em: 15 dez. 2020.

VERMA, Y. K. et al. COVID-19 and its Therapeutics: Special Emphasis on Mesenchymal Stem Cells Based TherapyStem Cell Reviews and ReportsSpringer, , 1 fev. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12015-020-10037-2>

VIEIRA-POTTER, V. J. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues.

Cellular Microbiology, v. 16, n. 10, p. 1484–1492, 2014. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25073615/.

WELSH, J. A. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 13, n. 2, 1 fev. 2024.https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jev2.12404>.

WHO. **Obesity and overweight.** Disponível em: https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 3 set. 2024.

YARIBEYGI, H. et al. *Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanismsJournal of Cellular Physiology*Wiley-Liss Inc., , 1 jun. 2019. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30317615/>.

YE, J. *Mechanisms of insulin resistance in obesityFrontiers of Medicine in China*NIH Public Access, , 1 mar. 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3936017/?report=abstract>.

YING, W. et al. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate in Vivo and in Vitro Insulin Sensitivity. *Cell*, v. 171, n. 2, p. 372- 384.e12, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.035>.

ZHANG, Y. et al. PDX-1: A Promising Therapeutic Target to Reverse Diabetes. *Biomolecules*, v. 12, n. 12, 1 dez. 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC9775243/>.

ZHAO, H. et al. Exosomes from Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity through Polarizing M2 Macrophages and Beiging in White Adipose Tissue. *Diabetes*, v. 67, n. 2, p. 235–247, 1 fev. 2018. Disponível em:

ZHOU, J.; SHI, Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): origin, immune regulation, and clinical applications. *Cellular & Molecular Immunology 2023 20:6*, v. 20, n. 6, p. 555–557, 24 maio 2023. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41423-023-01034-9.

ZHU, Z. et al. *MicroRNAs e células-tronco mesenquimais: Esperança para a hipertensão pulmonarBrazilian Journal of Cardiovascular Surgery*Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, , 1 jul. 2015. Disponível em: .">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-76382015000300015&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

ZHUANG, W. Z. et al. Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical applicationsJournal of Biomedical ScienceBioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00725-7>.

ZONG, Q. et al. Are the Properties of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Influenced by Overweight and Obesity?International Journal of Molecular SciencesMultidisciplinary Digital Publishing Institute, , 2 mar. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4831/htm>.

Anexo A

CEUA

Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA)





CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação morfofuncional das células-tronco de medula óssea em modelo de obesidade e diabetes mellitus tipo 2", registrada com o nº 026/2018, sob a responsabilidade de Alessandra Alves Thole - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 24/05/2018, teve sua vigência estendida para 24/05/2024, em reunião de 12/04/2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigencia da autorização	24/05/2022
	Validade estendida: 24/05/2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Suiço
Nº de animais	56
Peso/Idade	40 - 70 g / 0 – 90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 12 de Abril de 2023.

ad fame

Dr. Claudio C. Filgueiras Professor Associado Matr. 33080-3 Coordenador CEUA/IBRAG/UERJ

al abun Villaco

Dra. Yael A. Villaça Professora Associada Matr. 35066-0 Vice Coordenadora CEUA/IBRAG/UERJ

http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica ceua.ibrag@uerj.br

Anexo B

Artigo publicado

https://www.e-publicacoes.uerj.br/bjhbs/article/view/68182

BJHBB BIHBBB OF HEALTH AND BIOMEDICAL SCIENCES

Review article

How stem cell therapy can act in the treatment of patients with Covid-19

Mateus A. Rainho,¹ Aline de A. Azevedo,¹ Gustavo C. Paris,¹ Adriana L. Ferreira,¹ Yanca M. de A. Azevedo,¹ Júlia L. T. Sodré,¹ Giovanna F. de L. Mynssen,¹ Genilza P. de Oliveira,¹ Karina R. Silva,¹ Erika A. C. Cortez,¹ Ana C. Stumbo,¹ Simone N. Carvalho,¹ Lais de Carvalho,¹ Alessandra A. Thole^{1,*}

Abstract

Introduction: The emergence of a new coronavirus has changed the world and caused one of the biggest global health crises of the past 100 years. The protagonist of the pandemic, the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), is responsible for the coronavirus disease 2019 (Covid-19), which leads to dysfunctions in a plethora of systems, especially in severe cases. Therefore, researchers and healthcare professionals are making great efforts to develop a therapy that helps the many organs affected by the disease, for which mesenchymal stem cells (MSCs) arise as promising candidates. MSCs can offer benefits at different phases of Covid-19, since they have important anti-inflammatory and tissue repair properties. Objective: This review aims to elucidate how MSCs can contribute in the Covid-19 Laboratório de Pesquisa em Células-Tronco (LPCT), Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Correspondence address:

LPCT, Instituto de Biologia, UERJ Avenida Prof. Manoel de Abreu 444, 3° andar Rio de Janeiro, RJ, Brazil. CEP: 20550-170. E-mail: alethole@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0623-9587

BJHBS, Rio de Janeiro, 2022;21(1):54-60 DOI: 10.12957/bjhbs.2022.68182 Received on 28/06/2021. Approved on 16/11/2021.

