

CÉLULAS-TRONCO E EXOSSOMOS: A REVOLUÇÃO DA MEDICINA REGENERATIVA

STEM CELLS AND EXOSOMES: THE REVOLUTION IN REGENERATIVE MEDICINE

**Thais Melo¹,
Talitha Franco²,
Guilherme Silva³
Nathalia Moreira⁴
Marta Marques Maia⁵**

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) possuem capacidade multipotente e propriedades imunomoduladoras, o que as torna importantes na medicina regenerativa. Sua ação terapêutica é mediada pela liberação de vesículas extracelulares, especialmente exossomos. Essas vesículas (30–150 nm) transportam proteínas, microRNAs e fatores de crescimento que modulam proliferação, diferenciação e reparo tecidual, reproduzindo os efeitos das CTMs sem os riscos de transplante celular. Este estudo teve como objetivo isolar, caracterizar e avaliar exossomos derivados de CTMs do cordão umbilical. O isolamento foi realizado por ultracentrifugação diferencial e a caracterização proteica por SDS-PAGE e Western Blot confirmando a presença específica da proteína CD63, evidenciando identidade e integridade das vesículas. Os resultados demonstraram produção adequada de exossomos, reforçando seu potencial terapêutico em medicina regenerativa.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, Cordão umbilical, Exossomos, Medicina regenerativa, Terapia *cell-free*.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) possess multipotent capacity and immunomodulatory properties, which make them important in regenerative medicine. Their therapeutic effects occur predominantly through paracrine signaling, mediated

¹ Pós-graduanda em Biotecnologia no SENAI Dr. Celso Charuri – Bom Retiro. E-mail: thaiss.santos.melo@gmail.com.

² Pós-graduanda em Biotecnologia no SENAI Dr. Celso Charuri – Bom Retiro. E-mail: tbragafranco@gmail.com.

³ Pós-graduando em Biotecnologia no SENAI Dr. Celso Charuri – Bom Retiro. E-mail: silva.guilhermea@gmail.com.

⁴ Coordenadora técnica no SENAI Dr. Celso Charuri – Bom Retiro. E-mail: nathalia.moreira@sp.senai.br.

⁵ Docente e Dr. em Ciências Marta Marques Maia do Centro Universitário SENAI. E-mail: marta.maia@sp.senai.br.

by the release of extracellular vesicles, particularly exosomes. These vesicles (30–150 nm) carry proteins, microRNAs, and growth factors that modulate proliferation, differentiation, and tissue repair, reproducing the effects of MSCs without the risks associated with cell transplantation. This study aimed to isolate, characterize, and evaluate exosomes derived from umbilical cord MSCs. Isolation was performed by differential ultracentrifugation, and protein characterization by SDS-PAGE and Western Blot confirmed the specific presence of the CD63 protein, evidencing the identity and integrity of the vesicles. Results demonstrated adequate exosome production, reinforcing their therapeutic potential in regenerative medicine.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Umbilical cord, Exosomes, Regenerative medicine, *Cell-free* therapy

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células adultas multipotentes presentes em diversos tecidos, como medula óssea, cordão umbilical, sangue periférico e tecido adiposo. Elas se destacam pela capacidade de diferenciar-se em ossos, cartilagem, músculos, vasos e tecido adiposo, sendo essenciais para a manutenção e reparo tecidual (G. Liu et al., 2020; J. Liu et al., 2022; Szade et al., 2018). Além da diferenciação, as CTMs possuem propriedades imunomoduladoras, suprimindo a ativação de linfócitos e exibindo baixa expressão de MHC II, o que as torna imunoprivilegiadas e promissoras em terapias regenerativas (Kot et al., 2019; Wang et al., 2019).

Grande parte da ação terapêutica das CTMs ocorre de forma parácrina, mediada pela liberação de vesículas extracelulares, especialmente exossomos. Essas pequenas vesículas (30–150 nm) transportam proteínas, fatores de crescimento, microRNAs e mRNAs, modulando a proliferação, diferenciação e reparo das células-alvo, além de participar ativamente da comunicação intercelular (Brown et al., 2019; Ha et al., 2020; Mendt et al., 2019; Ju et al., 2023; Kalluri & LeBleu, 2020; Mori et al., 2019). Exossomos derivados de CTMs oferecem a reparação tecidual e imunomodulação sem os riscos associados ao transplante celular, como rejeição, apresentando estabilidade, baixa imunogenicidade e administração padronizada, como alternativas promissoras para terapias *cell-free*, (Xu et al., 2024;

