

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Efeito do pré-condicionamento osteogênico no perfil de microRNAs de
vesículas extracelulares de células estromais perivasculares do cordão
umbilical de cães**

Natália Barone Spachi
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

NATÁLIA BARONE SPACHI

**Efeito do pré-condicionamento osteogênico no perfil de microRNAs de
vesículas extracelulares de células estromais perivasculares do cordão
umbilical de cães**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Emily Correna Carlo Reis

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S732e
2025

Spachi, Natália Barone, 1997-

Efeito do pré-condicionamento osteogênico no perfil de microRNAs de vesículas extracelulares de células estromais perivasculares do cordão umbilical de cães / Natália Barone Spachi. – Viçosa, MG, 2025.

1 dissertação eletrônica (48 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Emily Correna Carlo Reis.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária, 2025.

Referências bibliográficas: f. 39-48.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.622>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cães - Fraturas. 2. Ossos - Regeneração.
3. Células-tronco mesenquimais. 4. Vesículas extracelulares.
5. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa.
I. Reis, Emily Correna Carlo, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.089715

NATÁLIA BARONE SPACHI

Efeito do pré-condicionamento osteogênico no perfil de microRNAs de vesículas extracelulares de células estromais perivasculares do cordão umbilical de cães

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2025.

Assentimento:

Natália Barone Spachi
Autora

Emily Correna Carlo Reis
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 26/09/2025 às 17:03:40 e pela orientadora em 01/10/2025 às 11:31:22. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **VS60.HR30.1NVD** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, aos amigos queridos e aos meus pets pelo suporte emocional durante todo o período do mestrado. Agradeço também à minha orientadora, Emily Reis, e ao meu coorientador, Adriano Sabino, que me guiaram dentre os entraves que apareceram ao longo desta jornada. Outra pessoa importantíssima na realização deste estudo foi Silvia Nolasco, mestre e doutoranda da faculdade de farmácia da UFMG, que me auxiliou na execução da metodologia experimental.

Direciono agradecimentos também ao Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (LINBIO) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e à Universidade Federal de Viçosa.

Agradeço ainda às fundações de amparo à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Você está vivo. Esse é o seu espetáculo. Só quem se mostra se encontra. Por mais
que se perca no caminho.”

Cazuza

RESUMO

SPACHI, Natália Barone, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025.
Efeito do pré-condicionamento osteogênico no perfil de microRNAs de vesículas extracelulares de células estromais perivasculares do cordão umbilical de cães. Orientadora: Emily Correna Carlo Reis.

A não união óssea é uma das possíveis complicações de consolidação de fraturas e é a mais comumente observada em animais de pequeno porte e em regiões distais de membros. As técnicas atuais de tratamento envolvem a utilização de enxertos, mas apresentam sucesso limitado. As células estromais/tronco mesenquimais (MSCs) vêm sendo estudadas quanto ao potencial terapêutico em diversas afecções, que é desempenhado, em grande parte, pela ação das vesículas extracelulares (EVs), responsáveis pela comunicação celular e, também com efeito terapêutico atualmente estudado em lesões ósseas. Dentre as diversas substâncias presentes no interior das EVs, estão os microRNAs que participam também do efeito terapêutico de EVs. Considerando que o microambiente das MSCs influencia diretamente o conteúdo produzido pela célula. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de microRNAs específicos nas EVs derivadas de MSCs de cordões umbilicais caninos, com e sem pré-condicionamento osteogênico. Os miRNAs cfa-miR-21, cfa-miR26a, cfa-miR-27a e cfa-miR-29a, reconhecidamente participantes da osteogênese, foram avaliados nas amostras de EVs obtidas de MSCs cultivadas com pré-condicionamento (OSTEO-EVs) e sem (CTRL-EVs), por RT-qPCR, e foi feita a quantificação relativa da expressão de cada gene no grupo tratado em comparação com o grupo controle. Detectou-se a presença dos quatro microRNAs avaliados em ambos os grupos, mas com maior expressão nas OSTEO-EVs. O miR-27a mostrou expressão 18 vezes superior no grupo das OSTEO-EVs, o miR-26a foi observado oito vezes mais expresso nas OSTEO-EVs do que nas CTRL-EVs, o miR-21, cinco vezes mais expresso, e miR-29a, 3,5 vezes mais expresso. Concluiu-se que o pré-condicionamento influenciou a expressão dos quatro miRNAs estudados, confirmando o efeito do microambiente de cultivo no conteúdo das EVs.

