



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

BEATRIZ FANTONI

**REVISÃO DAS ETAPAS CRÍTICAS PARA ISOLAMENTO DE
VESÍCULAS EXTRACELULARES ORIGINADAS DO MEIO DE
CULTURA DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS
HUMANAS USANDO ULTRACENTRIFUGAÇÃO**

PIRACICABA

2022

BEATRIZ FANTONI

**REVISÃO DAS ETAPAS CRÍTICAS PARA ISOLAMENTO DE
VESÍCULAS EXTRACELULARES ORIGINADAS DO MEIO DE
CULTURA DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS
HUMANAS USANDO ULTRACENTRIFUGAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para obtenção do título
de Cirurgião Dentista.

Orientador: Marcelo Rocha Marques

Co-orientadora: Larissa Lopes Rodrigues

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO
PELA ALUNA BEATRIZ FANTONI E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCELO ROCHA MARQUES.

PIRACICABA

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Fantoni, Beatriz, 1998-
F218r Revisão das etapas críticas para isolamento de vesículas extracelulares originadas do meio de cultura de células estromais mesenquimais humanas usando ultracentrifugação / Beatriz Fantoni. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Marcelo Rocha Marques.
Coorientador: Larissa Lopes Rodrigues.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Exossomos. 2. Vesículas extracelulares. 3. Células mesenquimais estromais. 4. Ultracentrifugação. I. Marques, Marcelo Rocha, 1976-. II. Rodrigues, Larissa Lopes, 1989-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Review of critical steps for isolation of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cell using ultracentrifugation

Palavras-chave em inglês:

Exosomes

Extracellular vesicles

Mesenchymal stem cells

Ultracentrifugation

Titulação: Cirurgião-Dentista

Banca examinadora:

Amanda Ramos Mazzaro

Douglas Victorino Esposito

Data de entrega do trabalho definitivo: 30-11-2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Daniela Cristina das Taboas, que sempre me incentivou a seguir os meus sonhos e me auxilia todos os dias a realizá-los. E que principalmente, nesses 5 anos, vivenciou comigo todos os momentos, sempre me apoiando e me ajudando a superar cada obstáculo que encontrei. Meu exemplo de amor, mulher guerreira e batalhadora.

Ao meu querido avô Euclides das Taboas (in memorian), um exemplo de humildade e cuidado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me ampararem nos momentos difíceis e por sempre guiar meus passos.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar.

À Doutoranda Larissa Lopes Rodrigues, minha co-orientadora, pela infinita paciência, compreensão, apoio, por todo conhecimento compartilhado durante 3 anos de trabalho e, principalmente, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, meu orientador, pela oportunidade concedida, apoio, e por todo conhecimento compartilhado durante 3 anos de orientação, um exemplo de profissional.

À minha mãe, minha avó Vilma e minha irmã, pela motivação, apoio, compreensão e paciência. Além do carinho, não mediram esforços para a realização dos meus sonhos.

Ao meu namorado Vinicius, pelo apoio, compreensão, amor, e sobretudo, por sempre ouvir minhas reclamações e dificuldades e com toda sua paciência, me apoiar e me ajudar a superá-las.

À todas as amigas construídas durante a graduação e a todos os amigos que estiveram ao meu lado nos últimos anos. Guardo todos os momentos em meu coração.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)/CNPq, pela concessão da bolsa de iniciação científica durante a graduação.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CM: Meio condicionado

DG: Gradiente de Densidade

DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

EV: Vesícula Extracelular

EV-TRACK: Relatórios Transparentes e Centralização do Conhecimento de EV

FA: Rotor de Ângulo Fixo

FBS: Soro Fetal Bovino

hMSC: Células Estromais Mesenquimais Humanas

hMSC-EVs: Vesículas Extracelulares de Células Estromais Mesenquimais Humanas

ISEV: Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares

MISEV: Informações Mínimas para Estudos de EVs

MSC: Células Estromais Mesenquimais

M199: Meio 199

PBS: Salina Tamponada com Fosfato

PEG: Polietilenoglicóis

RPMI: Meio Instituto Memorial Parque Roswell 1640

SBI: Biociências do Sistema

SEC: Cromatografia de Exclusão de Tamanho

SW: Rotor da Caçamba Oscilante

TFF: Filtração de Fluxo Tangencial

UC: Ultracentrifugação

UF: Ultrafiltração

RESUMO

Recentemente, há evidências crescentes de que vesículas extracelulares de células estromais mesenquimais humanas (hMSC-EVs) podem ser usadas para aplicações terapêuticas. O uso das hMSC-EVs parece ter menor imunogenicidade, mas efeitos semelhantes para a terapia como suas células parentais em alguns modelos animais. A pesquisa sobre hMSC-EVs ainda enfrenta alguns desafios sobre como alcançar o isolamento altamente eficiente delas. Embora as diretrizes tenham sido estabelecidas pelas sociedades internacionais que estudam a biologia das vesículas extracelulares, muitos protocolos diferentes para isolar hMSC-EVs são relatados na literatura. Portanto, essa revisão teve como objetivo resumir e discutir os protocolos de isolamento de hMSC-EVs utilizados nos últimos anos. A busca foi realizada na base de dados PubMed para recuperar os artigos publicados entre 2015 e 2021. Foram selecionados 1037 artigos, separados de acordo com o protocolo de isolamento de EVs. A ultracentrifugação (UC) foi o mais frequente nos últimos anos para o isolamento de hMSCs-EVs. Um total de 519 artigos, que utilizaram UC, foram incluídos para análise dos dados. Embora muitas variações tenham sido identificadas no protocolo de UC entre os artigos, a maioria dos estudos conseguiu isolar EVs e realizar uma caracterização completa delas. No entanto, faltam informações nos artigos que permitam comparar o rendimento de EVs obtido nos estudos. Este estudo fornece uma revisão das etapas críticas para o isolamento de hMSC-EVs usando UC.

Palavras-chave: Exossomos. Vesículas extracelulares. Células mesenquimais estromais. Ultracentrifugação.

ABSTRACT

Recently, has been growing evidence that extracellular vesicles from human mesenchymal stromal cells (hMSC-EVs) can be used for therapeutic applications. The use of the hMSC-EVs appears to have lower immunogenicity but similar effects for therapy as their parental cells in some animal models. Research on hMSC-EVs still faces some challenges on how to achieve highly efficient isolation of them. Although guidelines have been established for international societies that study extracellular vesicles biology, many different protocols for isolating hMSC-EVs are reported in the literature. As a result, the purpose of this review was to summarize and discuss the hMSC-EV isolation protocols that have been used in recent years.. The search was conducted in the PubMed database to retrieve the articles published between 2015 and 2021. A total of 1037 articles were selected, and they were separated according to the EVs isolation protocol. The ultracentrifugation (UC) was the most frequent over the last 7 years for the isolation of hMSCs-EVs. A total of 519 articles, that used UC, were included for data analysis. Although a lot of variations were identified in the UC protocol among the papers, most studies were able to isolate EVs and perform a complete characterization of them. Nonetheless, there is a lack of information in the papers which could allow a comparison of the yield of EVs obtained in the studies. This study provides a review of critical steps for hMSC-EVs isolation using UC.

Keywords: Exosomes. Extracellular Vesicles. Mesenchymal Stem Cells. Ultracentrifugation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Metodologia	15
3.1. 1 Estratégia de busca e seleção de artigos	15
3.1.2 Extração de dados	15
3.2 Resultados	17
3.2.1 Levantamento dos parâmetros encontrados	17
3.2.2 Cultura e condições de coleta	20
3.2.3 Protocolo de ultracentrifugação	21
3.2.4 Coleta e armazenamento final da amostra	24
3.2.5 Taxa de recuperação de amostras de vesículas extracelulares	26
4 DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	43
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	43
Anexo 2 – Iniciação Científica	44

1 INTRODUÇÃO

O estudo e a aplicação de células estromais mesenquimais (MSCs) multipotentes para o tratamento de lesões e doenças humanas já tem quase 40 anos, e está em contínua evolução (Caplan et al., 2019). Evidências crescentes e convincentes sugerem que as MSCs exercem muitos, se não a maioria, de seus efeitos parácrinos através da liberação de vesículas extracelulares (EVs). Vesículas de aproximadamente 50 a 1.000 nanômetros de diâmetro que são secretadas por todos os tipos de células (Witwer et al., 2019).

As EVs podem ser classificados em três subgrupos principais: (a) microvesículas/micropartículas/ectossomos que são produzidos por brotamento externo e fissão da membrana plasmática; (b) exossomos que são formados dentro da rede endossomal e liberados após a fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática; e (c) corpos apoptóticos, liberados como bolhas de células em apoptose (Shang et al., 2017).

A Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) caracteriza "vesícula extracelular" como o termo genérico para partículas liberadas naturalmente da célula, que são delimitadas por uma bicamada lipídica e não podem se replicar, ou seja, não contêm um núcleo funcional (Théry et al., 2018).

O termo "sEVs" foi descrito como o melhor descritor para a população alvo de MSC-EVs terapêuticos (Witwer et al., 2019). Os sEVs parecem mediar efeitos terapêuticos em uma variedade de doenças diferentes (Lener et al., 2015). sEVs preparados a partir de culturas *in vitro* de MSC são extensivamente descritos para mostrar atividades terapêuticas que recapitulam as de MSCs em vários ensaios funcionais *in vitro* e modelos de doenças pré-clínicas relacionadas (Witwer et al., 2019). Vários estudos pré-clínicos compararam os efeitos benéficos da terapia celular baseada em MSCs e terapia livre de células baseada em sEVs e mostraram que eles tiveram resultados terapêuticos semelhantes (Janockova et al., 2021).

sEVs estão sendo projetados como uma ferramenta inovadora para terapia sem células, já que o transplante de sEVs mostra-se mais seguro em comparação ao uso de células, uma vez que não são capazes de duplicar e sofrer mutações (Janockova et al., 2021; Panda et al., 2021; Ma et al., 2020).