Ma et al., 2023; Liu et al., 2023).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar do potencial terapêutico, a aplicação clínica de exossomos ainda é limitada pela ausência de protocolos padronizados de isolamento e caracterização. O presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar um protocolo confiável para isolamento de exossomos derivados de CTMs do cordão umbilical, garantindo pureza, integridade e perfil consistente, possibilitando sua utilização segura em medicina regenerativa.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Isolar, caracterizar e avaliar exossomos derivados de CTMs do cordão umbilical, demonstrando seu potencial para aplicações terapêuticas *cell-free*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Padronizar protocolo de isolamento de exossomos por ultracentrifugação.
2. Caracterizar o perfil proteico por SDS-PAGE.
3. Confirmar a presença da proteína de superfície CD63 via Western Blot.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção do Cordão Umbilical

O cordão umbilical foi doado mediante TCLE assinado e transportado em DMEM/F12 com 1% de antibióticos até o Laboratório ISO7 do Centro de Criogenia Brasil.

4.2 Processamento do Tecido do Cordão Umbilical e Expansão das Células-Tronco Mesenquimais em Cultivo 2D

O tecido umbilical foi fragmentado, lavado com PBS + 1% penicilina/estreptomicina e cultivado em garrafas T25 (Corning) com DMEM F12 (Gibco) + 10% SFB depletado (Gibco) e 1% antibióticos. O meio foi coletado a 80% de confluência e armazenado a -20°C .

4.3 Isolamento de Exossomos Provenientes de Células-Tronco Mesenquimais por Ultracentrifugação (Thermo Scientific™ Sorvall WX 100)

Foi realizado centrifugações sequenciais e filtragem a $0,22\ \mu\text{m}$, foi realizado 2 ultracentrifugações a $110.000 \times g$ por 70 min a 4°C na Sorvall WX 100 (Thermo Fisher). O pellet foi ressuspensão em PBS e armazenado a -80°C . A figura 1 ilustra o protocolo de ultracentrifugação.

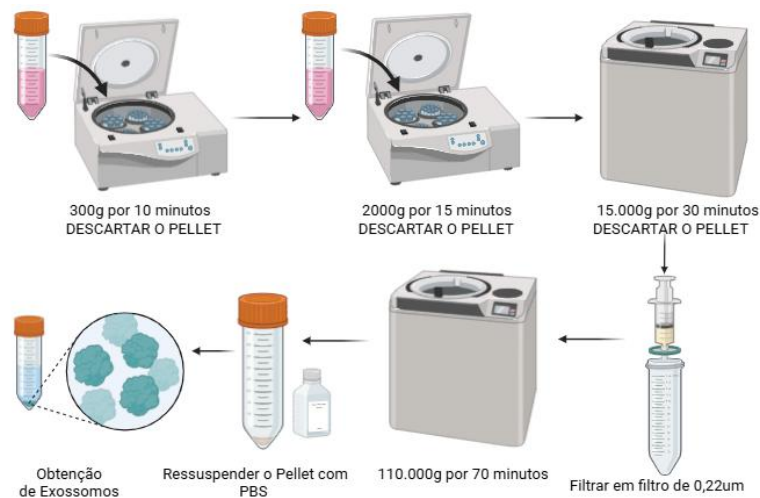


Figura 1. Protocolo de Isolamento dos Exossomos por Ultracentrifugação. OBS: Todas as centrifugações aconteceram a 4°C . Créditos da imagem: Próprio Autor. Biorender.

4.4 Análise do Conteúdo Proteico por BCA

Foi utilizado o kit de BCA Protein Assay (Merck) conforme descrição do fabricante. A leitura foi a $562\ \text{nm}$ em microplaca Varioskan™.

4.5 Caracterização proteica por SDS PAGE e detecção de CD63 por Western Blot

Proteínas exossomais (10 µg/poço) foram analisadas por SDS-PAGE com coloração por nitrato de prata e, no Western Blot, detectadas com anticorpo Anti-CD63 (Invitrogen) e secundário peroxidase (Sigma®), reveladas por quimiluminescência (Blot Scanner, C-DiGit®).