Anexo C

Artigo publicado

https://www.sciencedirect.com/org/science/article/pii/S0327954522000810

Open Access REVIEW



ADRIANA L. FERREIRA, GUSTAVO C. PARIS, ALINE DE A. AZEVEDO, ERIKA A. C. CORTEZ, SIMONE N. CARVALHO, LAIS DE

CARVALHO, ALESSANDRA A. THOLE*

Laboratory of Stem Cell Research, Roberto Alcantara Gomes Biology Institute, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, 20540170, Brazil

* Corresponding Author: Alessandra A. Thole, alethole@uol.com.br

(This article belongs to the Special Issue: Mesenchymal Stem Cells, Secretome and Biomaterials: Regenerative Medicine Application)

BIOCELL 2022, 46(8), 1807-1813. https://doi.org/10.32604/biocell.2022.019363

Received 19 September 2021; Accepted 13 December 2021; Issue published 22 April 2022



🔎 Download PDF



Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) have pushed the field of stem cell-based therapies by inducing tissue regeneration, immunosuppression, and angiogenesis mainly through vesicles and soluble factors release (paracrine signaling). MSC-extracellular vesicles (MSC-EV) adaptable secretome and homing to injured sites allowed researchers to unlock a new era of cell-free based therapy. In parallel, nanoparticles (NP) have been explored in contributing to transport and drug delivery systems, giving drugs desired physical-chemical properties to exploit cell behavior. However, NPs can be quickly recognized by immune cells and cleared from circulation. In this viewpoint, we explore how combining both therapeutic strategies can improve efficacy and circumvent limitations of both therapies. MSCEV benefit from the potent MSC membrane composition, guiding chemotaxis to tumor sites, a very restricted microenvironment. MSC-EV has low immunogenicity, high stability, long half-life and can explore tissue targeting ligands as a precise drug carry, even across biological barriers. Those properties promote enhanced targeted drug delivery that can be combined with NP, exploring biological membrane production through: 1. direct cell therapy with NP-infused MSC; 2. NP-containing MSC-EV generated by NP-infused MSC; 3. by coating NP in MSC membrane ("MSC NanoGhosts"), allowing precise cargo definition without losing targeting. Therefore, nanotechnology combined with cell-based therapeutic resources can greatly improve targeted drug delivery, improving efficacy and opening a new venue of therapeutic possibilities.

Keywords

Mesenchymal stem cells, Nanoparticles, Secretome, Exosome, Targeted drug delivery

Cite This Article

Anexo D

Artigo publicado https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324922009227



G.C. Paris, A.L.B.D. Cardoso, M.A. Rainho, D.C. Andrade, A.A. Azevado, A.L. Ferreira, Y.M.A. Azevedo, T.H.A.G. Freire, A.C.R.N. Martins, G.P. Oliveira, K.R. Silva, E.A.C. Cortez, A.C. Stumbo, S.N. Carvalho, L. de Carvalho, M.B. Filho, A.A. Thole

Show more 🗸

+	Add to	Mendeley	😪 Share	🗾 Cite
---	--------	----------	---------	--------

https://doi.org/10.1016/S1465-3249(22)00922-7 7

.

Get rights and content abla

· I I · · · ·

Anexo E

Artigo publicado https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320521004951



Life Sciences Volume 278, 1 August 2021, 119510



Review article

Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in multiple organs affected by COVID-19

Gustavo C. Paris, Aline A. Azevedo, Adriana L. Ferreira, Yanca M.A. Azevedo, Mateus A. Rainho, Genilza P. Oliveira, Karina R. Silva, Erika A.C. Cortez, Ana C. Stumbo, Simone N. Carvalho, Lais de Carvalho, Alessandra A. Thole 🙁 🖾

Show more 🗸

🕂 Add to Mendeley 🛛 😪 Share 🍠 Cite

https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119510 7

Get rights and content 🛪

Highlights

- COVID-19 pathophysiology affects a miryad of organs and tissues. Even recovered patients have lingering tissue dysfunction
- MSC have shown immunomodulatory, angiogenic, antiinflammatory, and anti-apoptotic properties in related pre-clinical models
- MSC generally improves inflamation resulotion, enhances cell