A cultura de células é um passo inicial de alguns protocolos de separação/isolamento de hMSC-EVs. Nesta etapa, muitos fatores estão envolvidos: plaqueamento das células, meio de cultura, tempo de cultivo, entre outros. Na maioria dos protocolos, as células são primeiramente cultivadas em um meio de cultura condicionado por um determinado tempo para liberar suas vesículas. O meio com as EVs é então coletado e processado com base no método escolhido.

As EVs são obtidas idealmente a partir de um meio de cultura condicionado por células (CM) na ausência de qualquer tipo de soro para evitar o co-isolamento de EVs exógenos (Théry et al., 2018). No entanto, a depleção sérica pode alterar o comportamento celular e a natureza e composição das EVs liberadas (Théry et al., 2018). Para evitar essas alterações na cultura de células, uma alternativa é expor as células durante o período de liberação de EV a um CM suplementado com soro que foi pré-esgotado de EVs exógenos; ou seja, eliminar as vesículas derivadas do soro antes da suplementação através de uma ultracentrifugação 100.000×g *overnight* (Witwer et al, 2013), sendo importante observar que o soro deve ser diluído 1:4 antes da UC (Théry et al., 2018). UC em cerca de 100.000 g por algumas horas ou sem diluição do soro não eliminará todos os EVs ou RNAs associados a EVs exógenos (Shelke et al, 2014; Wei et al, 2016; Théry et al., 2018). Para essa depleção, também podem ser realizadas centrifugações em velocidades aumentadas por períodos mais curtos; filtração de fluxo tangencial (TFF); ou, outras formas de ultrafiltração (Théry et al., 2018). As MSCs, assim como outras células de mamíferos, são facilmente cultivadas em cultura com meios suplementados com soro fetal bovino (FBS) como fonte de energia (Witwer et al., 2019), este é o soro mais utilizado em cultura de células, e sua depleção pode ser preparada por ultracentrifugação ou comprada comercialmente (Mannerström et al., 2019).

Após um período de cultivo, o CM é coletado e submetido a técnicas que irão separar as EVs do CM. Várias técnicas de separação de EVs estão sendo usadas, assim como novas combinações de métodos estão acessíveis ou em desenvolvimento. Tecnologia de separação baseada em ultracentrifugação, cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), filtração, tecnologia de precipitação e captura de imunoafinidade, são alguns métodos atuais disponíveis para isolamento eficaz. Esses métodos aumentaram cada vez mais seu rendimento e pureza ao longo dos últimos anos, no entanto, um protocolo que possa reunir com sucesso os

benefícios de todas as tecnologias pré-existentes ainda não foi desenvolvido (Panda et al., 2021; Ma et al., 2020; Tang et al., 2021; Malhotra et al., 2021).

O método mais comum usado para se isolar vesículas extracelulares é a ultracentrifugação, também conhecida como padrão ouro para extração e separação de exossomos (Zhang et al., 2020). O método requer um determinado volume de um meio condicionado, que é exposto à movimentos rotatórios. Após a cultura das células, impurezas maiores, incluindo detritos celulares, proteínas grandes e agregados de membrana são removidos sequencialmente usando centrifugação diferencial (Théry et al., 2018). Primeiramente, são realizadas várias centrifugações em baixa velocidade, transferindo o sobrenadante para um novo tubo a cada vez; nesta etapa, as células e detritos são eliminados, em seguida, o sobrenadante é coletado e centrifugado em velocidade média, para peletizar grandes EVs, grandes corpos apoptóticos etc. (Théry et al., 2018). O novo sobrenadante é coletado e centrifugado em alta velocidade para no final coletar um pellet enriquecido em pequenos EVs; o pellet é ressuspensionado em um tampão/meio, e novamente centrifugado (= lavado), e ao final é ressuspensionado em um determinado volume de tampão/meio (Théry et al., 2018). Essas velocidades, tampões/meio e tempo de centrifugação variam entre os protocolos.

Algumas combinações de métodos são usadas para otimizar o desempenho da ultracentrifugação. A centrifugação por gradiente de densidade (DG) é geralmente usada em combinação com a ultracentrifugação para melhorar a pureza do exossomo (Zhang et al., 2020). Neste método, primeiramente, as células são removidas das amostras, em seguida, o sobrenadante isento de células é então adicionado a um gradiente descontínuo de iodixanol ou sacarose, e após é ultracentrifugado por longos períodos para que as partículas sejam separadas de acordo com suas densidades flutuantes (Zhang et al., 2019). Outro método que também é utilizado em conjunto com a UC é a tecnologia de precipitação, que normalmente utiliza polietilenoglicol (PEG) como meio, e os exossomos são coletados sob a condição de centrifugação reduzindo a solubilidade dos exossomos (Zhang et al., 2020).

Os estudos e iniciativas de padronização já existem, como Informações Mínimas para Estudos de EVs (MISEV) (Théry et al., 2018; Witwer et al., 2017; Lötval

et al., 2014) e Relatórios Transparentes e Centralização do Conhecimento de EVs (EV-TRACK) (EV-TRACK Consortium et al., 2017), mas ainda existem algumas discrepâncias entre os protocolos encontrados.

2 PROPOSIÇÃO

Analisar as etapas críticas dos protocolos de ultracentrifugação para o isolamento de vesículas extracelulares originadas de hMSCs presentes na literatura e fazer um levantamento dos parâmetros mais comuns entre eles, e os que mais diferem, a fim de entender a dinâmica dos protocolos e compilar informações relevantes para pesquisadores que estão iniciando neste campo de pesquisa.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Metodologia

3.1.1 Estratégia de busca e seleção de artigos

Com o objetivo de analisar os protocolos de isolamento EVs originados de hMSCs, foi realizado um levantamento dos artigos presentes na literatura da base de dados PubMed. A primeira busca foi realizada no dia 28/04/2021 e a última atualização foi realizada no dia 17/01/2022. O período selecionado foi de janeiro de 2015 a dezembro de 2021, dos artigos encontrados no período selecionado, 3 saíram com publicação para o início de 2022. As palavras-chave utilizadas foram “Exosome”, “Extracellular Vesicles”, “Mesenchymal Stem Cell” e “Mesenchymal Stromal Cell”, e todas as buscas foram limitadas ao inglês. Uma primeira seleção de artigos foi realizada tendo como critério de inclusão artigos com protocolos para separação de EVs provenientes de meio de cultura de hMSCs. Foram excluídos os artigos que não utilizaram os protocolos de separação; que isolaram EVs de outros tipos de células ou MSCs não humanas; revisões de literatura; relatos de casos; errata; comentários pessoais; resumos; cartas para o editor; e artigos em outros idiomas. Os artigos selecionados no primeiro filtro foram separados pelos métodos de isolamento: UC; Filtração por Membrana (Ultrafiltração – UF; Filtração por Fluxo Tangencial - TFF); Precipitação (polietilenoglicóis-PEG); Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC); Kits Comerciais de Isolamento de Exossomos; Gradientes de Densidade (DG); e outros.

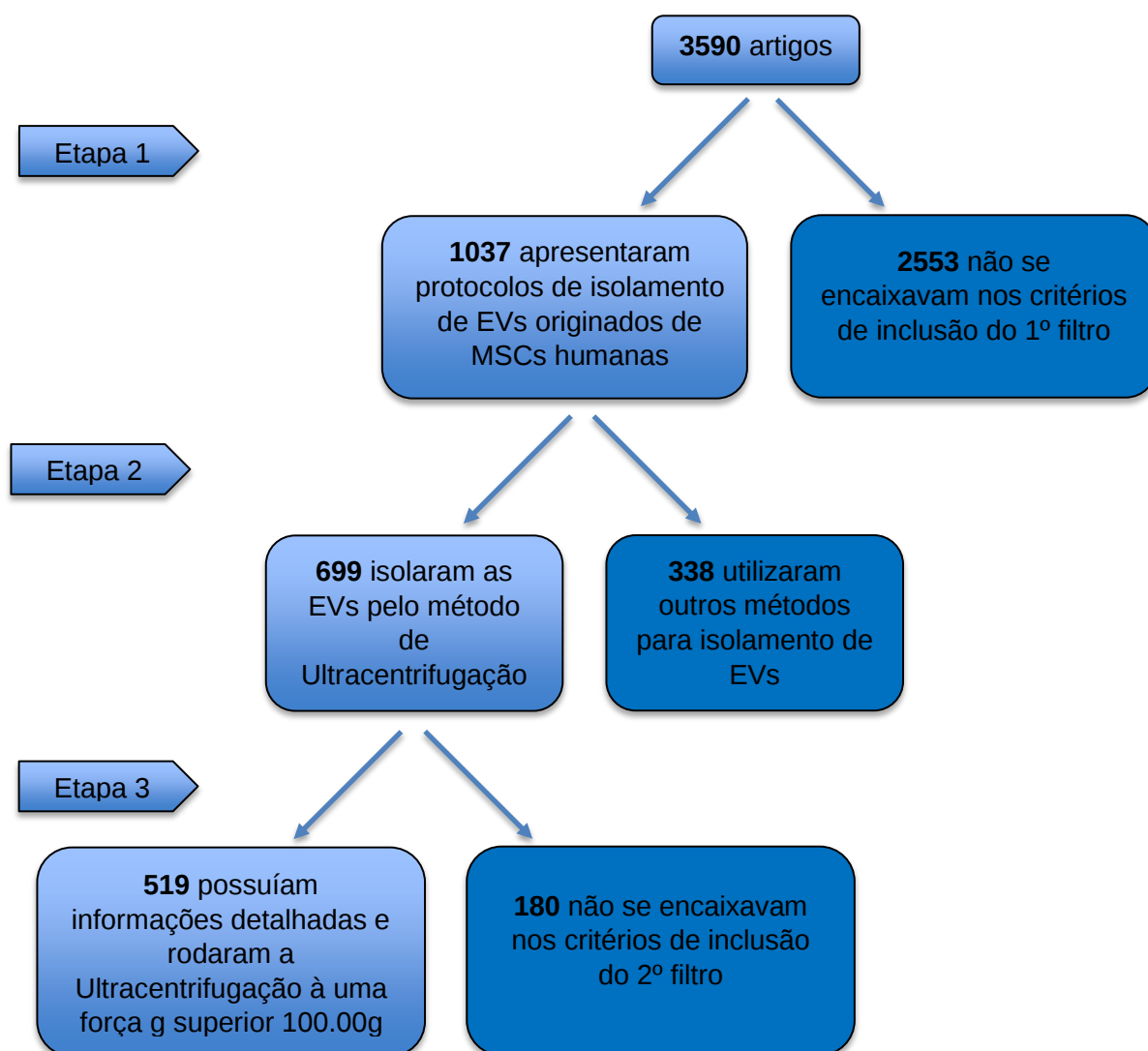
3.1.2 Extração de dados

O método de ultracentrifugação foi escolhido para a coleta de dados, pois este método foi utilizado na maioria dos artigos disponíveis, ou seja, foi a técnica mais utilizada para a separação de vesículas extracelulares de células mesenquimais humanas. Nesta etapa, foram desenvolvidos novos critérios de inclusão e exclusão para posterior filtragem. Foram selecionados artigos que forneceram a maior quantidade de dados sobre o protocolo de separação; artigos que realizaram o isolamento não apenas por UC exclusiva, mas também pela combinação de UC com