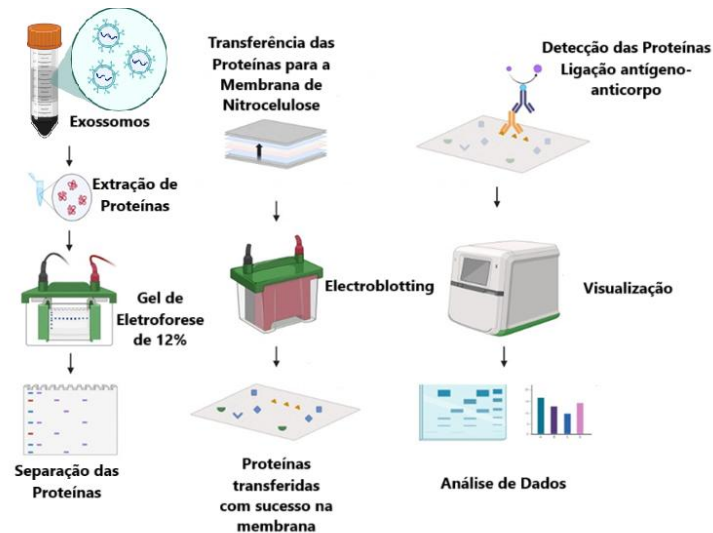


Figura 2. Esquema das etapas de SDS-PAGE e Western Blot para detecção de proteínas características de exossomos, conforme as diretrizes da ISEV. Créditos da imagem: Próprio Autor. Biorender

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O protocolo de ultracentrifugação diferencial permitiu a obtenção de exossomos purificados, com remoção eficiente de contaminantes e vesículas maiores, devido a inclusão de etapa de lavagem após ultracentrifugação, o que garantiu a remoção de vesículas extracelulares maiores. O SDS-PAGE revelou um perfil proteico complexo e bem definido, mantendo a integridade das proteínas, e a presença de bandas próximas a 60 kDa sugeriu proteínas exossomais. A identidade dos exossomos foi confirmada pelo Western Blot, com detecção da proteína de superfície CD63 (60–65 kDa), atendendo aos critérios internacionais da International Society for Extracellular Vesicle (ISEV). Os resultados indicam que Células-tronco provenientes do cordão umbilical produzem exossomos em quantidade e qualidade adequadas para aplicações terapêuticas.

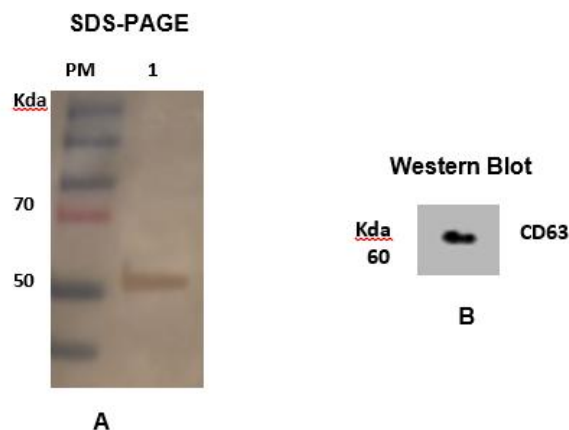


Figura 3. A – SDS-PAGE (12%) corada com nitrato de prata mostrando os exossomos isolados por ultracentrifugação diferencial. **B** – Western blot confirmando a presença da proteína CD63, marcador característico de vesículas extracelulares.

6. CONCLUSÃO

Os objetivos foram atingidos com a padronização de um protocolo de isolamento de exossomos derivados de CTMs do cordão umbilical. A caracterização proteica e a confirmação de CD63 evidenciaram identidade e integridade das vesículas. Os resultados reforçam a viabilidade de utilização de exossomos como produtos *cell-free* em medicina regenerativa. Estudos futuros sobre biogênese exossomal e análises de imagem avançadas aprofundarão a compreensão funcional dessas vesículas e consolidarão sua aplicação terapêutica segura.

7. REFERÊNCIAS

Brown, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., Svinarich, D., Dodds, R., Govind, C. K., & Chaudhry, G. R. (2019). Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. In *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Vol. 13, Issue 9, pp. 1738–1755). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/term.2914>.

Ha, D. H., Kim, H. K., Lee, J., Kwon, H. H., Park, G. H., Yang, S. H., Jung, J. Y., Choi, H., Lee, J. H., Sung, S., Yi, Y. W., & Cho, B. S. (2020). Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. In *Cells* (Vol. 9, Issue 5). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9051157>.

Ju, Y., Hu, Y., Yang, P., Xie, X., & Fang, B. (2023). Extracellular vesicle-loaded hydrogels for tissue repair and regeneration. *Materials Today Bio*, 18, 100522. <https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2022.100522>.

Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. In *Science* (Vol. 367, Issue 6478). American Association for the

Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>.

Kot, M., Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Musiał-Wysocka, A., Suda-Szczurek, M., & Majka, M. (2019). The importance of hla assessment in “off-the-shelf” allogeneic mesenchymal stem cells based-therapies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20225680>.