Palavras-chave: EVs; miRNAs; MSCs; regeneração óssea; RT-qPCR

ABSTRACT

SPACHI, Natália Barone, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2025. **Effect of osteogenic preconditioning on the microRNA profile of extracellular vesicles of perivascular stromal cells from the umbilical cord of dogs.** Adviser: Emily Correna Carlo Reis.

Bone nonunion is one of the possible complications of fracture healing and is most commonly observed in small animals and in distal limbs. Current treatment techniques involve the use of grafts, but have shown limited success. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) have been studied for their therapeutic potential in several conditions, largely driven by the action of extracellular vesicles (EVs), which are responsible for cellular communication and also have a therapeutic effect in bone lesions. Among the various substances present within EVs are microRNAs, which also participate in the therapeutic effect of EVs. Considering that the MSCs microenvironment directly influences the content produced by the cell, the objective of the present study was to evaluate the expression of specific microRNAs in EVs derived from canine umbilical cord MSCs, with and without osteogenic preconditioning. The miRNAs cfa-miR-21, cfa-miR26a, cfa-miR-27a and cfa-miR-29a, known to participate in osteogenesis, were evaluated in EV samples obtained from MSCs cultured with preconditioning (OSTEO-EVs) and without (CTRL-EVs), through RT-qPCR, and the relative quantification of the expression of each gene in the treated group was performed compared to the control group. The presence of the four microRNAs evaluated was detected in both groups, but with higher expression in OSTEO-EVs. miR-27a showed 18 fold higher expression in the OSTEO-EVs group, miR-26a was eight-fold more expressed in OSTEO-EVs than in CTRL-EVs, miR-21 was five-fold more expressed, and miR-29a was 3.5-fold more expressed. It was concluded that preconditioning influenced the expression of the four miRNAs studied, proving the effect of the culture microenvironment on EV content.

Keywords: bone regeneration; EVs; miRNAs; MSCs; RT-qPCR

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase Alcalina
BAMBI	Inibidor ligado à membrana de actina
BGLAP	Codificador da proteína osteocalcina
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
BMP2	Proteína Morfogenética Óssea 2
BSP	Sialoproteína Óssea
Col10a1	Gene que codifica a cadeia alfa 1 do colágeno tipo X
COL1A	Colágeno tipo 1
cPVMSCs	Células estromais mesenquimais perivasculares do cordão umbilical canino (<i>canine umbilical cord perivascular MSCs</i>)
CTRL-EVs	EVs provenientes de MSCs em meio de coleta sem pré-condicionamento
DC-STAMP	Proteína transmembrana específica de células dendríticas
EVs	Vesículas extracelulares (<i>Extracellular Vesicles</i>)
ISEV	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares
LGF-Beta	Fator de crescimento latente-beta
miRNA	microRNA
MMPs	Metaloproteinases da Matriz
mRNA	RNA mensageiro
MSCs	Células estromais ou tronco mesenquimais (<i>Mesenchymal Stem Cells</i>)
NFATc-1	Fator nuclear de células T ativadas
NTA	<i>Nanotracking Analysis</i>
OPG	Osteoprotegerina