outros métodos (DG, PEG, filtração); os critérios de exclusão removeram artigos que não possuíam informações detalhadas do protocolo e artigos que apresentavam rotação inferior a 100.000g ou que fornecessem informações de rotação em unidade de rpm. A filtragem resultou em 519 artigos, dos quais foi realizada a coleta de dados. As informações extraídas de cada estudo foram coletadas por dois pesquisadores e com base nos critérios: PMID; ano de publicação; dados relacionados com a cultura de células (número de células, número da passagem das células, placa, CM, tempo de cultivo em CM, o volume de CM; temperatura de armazenamento do CM); dados relacionados à UC (1 ou 2 rodadas; tempo; força g; tipo de rotor; tipo de tubo; uso de filtro de 0,22 μm , ou outros tipos de filtros); dados relativos à amostra final (tipo e volume final de ressuspensão; temperatura de armazenamento, rendimento médio de vesículas); e, utilização de técnicas adicionais como o uso de gradientes (sacarose ou iodixanol), PEG ou filtração por membrana.

3.2 Resultados

3.2.1 Levantamento dos parâmetros encontrados



Fluxograma 1 - Resumo do delineamento da pesquisa.

A busca abrangeu artigos publicados nos últimos 7 anos. No Fluxograma 1 é possível observar o resumo do delineamento da pesquisa. Após a busca e remoção de artigos duplicados, a revisão iniciou-se com 3.590 artigos, e destes, 1.037 artigos foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão descritos na metodologia, e separados pelos métodos de isolamento de EVs de MSCs de humanos: ultracentrifugação, comercial kits, filtração (UF; TFF), SEC e outros (Figura

1). Foi possível observar o crescimento exponencial do número de publicações entre os 516 artigos que isolaram EVs a partir de ultracentrifugação por ano, no período de 2015 à 2022 (Figura 1A) e a frequência com que os métodos de isolamento foram aplicados entre os 1.037 artigos (Figura 1B). Alguns artigos utilizaram mais de um método de separação.

UC foi o método mais frequentemente aplicado (66,44%), seguido por Kits comerciais (20,34%); Filtração (7,32%) e SEC (3,8%) foram usados com menos frequência para isolar EVs.

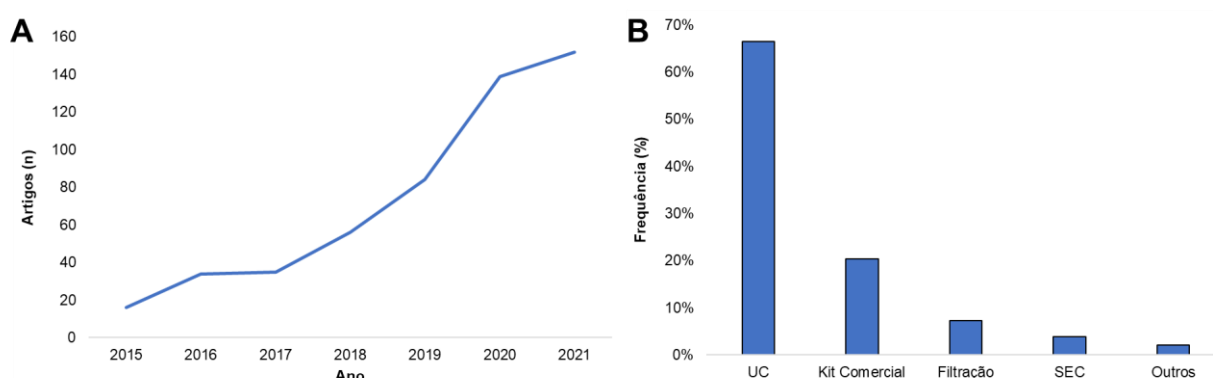


Figura 1 - Métodos de isolamento de EVs de MSCs de humanos. (A) Número de artigos publicados por ano no PubMed que utilizaram a ultracentrifugação para o isolamento de vesículas extracelulares de células mesenquimais humanas. (B) Frequência dos métodos de isolamento utilizados entre 2015 à 2021.

Dos artigos que utilizaram kit comercial (n=214), 47,66% utilizaram kits ExoQuick da System Biosciences (SBI) que são divididos em 3 categorias: ExoQuick Exosome Exosome Precipitation Solution, ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution e ExoQuick- TC Ultra precipitation solution. Os kits comerciais de colunas qEV (Izon Science), Kit Exo-spin™ e outros que utilizam a tecnologia SEC foram listados dentro dos métodos SEC, representados na Figura 1B, devido à baixa frequência. A Tabela 1 resume os kits mais utilizados nos últimos anos.

Tabela 1 - Frequência de uso de kit comercial para isolamento de hMSC-EVs, dividida por nome comercial e marca

Nome Comercial e Marca	Frequência (%)
ExoQuick (System Biosciences)	47,66%
Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen)	24,77%
exoEasy Maxi Kit (Qiagen)	6,07%
Exosome Isolation Reagent (Ribobio)	3,74%
Exocib kit (Cib Biotech Co.)	3,74%
Total exosome isolation kit (Life Technologies)	3,27%
MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (FUJIFIL M Wako)	1,87%
MiRCURY Exosome Isolation Kit (EXIQON)	1,40%
Exosome Isolation Kit (Umibio)	0,93%
Outros	6,54%

Combinações de métodos também foram encontradas dentro dos dados, como: TFF com ultracentrifugação em gradiente de densidade (iodixanol) (Willis et al., 2020; Reis et al., 2021); TFF com SEC (Hogan et al., 2019; Cloer et al., 2021; Haxby et al., 1987); TFF com ultracentrifugação em gradiente de densidade (sacarose) (Bari et al., 2019); SEC com UC (Feng et al., 2020; Ullah et al., 2020; Zhai et al., 2021); PEG com UC (Zhou et al., 2021; Shi et al., 2021; Wang et al., 2022).

A UC foi o método mais recorrente (n = 699 artigos). A partir dos critérios de inclusão e exclusão dos artigos que utilizaram UC relatados na metodologia, a coleta de dados iniciou-se com 519 artigos. Abaixo estão nossos resultados com base em dados coletados de artigos que passaram por UC. A grande maioria dos artigos selecionados (86,63%) utilizou a UC como método único de isolamento de EV. Combinações de métodos também foram usadas para otimizar o desempenho da ultracentrifugação. Encontrou-se combinações de várias técnicas como DG (6,1%), PEG (1,3%) e UF (5,97%). Nos artigos que combinaram DG com UC, 5,2% utilizaram sacarose e 0,9% utilizaram iodixanol.

3.2.2 Cultura e condições de coleta

A Figura 2 ilustra alguns dos dados coletados referentes ao cultivo celular de hMSCs, é possível observar na Figura 2A que entre os 458 artigos que citaram seu meio de cultivo, a maioria dos protocolos cultivou as células em CM livre de soro (Livre de Soro) (48,47%), seguido de protocolos que utilizaram o CM suplementado com FBS Esgotado de EV (34,5%). Outros protocolos realizaram a UC de todo o meio suplementado, não apenas do soro, estes foram denominados Meio Total Esgotado de EVs; e em menor proporção, encontramos outros tipos de suplementos, como Albumina Sérica Bovina (BSA), Lisado de Plaquetas (LP), Soro Fetal de Bezerro (FCS), entre outros.

Em relação ao tempo de cultivo, pode-se observar uma padronização, onde a maioria dos protocolos purificou EVs a partir de um meio condicionado por células por 48 horas (60,27%); outros tempos utilizados com menor frequência foram 24 (17,41%) e 72 horas (12,05%). O volume de CM coletado foi descrito em apenas 32 artigos que possuíam essa informação, entre eles os volumes coletados variaram de 15 a 1000ml.

Em relação a temperatura de armazenamento do CM, foi possível observar que alguns pesquisadores coletaram o meio condicionado por alguns dias, por exemplo, por 2 a 3 dias (Angulski et al., 2017; Shentu et al., 2017; Wan et al., 2020; Chen et al., 2021), e congelaram o CM até que acumulassem volume suficiente para realizar a separação das EVs. Chopra et al., 2019, relataram que o CM foi mantido a 4°C para ser usado dentro de uma semana; ou armazenado a -80 °C para experimentos futuros. Apenas 34 artigos relataram o armazenamento de CM, a maior parte armazenou a -80°C (53%); seguido por -20°C (23,53%) e 4°C (11,8%). Antes do congelamento, alguns realizaram centrifugações sucessivas em baixas velocidades para remover as células e detritos (Angulski et al, 2017; Chopra et al, 2019; Wang et al., 2022; Drommelschmidt et al., 2017; Hingert et al., 2020; Wang et al., 2020).