Lee, Y. I., Choi, S., Roh, W. S., Lee, J. H., & Kim, T. G. (2021). Cellular Senescence and Inflammaging in the Skin Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS22083849>.

Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., & Fessler, R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. In *Stem Cell Reviews and Reports* (Vol. 16, Issue 1, pp. 3–32). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>.

Liu, J., Gao, J., Liang, Z., Gao, C., Niu, Q., Wu, F., & Zhang, L. (2022). Mesenchymal stem cells and their microenvironment. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02985-y>.

Marofi, F., Kozlitina, I. A., Margiana, R., Bahramali, M., Suksatan, W., Abdelbasset, W. K., Chupradit, S., Nasimi, M., & Maashi, M. S. (2021). MSCs and their exosomes: a rapidly evolving approach in the context of cutaneous wounds therapy. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02662-6>.

Ma, Z. J., Yang, J. J., Lu, Y. B., Liu, Z. Y., & Wang, X. X. (2020). Mesenchymal stem cell-derived exosomes: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, 12(8), 814–840. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V12.I8.814>.

Mendt, M., Rezvani, K., & Shpall, E. (2019). Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplantation* 2019 54:2, 54(2), 789–792. <https://doi.org/10.1038/s41409-019-0616-z>.

Mens, M. M. J., & Ghanbari, M. (2018). Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(3), 309–322. <https://doi.org/10.1007/S12015-018-9808-Y>.

Mori, M. A., Ludwig, R. G., Garcia-Martin, R., Brandão, B. B., & Kahn, C. R. (2019). Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. In *Cell Metabolism* (Vol. 30, Issue 4, pp. 656–673). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.011>.

Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Annual Review of Biochemistry Exosomes. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118>.

Szade, K., Gulati, G. S., Chan, C. K. F., Kao, K. S., Miyanishi, M., Marjon, K. D., Sinha, R., George, B. M., Chen, J. Y., & Weissman, I. L. (2018). Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 29, Issue 2, pp. 191–204). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7419>.

Tutuianu, R., Rosca, A. M., Iacomi, D. M., Simionescu, M., & Titorencu, I. (2021). Human mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote in vitro wound healing by modulating the biological properties of skin keratinocytes and fibroblasts and stimulating angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126239>.

Wang, Y., Huang, J., Gong, L., Yu, D., An, C., Bunpetch, V., Dai, J., Huang, H., Zou, X., Ouyang, H., & Liu, H. (2019). The Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in

Regulating Surface HLA-I. IScience, 15, 66–78. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2019.04.011>.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à doadora do tecido, cuja contribuição possibilitou o isolamento das células. Ao Centro de Criogenia Brasil, pelo custeio da coleta, obtenção e manutenção da cultura celular, viabilizando a expansão e a coleta do meio de cultivo contendo os exossomos, além do fornecimento de reagentes. Ao Laboratório de Lípidos da Universidade de São Paulo (USP), pela disponibilização da ultracentrífuga. Ao Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio com insumos essenciais ao desenvolvimento do projeto. Ao SENAI Biotecnologia, por permitir a realização das análises downstream deste Trabalho de Conclusão do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia.

SOBRE OS AUTORES

¹ Thais Melo



Possui graduação em Biomedicina e atua como Pesquisadora Científica do Grupo MedCell. Discente da Pós-graduação em Biotecnologia do Centro Universitário SENAI São Paulo.

² Talytha Franco



Possui graduação em Química e atua como Professora de química e biologia do Ensino Básico. Discente da Pós-graduação em Biotecnologia do Centro Universitário SENAI São Paulo.

³ Guilherme Silva



Possui tecnólogo em Automação Industrial e atua como Especialista de Automação. Discente da Pós-graduação em Biotecnologia do Centro Universitário SENAI São Paulo.

4 Nathalia Ramalho Moreira



Possui graduação em Bioquímica (UFV), mestrado e doutorado em Ciências (IQ-USP), especializações em Controle de Qualidade, Gestão de Projetos e Engenharia de Bioprocessos, além de formações em negociação, facilitação, vendas e marketing pelo Instituto Fraunhofer IPK (Alemanha). Atuou na estruturação do Instituto Senai de Inovação em Biotecnologia e atualmente é Coordenadora Técnica do Senai-SP Biotecnologia.

5 Marta Marques Maia



Possui graduação em Biomedicina e Mestrado e Doutorado em Ciências. Atua como Instrutora de Formação Profissional III na Escola SENAI de Biotecnologia Dr. Celso Charuri e também como docente na graduação e pós-graduação em Biotecnologia do Centro Universitário SENAI São Paulo.