OPN	Osteopontina
OSTEO-EVs	EVs provenientes de MSCs em meio de coleta com pré-condicionamento osteogênico
OSX	Osterix
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PTEN	Homologo de fosfatase e tensina
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RANKL	Ligante do Receptor Ativados do Fator Nuclear Kappa B
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa Quantitativa (<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
RUNX2	Fator de Transcrição Relacionado ao Runt2
RUNX2-I	Isoforma tipo 1 do RUNX2
RUNX2-II	Isoforma tipo 2 do RUNX2
SFB	Soro Fetal Bovino
sFlt1	Fator solúvel em tirosina quinas-1
SPP1	Gene Codificador da proteína Osteopontina
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TGFBR1	Receptor 1 do fator de crescimento transformante beta
TGF-β	Fator de Transformação de crescimento Transformador beta
TRAP+	Fosfatase Ácida Resistente a Tartarato
UTR	Extremidade Não Traduzida (<i>untranslated region</i>)
WB	<i>Western Blotting</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Epidemiologia das fraturas	12
2.2 Tratamentos para complicações de consolidação	12
2.2.1 Enxerto autólogo	12
2.2.2 Enxerto alógeno	13
2.2.3 Biomateriais.....	14
2.2.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	14
2.3 MSCs e EVs	14
2.4 miRNAs.....	16
2.5 Tipos de pré-condicionamento para regeneração óssea	20
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	22
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
4.1 Preparação das Vesículas Extracelulares em Etapas Anteriores	24
4.2 <i>Nanotracking Analysis</i> (NTA).....	24
4.3 Análise de miRNAs	25
4.3.1 Seleção de sequências (primers alvo)	25
4.3.2 Extração do conteúdo de miRNAs das amostras	25
4.3.3 Quantificação do RNA total das amostras	26
4.3.4 Confeção do cDNA.....	26
4.3.4.1 Poliadenilação	26
4.3.4.2 Conversão de miRNA em cDNA	26
4.3.4.3 <i>Quantitative Reverse Transcription</i> PCR (RT-qPCR).....	27
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	28
5.1 NTA.....	28
5.2 RT-qPCR	32
6 CONCLUSÃO	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

Fraturas são afecções comuns na rotina clínico-cirúrgica ortopédica da medicina veterinária de cães e gatos e são caracterizadas pela perda total ou parcial na continuidade do tecido ósseo (KEOSENTHONG et al., 2019), sendo as de ossos longos as mais frequentes (MARTINS et al., 2023). O processo de regeneração do tecido ósseo é dependente do coordenado acoplamento entre angiogênese e osteogênese (LI et al., 2013). Na ocorrência de uma fratura, ocorre o rompimento dos vasos sanguíneos com degranulação plaquetária e reação inflamatória local com a liberação de diversos sinalizadores pró-inflamatórios e fatores de crescimento que propiciam o recrutamento de neutrófilos e macrófagos no foco da fratura (MAJIDINIA et al., 2018). O rompimento dos vasos sanguíneos com a formação de um coágulo também confere mínima estabilidade aos fragmentos da fratura, formando uma matriz provisória de tecido conjuntivo no local. Com o passar dos dias, ocorre a penetração de vasos sanguíneos no foco da fratura, o que promove migração de fibroblastos e células progenitoras de condroblastos e osteoblastos ao local e a formação do calo fibrocartilaginoso, mais estável do que o coágulo anterior. Neste cenário, células osteoprogenitoras também são recrutadas para o foco da fratura, se proliferam e se diferenciam em osteoblastos, gerando o calo ósseo mineralizado, com consequente consolidação da fratura (MAJIDINIA et al., 2018).

Dentre as possíveis complicações em consolidação de fraturas estão a união retardada e a não união óssea, comumente observadas em animais principalmente nos de pequeno porte na porção distal do rádio e da tíbia (KANG et al., 2016). A não união pode ocorrer por diversos fatores como instabilidade no local da fratura, dificuldade na justaposição e consequente pouco contato entre os fragmentos da fratura, isquemia local ou doença sistêmica presente, sendo que, o maior fator para ocorrência dessa complicação é a escassez de suprimento sanguíneo no foco da fratura (FERNANDES et al., 2008; THOMAS et al., 2023). A maior ocorrência da não união em cães e gatos aparece em regiões distais de rádio, ulna, tíbia e fíbula. Todas são regiões cuja cobertura de tecidos moles é reduzida e com escassa vascularização (WELCH et al., 1997).