Outro dado coletado foi relacionado a passagem das células utilizadas para o isolamento de hMSC-EVs, relatada em 149 artigos. Alguns artigos utilizaram células de apenas uma passagem, enquanto outros utilizaram um intervalo, por exemplo, células em passagens de 3 a 5, sendo este intervalo o que apareceu com maior

frequência entre os artigos. A Figura 2B mostra a frequência das passagens das células mais utilizadas entre os artigos, passagens de 0 a 10. Dois artigos não entraram neste cálculo de porcentagem porque utilizaram passagens não muito comuns entre os achados, um utilizou passagem entre 30 a 50 (Wang et al., 2020) e o outro passagem 15 (Kim et al, 2021).

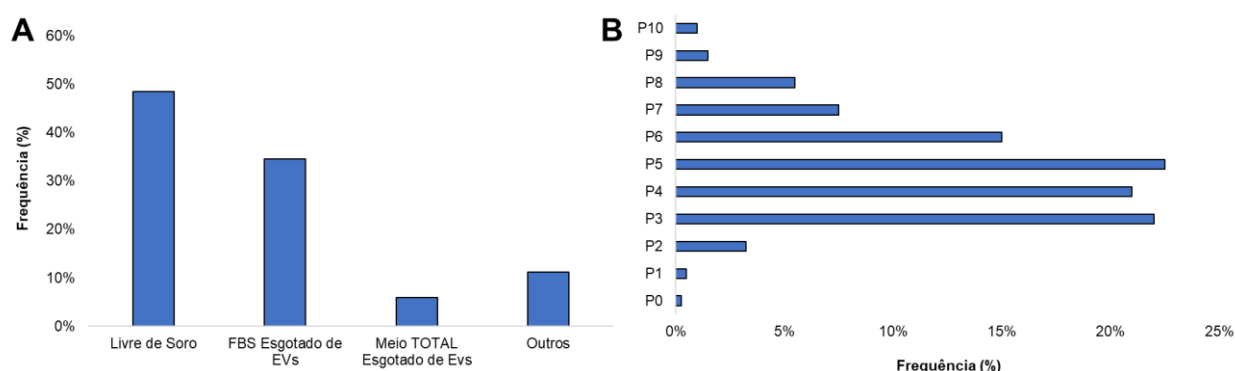


Figura 2 - Cultura de células de hMSC para isolamento de EV. (A) Frequência dos tipos de meios de condicionamento mais utilizados. Livre de Soro, representa o CM que não utilizou nenhum tipo de soro como suplemento. FBS Esgotado de EVs, representa CM suplementado com FBS que foi ultracentrifugado e esgotado de EVs. Meio TOTAL Esgotado de EVs, representa todo o CM suplementado ultracentrifugado. (B) Frequência de passagem das células utilizadas.

Dentre os artigos, 82 deles continham informações sobre a placa utilizada. As placas mais utilizadas apresentavam área de 75 cm², com frequência de ocorrência de 27,17%, seguidas de placas com área de 175 cm² (18,48%); placas com área entre 44 e 60,8 cm² (16,3%); e placas com 145-150 cm² (15,22%). Outras que apareceram com menor frequência foram placas para cultivo de células com área entre 1264-6320 cm² (7,61%); placa de seis poços (7,61%); placas com 25 cm² (4,35%) e 225 cm² (3,26%). Ao analisar o número de células plaqueadas por placa de 75 cm², que foram as mais utilizadas entre os achados, observou-se uma grande variação, de 2,5x10⁵ a 4,0x10⁷ células.

3.2.3 Protocolo de ultracentrifugação

Com base nos dados coletados, existem discrepâncias entre os diferentes protocolos de UC: enquanto alguns parâmetros coincidem entre os diferentes protocolos, outros ainda não possuem consenso. Na Figura 3, é possível observar

alguns dos parâmetros que são utilizados no protocolo de ultracentrifugação que foram coletados. Parâmetros como força g ($n = 517$) em 100.000g (Figura 3A); o tempo de processamento ($n = 517$) entre 60 a 70 minutos (Figura 3B) e o uso do filtro de 0,22 μm antes da UC (73,3% de 221 artigos) são comuns na maioria dos protocolos. No entanto, os rotores utilizados variam muito entre os protocolos dos 164 artigos, assim como a utilização de um filtro de 0,22 μm e a realização de um ou mais estágios de UCs, um para isolamento e outro para eliminação de proteínas contaminantes. Uma porcentagem de 63,44% dos artigos realizou mais de uma etapa de UC.

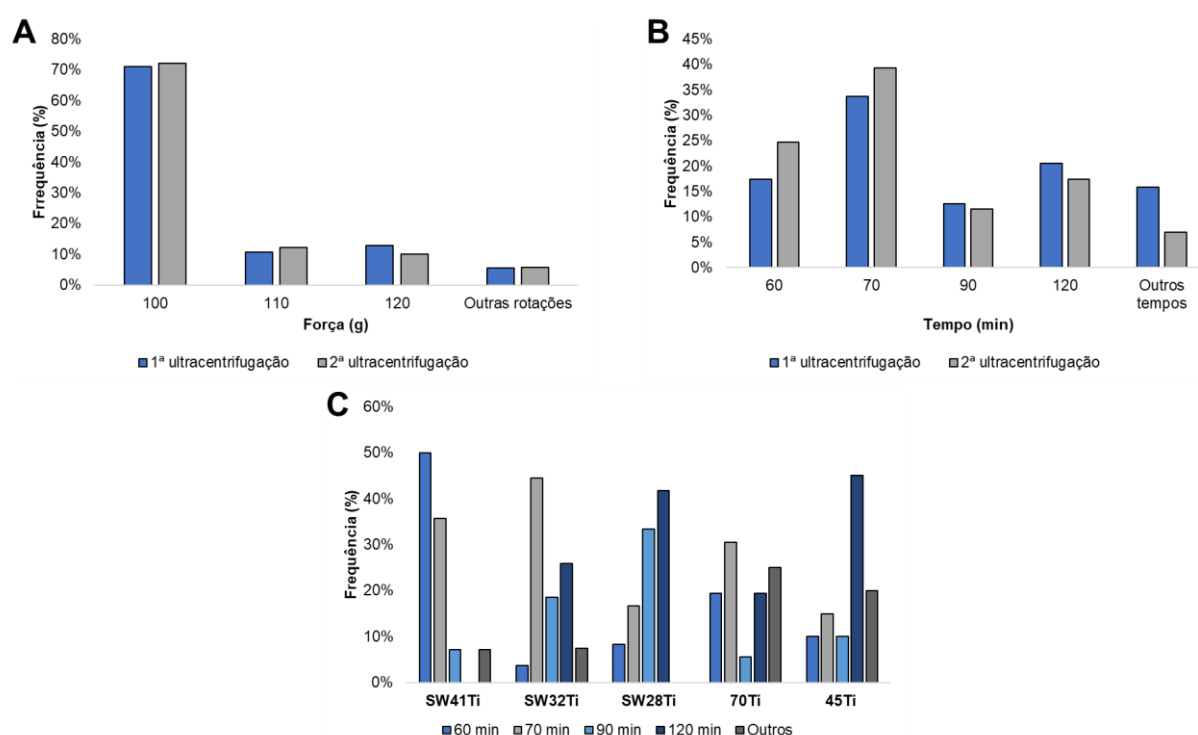


Figura 3 - Parâmetros de rotação utilizados no protocolo de ultracentrifugação. (A) Frequência das forças (g) mais utilizadas (B) e frequência dos tempos mais utilizados para a primeira e segunda ultracentrifugação. (C) Distribuição dos tempos de rotação entre os rotores mais utilizados para isolamento de hMSC-EVs.

O filtro de 0,22 μm foi o de maior recorrência entre os artigos, por isso analisamos sua frequência separadamente dos demais filtros, com 42,77% dos artigos relatando seu uso. Dos que realizaram essa microfiltração, há uma padronização de uso antes da UC (73,3% de 221 artigos); quando realizada após a ultracentrifugação, visa aumentar a pureza da amostra, semelhante a segunda ultracentrifugação

(lavagem), que também é utilizada para purificar os EVs e remover proteínas livres (Konoshenko et al., 2018; Livshits et al., 2015)

Além do filtro de 0,22 μm , alguns protocolos (13,49%) fizeram uso de diferentes filtros, alguns dos quais combinam UC com UF. O sobrenadante é passado através de uma membrana com um determinado peso molecular de corte, variando de 50 a 100 kDa para remover a maioria das proteínas não extracelulares associadas a vesículas. Membranas feitas de polietersulfona são adequadas para altas concentrações de proteínas (Malhotra et al., 2021). O filtro 100 kDa MWCO foi o de maior ocorrência, outros filtros que apareceram com menor frequência entre os dados foram o 3 kDa MWCO, 0,2 μm , 0,1 μm , 0,45 μm , e outros.

Rotor de caçamba basculante (SW) e rotor de ângulo fixo (FA) são dois tipos de rotores que têm sido usados para o isolamento de hMSC-EVs. Em SW, no momento da centrifugação, os basculantes oscilam para fora na posição horizontal, resultando no pellet no fundo do tubo (Momen-Heravi, 2017; Théry et al., 2018). A frequência do FA para separação EV-hMSC foi de 54,43%, enquanto o SW, 45,57% dos 158 artigos que informaram o rotor utilizado. Os mais utilizados foram o Tipo 70 Ti FA (70 Ti) (22,78%); SW 32 Ti (17,09%); Tipo 45 Ti FA (45 Ti) (12,66%); SW 41 Ti (10,13%); SW 28 Ti (7,59%); Tipo 50,2 Ti FA (4,43%); SW 40 Ti (3,16%); T-647,5 FA (2,53%); F37L-8x100 FA (2,53%), e outros (17,09%).

Todos os artigos que continham as informações sobre o rotor de escolha foram rodados em 100.000 g. Foi possível comparar os diferentes tempos de rotação entre esses rotores (Figura 3C). Entre os tempos mais utilizados, 70 minutos foi o mais popular para 70 Ti e SW 32 Ti; 60 minutos para SW 41 Ti; e 120 minutos para 45 Ti. Alguns dos protocolos utilizaram mais de um rotor para o UC, um para a primeira rotação e outro para a segunda. Dentre estes, alguns utilizaram o tipo SW no primeiro, e o ângulo fixo no segundo (Hyland et al., 2020; Lo Sicco et al., 2017; Gorgun et al., 2021); e outros fizeram ambas as rotações em diferentes rotores de ângulo fixo (Haraszti et al., 2018; Xiao et al., 2021; Xu et al., 2021).

3.2.4 Coleta e armazenamento final da amostra

A grande maioria dos protocolos (86,74% de 475 artigos) ressuspendeu as vesículas extracelulares em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Alguns relataram armazenar as EVs em meio de cultura (5,47%); outros em Dimetilsulfóxido (DMSO) (4,42%); e outros em diversos tipos de solução (3,37%). Entre os meios de cultura utilizados estão o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI), Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification (Alpha MEM); e Meio 199 (M199). Outros tipos de ressuspensão utilizados foram solução de Ringer com Lactato, água sem Nuclease, água MilliQ e outros.

O uso de DMSO está sempre associado a alguma diluição; nos dados, foi possível observar percentuais de diluição de 1% (Gallo et al., 2016; Lopatina et al., 2018), 5% (Liu et al., 2016) e 10% (Wen et al., 2016). A maioria realizou a diluição do DMSO em RPMI, outros o diluíram em DMEM, PBS ou M199.

Em relação a temperatura de armazenamento da ressuspensão final de EVs, mostrou-se ser uma etapa bem definida nos protocolos, sendo que 88,23% dos 289 protocolos que continham essa informação mantinham a amostra em temperatura inferior a -70°C . A Tabela 2 contém dados coletados sobre o tempo de armazenamento de EVs em determinadas temperaturas.

Tabela 2 - Tempo de armazenamento de hMSC-EVs.

Autor/Ano	Revista	Temperatura (°C)/ Tipo de ressuspensão	Tempo
Wen et al., 2016.	Leukemia	4 / PBS -80 / PBS + 10% DMSO	1-7 dias 6 meses
Lo Sicco et al., 2018.	Current protocols in stem cell biology	4 / PBS	2 dias
Samaeekia et al., 2018.	Investigative ophthalmology & visual science	4/ PBS	3 dias
Ragni et al., 2019.	Stem cell research & therapy	4 / PBS	2 dias
Torres Crigna et al., 2020.	Cells	-30 / PBS	6 meses
Kong et al., 2021.	Stem cell reviews and reports	4 / PBS -80	2 semanas Períodos mais longos
Kay et al., 2021.	International journal of molecular sciences	4 / PBS -20	1 dia Uso posterior
Born et al., 2022.	Advanced healthcare materials	-20/PBS	1 mês

Outra informação coletada foi em relação ao volume final da ressuspensão final, que irá variar de acordo com a quantidade de CM inicial, o número de células e outras condições de cultivo celular. Foi possível observar que entre os 140 artigos que continham essa informação, a maioria (50,71%) ressuspenderam os sEVs em volumes de 10 a 100 µl, seguidos de 30,71% ressuspenderam em 120 a 225 µl, 9,29% em 400 a 600 µl e 9,29% em 1000 a 2000 µl.

3.2.5 Taxa de recuperação de amostras de vesículas extracelulares

A taxa de recuperação da amostra foi uma das variáveis coletadas que teve a menor ocorrência entre os artigos. Dos poucos que relataram essa informação, 48 apresentaram dados de rendimento médio na forma de partículas por ml (Figura 4A), 12 na forma de partículas por célula (Figura 4B), e outros apresentaram uma proporção de microgramas (μg) por quantidade de células. Através dos gráficos de dispersão (Figura 4) é possível observar a discrepância entre os valores médios de produtividade.

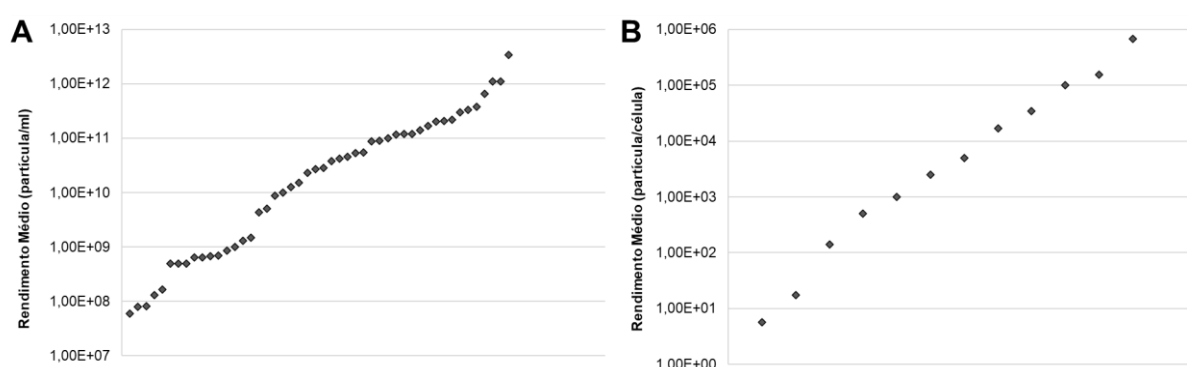


Figura 4 - Rendimento médio de hMSC-EVs. A. Rendimento médio em partículas/ml B. Rendimento médio em partículas/célula.

Dos 48 artigos, 3% tiveram um rendimento médio entre $6\text{-}8 \times 10^7$ partículas/ml; 21% entre $1,3\text{-}8,6 \times 10^8$; 13% entre $1\text{-}8,77 \times 10^9$; 29% entre $1\text{-}9 \times 10^{10}$; 27% entre $1\text{-}6,5 \times 10^{11}$; e 4% entre $1,1\text{-}6,4 \times 10^{12}$. O rendimento de EVs por célula variou ainda mais, sendo o número mínimo de 18 e o máximo de $6,7 \times 10^5$ EVs/célula.

4 DISCUSSÃO

Ainda existem limitações que restringem a evolução no campo da pesquisa de EV, como a falta de um método padrão para separação de EV que implique a diversidade dos resultados experimentais na pesquisa de EV (Dong et al., 2020). Além disso, há também os desafios do uso de hMSC-EVs como agente terapêutico, como o pouco conhecimento sobre a quantidade de EVs necessária para cada tratamento e os altos custos de extração e purificação de EVs (Ma et al., 2020).

Esta revisão foi delimitada em um recorte temporal de 2015-2021, devido ao baixo número de artigos publicados sobre o assunto antes do ano de 2015, e impulsionado pelo interesse em entender os protocolos e tecnologias mais recentes relacionados à separação de hMSC-EVs. Nos últimos sete anos, os EVs têm despertado um interesse científico considerável, como indicado pelo crescimento exponencial do número de publicações por ano. Ocorreu uma ligeira queda na curva de crescimento entre 2020 e 2021, que supostamente pode ter sido consequência da Pandemia do COVID 19.

A UC foi considerada o método de isolamento primário mais utilizado entre os membros do ISEV em 2015 (Gardiner et al., 2016). Nesta revisão que teve como foco a separação de hMSC-EVs, a UC também foi o método mais utilizado. A combinação de técnicas de separação com UC não foi muito frequente nos estudos. Gardner et al., 2016, observaram que os pesquisadores que usavam meios de cultura exclusivamente condicionados eram menos propensos a usar uma combinação de métodos. Stam et al., 2021, analisaram a distribuição entre métodos de isolamento de EV simples e combinados, separados por diferentes materiais de partida; 59% dos artigos que isolaram EVs de sobrenadante de cultura de células combinaram métodos de isolamento de EV. Em nossos dados que o foco estava no sobrenadante de cultura de células de hMSC e UC, 86,63% usaram a ultracentrifugação como método único de isolamento de EV.

A análise dos dados mostrou os kits comerciais como o segundo método de isolamento mais utilizado, sendo o ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution (SBI) o mais utilizado dentre os artigos revisados. Existem diversos kits, de diferentes marcas e diferentes tecnologias, por exemplo, qEV (Izon) é uma coluna SEC; exoEasy

(Qiagen) baseia-se na ligação de afinidade à base de membrana; Os kits ExoQuick (SBI) e Total Exosome Isolation (Invitrogen) contam com precipitação de polímeros, esses dois foram os mais utilizados para o isolamento de sEVs. Embora esses kits sejam menos demorados, mais compatíveis com volumes limitados de biofluidos e não necessitem de equipamentos especiais, sua adequação para aplicações científicas e clínicas é duvidosa devido à qualidade incerta das preparações de EV (Tian et al., 2019).

Sobre os dados relacionados à cultura de células, os protocolos relacionados ao isolamento de hMSC-EVs por meio de UC, em sua maioria, ainda preferem manter as células em meio condicionado sem soro, apesar das desvantagens já relatadas (Théry et al., 2018). FBS com depleção de EV foi o segundo tipo de CM mais utilizado nesta revisão. Embora tenha sido usado com alta frequência, já foi demonstrado que os métodos de depleção de EV com FBS falham em fornecer reduções adequadas em populações de EV derivadas de FBS (Lehrich et al., 2018). Sabe-se que os EVs presentes no soro podem contaminar os EVs derivados de células e podem alterar as leituras a jusante (Chhoy et al., 2021); além disso, proteínas extracelulares e RNA presentes no soro podem ter efeitos biológicos significativos na célula quando co-separados com EVs derivados de células (Chhoy et al., 2021). Mesmo que células específicas possam sobreviver sem soro por alguns dias, essa mudança inevitavelmente induzirá uma resposta ao estresse que pode levar a diferentes assinaturas de EVs (Momen-Heravi, 2017).

Lo Sicco et al., 2018, recomendaram não utilizar MSCs de alta passagem (passagem máxima 3), mas em nossos dados, as passagens mais utilizadas ficaram entre 3 a 6. Outro dado relacionado a cultura de células, foi o tipo de placa utilizado, sabe-se que o tipo dependerá do tipo de experimento a ser realizado e da quantidade de amostra necessária, além de outros fatores relacionados a pesquisa, todavia, trata-se de uma informação relevante para quem está iniciando o delineamento de um experimento.

A maioria dos artigos continha informações sobre a temperatura durante as centrifugações, quase todas foram operadas a 4°C. Cheng et al., 2019, relataram que após a coleta do meio de cultura celular, é necessário manter as amostras no gelo o tempo todo para evitar a degradação do EV.

A UC está entre os métodos de isolamento que recuperam a maior quantidade de material extracelular (Janockova et al., 2021), no entanto, ainda há inconsistência com a taxa de recuperação de amostras de exossomos entre os protocolos desta revisão. Quando a centrifugação diferencial foi analisada teoricamente, todos os critérios de desempenho, como o rendimento e a pureza da população-alvo de vesículas e a duração necessária das centrifugações, foram sensivelmente dependentes do tipo dos rotores ("balde oscilante" ou "ângulo fixo") e seus parâmetros específicos (raio de rotação, comprimento do caminho de sedimentação) (Livshits et al., 2015).

Os dados mostraram que pouco mais da metade dos artigos utilizaram o rotor FA. A característica mais importante do isolamento de EVs é a formação de pellets ao final da ultracentrifugação, isso influenciará as etapas subsequentes. O rotor SW é menos eficiente na peletização em comparação ao FA (Momen-Heravi, 2017). O FA tem alta eficiência para peletização, sedimenta EVs contra a parede do tubo da centrífuga e gradualmente força esse material pela parede até o fundo do tubo, o que pode levar à agregação (Momen-Heravi, 2017).

O fator k representa a eficiência relativa de peletização de um determinado rotor de centrífuga na velocidade máxima de rotação; pode ser determinado a partir do tipo de rotor, tubo/adaptador e velocidade da centrífuga; para execuções com velocidade de rotação inferior à velocidade máxima do rotor, o fator k deve ser ajustado (Théry et al., 2018). Sabe-se que a aplicação de uma força g específica ou velocidade de rotação por si só não prediz a capacidade de peletização de exossomos e que tempos de centrifugação prolongados podem obter maiores rendimentos de RNA e proteína exossomal, enquanto tempos de centrifugação muito longos resultam em concentrações excessivas de proteína no grânulo de exossoma (Cvjetkovic et al., 2014).

Em 2006, Théry et al. estabeleceram um protocolo em que os exossomos eram sedimentados por ultracentrifugação a 100.000g por 70 min; em nossos achados, estes representaram os mais utilizados, tanto na primeira quanto nas rodadas seguintes.

O uso de diferentes filtros entre as centrifugações foi notado entre os protocolos. É possível substituir várias centrifugações de baixa, média e alta velocidade, com uma etapa de filtração em série; filtros de 0,8 μm , 0,4 μm e 0,22 μm . Alguns protocolos realizam essa microfiltração, outros não. Dos que realizam, há uma padronização de utilizá-lo antes da UC, e a maioria dos protocolos fazem uso do filtro de 0,22 μm . Essa etapa única de filtração tem como objetivo diminuir a subpopulação, eliminando células mortas e grandes detritos, deixando pequenas vesículas para a ultracentrifugação. (Momen-Heravi F, 2017; Théry et al. 2018).

O tipo de ressuspensão final para armazenar as EVs após o isolamento, foi uma das informações que não houve muita divergência entre os protocolos, a grande maioria ressuspendeu as vesículas extracelulares em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Apesar do uso de DMSO para armazenar as EVs após o isolamento ter sido muito reduzido nos achados, algumas informações foram encontradas, e podem ser úteis quando se pretende armazenar essas amostras por um período maior. Em 2016, Wen et al., observaram a atividade biológica de vesículas recém-isoladas, e daquelas armazenadas em 10% de DMSO, os efeitos funcionais dos EVs *in vitro* foram mantidos por até 6 meses quando armazenados em 10% de DMSO a -80°C . Em 2016, Gallo et al., observaram os efeitos de 1% de DMSO, e não encontraram diferença na atividade biológica entre amostras frescas e armazenadas de EVs, e recomenda após descongelar as amostras, antes dos experimentos, realizar uma ultracentrifugação a 100.000g para remover o DMSO.

Sobre a temperatura de armazenamento da ressuspensão final, em 2016, Lee et al., demonstraram que o armazenamento de pellet contendo EVs em temperaturas abaixo de -70°C é favorável para a preservação de exossomos frescos para aplicação clínica e pesquisa básica; e que temperaturas abaixo de -20°C mantêm a integridade e a qualidade da membrana EV. No entanto, recomenda-se evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento para evitar a degradação da amostra (Chhoy et al., 2021).

Em 2021, Snyder et al. relataram que a análise precisa e repetível de EVs apresenta inúmeros desafios em toda a pesquisa. Mesmo com as diretrizes criadas pelo ISEV (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018) e mesmo com o desenvolvimento da base de conhecimento de crowdsourcing EV-TRACK (EV-TRACK Consortium et

al., 2017) para permitir relatórios mais transparentes da biologia dos EVs e da metodologia utilizada para os resultados publicados; o campo continua a sofrer com a replicação e confirmação dos resultados publicados (Snyder et al., 2021).

Informações como rendimento médio de partículas, quantidade de células plaqueadas e quantidade de CM coletada eram dados muito raros, mas são de grande valia para quem está iniciando nesta linha de pesquisa. Das poucas que continham essa informação, procuramos correlacioná-la com o volume final de ressuspensão. Alguns artigos ressuspenderam o pellet final de hMSC-EVs de acordo com a contagem final de células de MSCs, por exemplo, 10 μ L por 1×10^6 células (Liu et al., 2016; Zulueta et al., 2018; Hao et al., 2019); 200 μ L por 2×10^7 células produtoras (Torres Crigna et al., 2020); outros de acordo com a quantidade de CM ou por placa de cultura, por exemplo, 100 μ L para cada 10 ml de CM (Kink et al., 2019); 10 μ L por placa T175 (Kumar et al., 2019; Clark et al., 2019).

Uma das principais limitações da Análise de Rastreamento de Nanopartículas é a recomendação de concentrações de amostra entre 10^7 e 10^9 partículas/mL, sendo considerado uma faixa estreita de concentração de partículas que pode ser avaliada em comparação com outros métodos, por exemplo, espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Snyder et al., 2021). Amostras com concentração acima do recomendado devem ser diluídas para análise. Dos poucos artigos que continham essa informação, a maioria, 56% apresentaram resultado de concentração final na faixa de 10^{10} a 10^{11} partículas/ml.

5 CONCLUSÃO

A ultracentrifugação foi o método mais utilizado para isolar vesículas extracelulares de células mesenquimais do estroma humano entre os anos de 2015 a 2021. Embora existam estudos e iniciativas de padronização como o MISEV e o EV-TRACK, ainda é possível encontrar diferenças entre os protocolos aplicados em diferentes estudos. No entanto, foi possível observar que avanços na padronização estão sendo alcançados. O desenvolvimento de um método padrão aumenta a eficiência da separação EV, que pode ser mais aplicada em estudos científicos e clínicos; e no futuro para uma aplicação clínica, como terapia alternativa à terapia celular.

REFERÊNCIAS^{1*}

1. Angulski AB, Capriglione LG, Batista M, Marcon BH, Senegaglia AC, Stimamiglio MA, et al. The Protein Content of Extracellular Vesicles Derived from Expanded Human Umbilical Cord Blood-Derived CD133+ and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Partially Explains Why both Sources are Advantageous for Regenerative Medicine. *Stem cell reviews and reports*. 2017;13(2):244-57. doi: 10.1007/s12015-016-9715-z.
2. Bari E, Ferrarotti I, Di Silvestre D, Grisoli P, Barzon V, Balderacchi A, et al. Adipose Mesenchymal Extracellular Vesicles as Alpha-1-Antitrypsin Physiological Delivery Systems for Lung Regeneration. *Cells*. 2019 Aug 23;8(9):965. doi: 10.3390/cells8090965.
3. Born LJ, Chang KH, Shoureshi P, Lay F, Bengali S, Hsu ATW, et al. HOTAIR-Loaded Mesenchymal Stem/Stromal Cell Extracellular Vesicles Enhance Angiogenesis and Wound Healing. *Adv Healthc Mater*. 2022 Mar;11(5):e2002070. doi: 10.1002/adhm.202002070.
4. Caplan H, Olson SD, Kumar A, George M, Prabhakara KS, Wenzel P, et al. Mesenchymal Stromal Cell Therapeutic Delivery: Translational Challenges to Clinical Application. *Front Immunol*. 2019 Jul 31;10:1645. doi: 10.3389/fimmu.2019.01645.
5. Chen X, Wang S, Cui Z, Gu Y. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles containing miR-497-5p inhibit RSPO2 and accelerate OPLL. *Life Sci*. 2021 Aug 15;279:119481. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119481.
6. Cheng Y, Zeng Q, Han Q, Xia W. Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes. *Protein Cell*. 2019 Apr;10(4):295-299. doi: 10.1007/s13238-018-0529-4.
7. Chhoy P, Brown CW, Amante JJ, Mercurio AM. Protocol for the separation of extracellular vesicles by ultracentrifugation from *in vitro* cell culture models. *STAR Protoc*. 2021 Jan 29;2(1):100303. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100303.
8. Chopra N, Dutt Arya B, Jain N, Yadav P, Wajid S, Singh SP, et al. Biophysical Characterization and Drug Delivery Potential of Exosomes from Human

^{1*} De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells. *ACS Omega*. 2019 Aug 9;4(8):13143-13152. doi: 10.1021/acsomega.9b01180.
9. Clark K, Zhang S, Barthe S, Kumar P, Pivetti C, Kreutzberg N, et al. Placental Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Myelin Regeneration in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *Cells*. 2019 Nov 23;8(12):1497. doi: 10.3390/cells8121497.
 10. Cloer C, Roudsari L, Rochelle L, Petrie T, Welch M, Charest J, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles reduce lung inflammation and damage in nonclinical acute lung injury: Implications for COVID-19. *PLoS One*. 2021 Nov 15;16(11):e0259732. doi: 10.1371/journal.pone.0259732.
 11. Cvjetkovic A, Lötval J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014 Mar 25;3. doi: 10.3402/jev.v3.23111.
 12. Dong L, Zieren RC, Horie K, Kim CJ, Mallick E, Jing Y, et al. Comprehensive evaluation of methods for small extracellular vesicles separation from human plasma, urine and cell culture medium. *J Extracell Vesicles*. 2020 Dec;10(2):e12044. doi: 10.1002/jev2.12044.
 13. Drommelschmidt K, Serdar M, Bendix I, Herz J, Bertling F, Prager S, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate inflammation-induced preterm brain injury. *Brain Behav Immun*. 2017 Feb;60:220-232. doi: 10.1016/j.bbi.2016.11.011.

14. EV-TRACK Consortium, Van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, Akay Ö, Anand S, et al. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods*. 2017 Feb 28;14(3):228-232. doi: 10.1038/nmeth.4185.
15. Feng R, Ullah M, Chen K, Ali Q, Lin Y, Sun Z. Stem cell-derived extracellular vesicles mitigate ageing-associated arterial stiffness and hypertension. *J Extracell Vesicles*. 2020 Jun 24;9(1):1783869. doi: 10.1080/20013078.2020.1783869.
16. Gallo S, Gili M, Lombardo G, Rossetti A, Rosso A, Dentelli P, et al. Stem Cell-Derived, microRNA-Carrying Extracellular Vesicles: A Novel Approach to Interfering with Mesangial Cell Collagen Production in a Hyperglycaemic Setting. *PLoS One*. 2016 Sep 9;11(9):e0162417. doi: 10.1371/journal.pone.0162417.
17. Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, Théry C, Witwer KW, Wauben M, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*. 2016 Oct 31;5:32945. doi: 10.3402/jev.v5.32945.
18. Gorgun C, Palamà MEF, Reverberi D, Gagliani MC, Cortese K, Tasso R, et al. Role of extracellular vesicles from adipose tissue- and bone marrow-mesenchymal stromal cells in endothelial proliferation and chondrogenesis. *Stem Cells Transl Med*. 2021 Dec;10(12):1680-1695. doi: 10.1002/sctm.21-0107.
19. Hao Q, Gudapati V, Monsel A, Park JH, Hu S, Kato H, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Decrease Lung Injury in Mice. *J Immunol*. 2019 Oct 1;203(7):1961-1972. doi: 10.4049/jimmunol.1801534.
20. Haraszti RA, Miller R, Stoppato M, Sere YY, Coles A, Didiot MC, et al. Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher

- Yield and Improved Activity. *Mol Ther*. 2018 Dec 5;26(12):2838-2847. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.09.015.
21. Haxby JV, Grady CL, Friedland RP, Rapoport SI. Neocortical metabolic abnormalities precede nonmemory cognitive impairments in early dementia of the Alzheimer type: longitudinal confirmation. *J Neural Transm Suppl*. 1987;24:49-53.
 22. Hingert D, Ekström K, Aldridge J, Crescitelli R, Brisby H. Extracellular vesicles from human mesenchymal stem cells expedite chondrogenesis in 3D human degenerative disc cell cultures. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Jul 29;11(1):323. doi: 10.1186/s13287-020-01832-2.
 23. Hogan SE, Rodriguez Salazar MP, Cheadle J, Glenn R, Medrano C, Petersen TH, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes improve mitochondrial health in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019 May 1;316(5):L723-L737. doi: 10.1152/ajplung.00058.2018.
 24. Hyland M, Mennan C, Wilson E, Clayton A, Kehoe O. Pro-Inflammatory Priming of Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Alters the Protein Cargo of Their Extracellular Vesicles. *Cells*. 2020 Mar 16;9(3):726. doi: 10.3390/cells9030726.
 25. Janockova J, Slovinska L, Harvanova D, Spakova T, Rosocha J. New therapeutic approaches of mesenchymal stem cells-derived exosomes. *J Biomed Sci*. 2021 May 25;28(1):39. doi: 10.1186/s12929-021-00736-4.
 26. Kay AG, Treadwell K, Roach P, Morgan R, Lodge R, Hyland M, et al. Therapeutic Effects of Hypoxic and Pro-Inflammatory Priming of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Inflammatory Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 23;23(1):126. doi: 10.3390/ijms23010126.
 27. Kim H, Zhao Q, Barreda H, Kaur G, Hai B, Choi JM, et al. Identification of Molecules Responsible for Therapeutic Effects of Extracellular Vesicles Produced from iPSC-Derived MSCs on Sjögren's Syndrome. *Aging Dis*. 2021 Sep 1;12(6):1409-1422. doi: 10.14336/AD.2021.0621.
 28. Kink JA, Forsberg MH, Reshetylo S, Besharat S, Childs CJ, Pederson JD, et al. Macrophages Educated with Exosomes from Primed Mesenchymal Stem Cells Treat Acute Radiation Syndrome by Promoting Hematopoietic Recovery. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019 Nov;25(11):2124-2133. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.07.026.

29. Kong F, Wu CT, Geng P, Liu C, Xiao F, Wang LS, et al. Dental Pulp Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Mitigate Haematopoietic Damage after Radiation. *Stem Cell Rev Rep*. 2021 Apr;17(2):318-331. doi: 10.1007/s12015-020-10020-x.
30. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int*. 2018 Jan 30;2018:8545347. doi: 10.1155/2018/8545347.
31. Kumar P, Becker JC, Gao K, Carney RP, Lankford L, Keller BA, et al. Neuroprotective effect of placenta-derived mesenchymal stromal cells: role of exosomes. *FASEB J*. 2019 May;33(5):5836-5849. doi: 10.1096/fj.201800972R.
32. Lee M, Ban JJ, Im W, Kim M. Influence of storage condition on exosome recovery. *Biotechnol Biopr Eng*. 2016 May 22;21:299-304. doi: 10.1007/s12257-015-0781-x.
33. Lehrich BM, Liang Y, Khosravi P, Federoff HJ, Fiandaca MS. Fetal Bovine Serum-Derived Extracellular Vesicles Persist within Vesicle-Depleted Culture Media. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 9;19(11):3538. doi: 10.3390/ijms19113538.
34. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. 2015 Dec 31;4:30087. doi: 10.3402/jev.v4.30087.
35. Liu J, Kuwabara A, Kamio Y, Hu S, Park J, Hashimoto T, et al. Human Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Prevent the Rupture of Intracranial Aneurysm in Part by Suppression of Mast Cell Activation via a PGE2-Dependent Mechanism. *Stem Cells*. 2016 Dec;34(12):2943-2955. doi: 10.1002/stem.2448.
36. Liu R, Shen H, Ma J, Sun L, Wei M. Extracellular Vesicles Derived from Adipose Mesenchymal Stem Cells Regulate the Phenotype of Smooth Muscle Cells to Limit Intimal Hyperplasia. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2016 Apr;30(2):111-8. doi: 10.1007/s10557-015-6630-5.
37. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep*. 2015 Nov 30;5:17319. doi: 10.1038/srep17319.
38. Lopatina T, Favaro E, Grange C, Cedrino M, Raghino A, Occhipinti S, et al. PDGF enhances the protective effect of adipose stem cell-derived extracellular

- vesicles in a model of acute hindlimb ischemia. *Sci Rep*. 2018 Dec 4;8(1):17458. doi: 10.1038/s41598-018-36143-3.
39. Lo Sicco C, Reverberi D, Balbi C, Ulivi V, Principi E, Pascucci L, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Mar;6(3):1018-1028. doi: 10.1002/sctm.16-0363.
 40. Lo Sicco C, Reverberi D, Pascucci L, Tasso R. A Method for Isolating and Characterizing Mesenchymal Stromal Cell-derived Extracellular Vesicles. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2018 Aug;46(1):e55. doi: 10.1002/cpsc.55.
 41. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014 Dec 22;3:26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913.
 42. Ma ZJ, Yang JJ, Lu YB, Liu ZY, Wang XX. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2020 Aug 26;12(8):814-840. doi: 10.4252/wjsc.v12.i8.814.
 43. Malhotra S, Amin ZM, Dobhal G, Cottam S, Nann T, Goreham RV. Novel devices for isolation and detection of bacterial and mammalian extracellular vesicles. *Mikrochim Acta*. 2021 Mar 26;188(4):139. doi: 10.1007/s00604-021-04790-5
 44. Mannerström B, Paananen RO, Abu-Shahba AG, Moilanen J, Seppänen-Kaijansinkko R, Kaur S. Extracellular small non-coding RNA contaminants in fetal bovine serum and serum-free media. *Sci Rep*. 2019 Apr 2;9(1):5538. doi: 10.1038/s41598-019-41772-3.
 45. Momen-Heravi F. Isolation of Extracellular Vesicles by Ultracentrifugation. *Methods Mol Biol*. 2017;1660:25-32. doi: 10.1007/978-1-4939-7253-1_3.
 46. Panda B, Sharma Y, Gupta S, Mohanty S. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as an Emerging Paradigm for Regenerative Therapy and Nano-Medicine: A Comprehensive Review. *Life (Basel)*. 2021 Aug 3;11(8):784. doi: 10.3390/life11080784.
 47. Ragni E, Perucca Orfei C, De Luca P, Lugano G, Viganò M, Colombini A, et al. Interaction with hyaluronan matrix and miRNA cargo as contributors for in vitro potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of human osteoarthritic synoviocytes. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Mar 29;10(1):109. doi: 10.1186/s13287-019-1215-z.

48. Reis M, Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Yeung V, Taglauer E, Magaletta M, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Restore Thymic Architecture and T Cell Function Disrupted by Neonatal Hyperoxia. *Front Immunol.* 2021 Apr 15;12:640595. doi: 10.3389/fimmu.2021.640595.
49. Samaeekia R, Rabiee B, Putra I, Shen X, Park YJ, Hematti P, et al. Effect of Human Corneal Mesenchymal Stromal Cell-derived Exosomes on Corneal Epithelial Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 Oct 1;59(12):5194-5200. doi: 10.1167/iovs.18-24803.
50. Shang M, Ji JS, Song C, Gao BJ, Jin JG, Kuo WP, et al. Extracellular Vesicles: A Brief Overview and Its Role in Precision Medicine. *Methods Mol Biol.* 2017;1660:1-14. doi: 10.1007/978-1-4939-7253-1_1.
51. Shelke GV, Lässer C, Gho YS, Lötvall J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles.* 2014 Sep 30;3. doi: 10.3402/jev.v3.24783.
52. Shentu TP, Huang TS, Cernelc-Kohan M, Chan J, Wong SS, Espinoza CR, et al. Thy-1 dependent uptake of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles blocks myofibroblastic differentiation. *Sci Rep.* 2017 Dec 22;7(1):18052. doi: 10.1038/s41598-017-18288-9.
53. Shi MM, Yang QY, Monsel A, Yan JY, Dai CX, Zhao JY, et al. Preclinical efficacy and clinical safety of clinical-grade nebulized allogenic adipose mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2021 Aug;10(10):e12134. doi: 10.1002/jev2.12134.
54. Snyder OL, Campbell AW, Christenson LK, Weiss ML. Improving Reproducibility to Meet Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 Guidelines in Nanoparticle Tracking Analysis. *J Vis Exp.* 2021 Nov 17;(177). doi: 10.3791/63059.
55. Stam J, Bartel S, Bischoff R, Wolters JC. Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2021 Apr 15;1169:122604. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122604.
56. Tang Y, Zhou Y, Li HJ. Advances in mesenchymal stem cell exosomes: a review. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Jan 19;12(1):71. doi: 10.1186/s13287-021-02138-7.

57. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006 Apr;Chapter 3:Unit 3.22. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
58. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018 Nov 23;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
59. Tian Y, Gong M, Hu Y, Liu H, Zhang W, Zhang M, et al. Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry. *J Extracell Vesicles.* 2019 Nov 29;9(1):1697028. doi: 10.1080/20013078.2019.1697028.
60. Torres Crigna A, Uhlig S, Elvers-Hornung S, Klüter H, Bieback K. Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Suppress Human, but Not Murine Lymphocyte Proliferation, via Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity. *Cells.* 2020 Nov 5;9(11):2419. doi: 10.3390/cells9112419.
61. Ullah M, Liu DD, Rai S, Razavi M, Concepcion W, Thakor AS. Pulsed focused ultrasound enhances the therapeutic effect of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in acute kidney injury. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Sep 14;11(1):398. doi: 10.1186/s13287-020-01922-1.
62. Wan X, Chen S, Fang Y, Zuo W, Cui J, Xie S. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles suppress the fibroblast proliferation by downregulating FZD6 expression in fibroblasts via miRNA-29b-3p in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Cell Physiol.* 2020 Nov;235(11):8613-8625. doi: 10.1002/jcp.29706.
63. Wang C, Börger V, Mohamud Yusuf A, Tertel T, Stambouli O, Murke F, et al. Postischemic Neuroprotection Associated With Anti-Inflammatory Effects by Mesenchymal Stromal Cell-Derived Small Extracellular Vesicles in Aged Mice. *Stroke.* 2022 Jan;53(1):e14-e18. doi: 10.1161/STROKEAHA.121.035821.
64. Wang S, Hou Y, Li X, Song Z, Sun B, Li X, et al. Comparison of exosomes derived from induced pluripotent stem cells and mesenchymal stem cells as therapeutic nanoparticles for treatment of corneal epithelial defects. *Aging (Albany NY).* 2020 Oct 13;12(19):19546-19562. doi: 10.18632/aging.103904.
65. Wang X, Shah FA, Vazirisani F, Johansson A, Palmquist A, Omar O, et al. Exosomes influence the behavior of human mesenchymal stem cells on titanium

- surfaces. *Biomaterials*. 2020 Feb;230:119571. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119571.
66. Wei Z, Batagov AO, Carter DR, Krichevsky AM. Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. *Sci Rep*. 2016 Aug 9;6:31175. doi: 10.1038/srep31175.
 67. Wen S, Dooner M, Cheng Y, Papa E, Del Tatto M, Pereira M, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*. 2016 Nov;30(11):2221-2231. doi: 10.1038/leu.2016.107.
 68. Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Reis M, Yeung V, Liu X, Ericsson M, et al. Mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles restore lung architecture and improve exercise capacity in a model of neonatal hyperoxia-induced lung injury. *J Extracell Vesicles*. 2020 Jul 13;9(1):1790874. doi: 10.1080/20013078.2020.1790874.
 69. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötval J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013 May 27;2. doi: 10.3402/jev.v2i0.20360.
 70. Witwer KW, Soekmadji C, Hill AF, Wauben MH, Buzás EI, Di Vizio D, et al. Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility. *J Extracell Vesicles*. 2017 Nov 15;6(1):1396823. doi: 10.1080/20013078.2017.1396823.
 71. Witwer KW, Van Balkom BWM, Bruno S, Choo A, Dominici M, Gimona M, et al. Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. *J Extracell Vesicles*. 2019 Apr 29;8(1):1609206. doi: 10.1080/20013078.2019.1609206.
 72. Xiao X, Xu M, Yu H, Wang L, Li X, Rak J, et al. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles mitigate oxidative stress-induced senescence in endothelial cells via regulation of miR-146a/Src. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Oct 22;6(1):354. doi: 10.1038/s41392-021-00765-3.
 73. Xu M, Su X, Xiao X, Yu H, Li X, Keating A, et al. Hydrogen Peroxide-Induced Senescence Reduces the Wound Healing-Promoting Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Partially via miR-146a. *Aging Dis*. 2021 Feb 1;12(1):102-115. doi: 10.14336/AD.2020.0624.

74. Zhai X, Chen K, Yang H, Li B, Zhou T, Wang H, et al. Extracellular vesicles derived from CD73 modified human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate inflammation after spinal cord injury. *J Nanobiotechnology*. 2021 Sep 8;19(1):274. doi: 10.1186/s12951-021-01022-z.
75. Zhang P, Yeo JC, Lim CT. Advances in Technologies for Purification and Enrichment of Extracellular Vesicles. *SLAS Technol*. 2019 Oct;24(5):477-488. doi: 10.1177/2472630319846877.
76. Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomedicine*. 2020 Sep 22;15:6917-6934. doi: 10.2147/IJN.S264498.
77. Zhou L, Ye H, Liu L, Chen Y. Human Bone Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Inhibit IL-1 β -Induced Inflammation in Osteoarthritis Chondrocytes. *Cell J*. 2021 Sep;23(4):485-494. doi: 10.22074/cellj.2021.7127.
78. Zulueta A, Colombo M, Peli V, Falleni M, Tosi D, Ricciardi M, et al. Lung mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles attenuate the inflammatory profile of Cystic Fibrosis epithelial cells. *Cell Signal*. 2018 Nov;51:110-118. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.07.015.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

REVISÃO DAS ETAPAS CRÍTICAS PARA ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ORIGINADAS DO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS HUMANAS USANDO ULTRACENTRIFUGAÇÃO

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

23%	17%	12%	11%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	11%
2	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	2%
3	proceedings.science Fonte da Internet	2%
4	prezi.com Fonte da Internet	1%
5	www.deboni.he.com.br Fonte da Internet	1%
6	Renato Massis Souza Campos. "Estudo da influência de vesículas extracelulares na resposta imune contra a esporotricose experimental", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2022	1%

Anexo 2 – Iniciação Científica



Universidade Estadual de Campinas
Pró-Reitoria de Pesquisa
Programas de Iniciação Científica e Tecnológica
www.prp.unicamp.br | Tel. 55 19 3521-4891

PARECER SOBRE RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES

Bolsista: BEATRIZ FANTONI - RA 213525

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) MARCELO ROCHA MARQUES

Projeto: *"Isolamento e caracterização de vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais estromais do corpo adiposo bucal (Bola de Bichat)"*

Bolsa: PIBIC/CNPq

Processo: 124404/2020-0

Vigência: 01/09/2020 a 31/08/2021

PARECER

A bolsista em seu projeto inicial (Isolamento e caracterização de vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais estromais do corpo adiposo bucal (Bola de Bichat)) definiu as etapas, as quais devido a pandemia, o acesso ao laboratório ficou limitado dificultando o desenvolvimento deste projeto. No projeto final (Ultracentrifugação para o isolamento de vesículas extracelulares originadas de células mesenquimais estromais humanas: uma revisão da literatura) foram desenvolvidas atividades que não estavam previstas inicialmente, tendo em vista as características de MSCs-EVs (MSCs: células-tronco adultas não hematopoiética ou células mesenquimais) (EVs: vesículas extracelulares) e a necessidade de padronização de um protocolo para seu isolamento, e nesta revisão compilamos informações sobre o método mais utilizado para o isolamento de EVs oriundas de MSCs de humanos (hMSCs) nos últimos 5 anos, a ultracentrifugação. O objetivo foi compreender a dinâmica dos protocolos e evidenciar os parâmetros mais utilizados. O CR da aluna era 0,8077 com classificação da aluna na turma 40ª (30.3.2020) e agora está com CR com 0,8380 e classificação da aluna na turma 30ª (1.9.2021).

Conclusão do Parecer:

● Aprovado

Pró-Reitoria de Pesquisa, 29 de novembro de 2022.

Marcos Yakuwa Mekarú

PR ASS ADMINISTRATIVOS / TÉCNICO EM
ADMINISTRAÇÃO
(Assinatura Digital em anexo)