Atualmente existem diferentes métodos de tratamento das não uniões ósseas, porém, a taxa de consolidação óssea em não uniões, pós-tratamento por diferentes métodos, ainda é inferior à 50%. Até mesmo o padrão ouro para tratamento, o enxerto

autólogo, apresenta taxas de falha de consolidação, variando de 14,9% a 44,7% dos casos (TATEIWA, et al., 2025). Neste sentido, apesar da existência destas opções de tratamentos para fraturas complicadas, tais ferramentas ainda se mostram com taxa de sucesso insatisfatória e por isso há ainda a necessidade de busca de um novo tipo de meio terapêutico, buscando maior eficácia na consolidação de fraturas complicadas, muitas vezes precursoras dos casos de não união (HERTEL et al., 2022; TATEIWA, et al., 2025; STEWART, et al., 2019).

A necessidade de novas ferramentas terapêuticas proporcionou o direcionamento de estudos para as células estromais ou tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells* – MSCs), células não especializadas e com capacidade de autorrenovação e diferenciação em qualquer linhagem celular mesenquimal (ZAKRZEWSKI et al., 2019; POLIWODA et al., 2022), e das Vesículas Extracelulares (EVs), estruturas responsáveis por grande parte da ação das MSCs (XUE et al., 2023; WELSH et al., 2023).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia das fraturas

Dentro da casuística clínico-cirúrgica ortopédica veterinária de pequenos animais as fraturas são afecções recorrentes (KUMAR, et al., 2022). Dentre os casos de fratura, as de ossos longos se apresentam em maior frequência (MARTINS, et al., 2023; KALLIANPUR, et al., 2018; BATATINHA, et al., 2021). Dados epidemiológicos quanto à frequência exata das fraturas e os ossos acometidos ainda são escassos, porém, alguns estudos os relatam, demonstrando maiores frequências de fraturas em fêmur, rádio, ulna, tíbia, fíbula e úmero. Neste sentido, KUMAR e colaboradores (2022) avaliaram 21719 casos de cães levados à enfermagem cirúrgica do hospital de super especialidades da Universidade Veterinária de Sri Vankateswara, na Índia durante 3 anos (2017 a 2020). As fraturas foram responsáveis por 438 casos dos casos totais. Destes, 326 (74,42%) tratavam-se de fraturas em ossos longos. Concordantemente, outros três estudos, dois realizados na Índia (SRIHARSHA, et al., 2024; KALLIANPUR, et al., 2018) e um realizado no Brasil (BATATINHA, et al., 2021) relataram grande frequência de fraturas em ossos longos, e apresentam fêmur, rádio e ulna, tíbia e fíbula e úmero como ossos mais acometidos. Sriharsha e colaboradores (2024) obtiveram índices de 1950 casos de fraturas de ossos longos, nos quais 38,7% eram fraturas de fêmur, 26,1% de rádio e ulna, 22,1% de tíbia e fíbula e 13,1% em úmero. Analogamente, Kallianpur e colaboradores (2018) obtiveram índices referentes a fraturas de 216 cães ao longo de junho de 2015 a maio de 2016, nos quais 37% dos casos foram fraturas de fêmur, 28,7% de rádio e ulna, 20,4% de tíbia e fíbula e 7,9% em úmero. Em Petrolina (PE), no Brasil, Batatinha e pesquisadores (2021) realizaram um estudo retrospectivo dos casos atendidos durante os anos de 2016 a 2018 no hospital veterinário da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Encontraram um total de 55 casos de fraturas, sendo que a maioria era relativa à fraturas de esqueleto apendicular e acometendo principalmente fêmur (46%), tíbia e fíbula (25%), rádio e ulna (19%), e úmero (10%).

2.2 Tratamentos para complicações de consolidação

2.2.1 Enxerto autólogo

O padrão ouro para tratamento das não uniões ósseas na medicina veterinária é o enxerto autólogo (cujos sítios doador e receptor do enxerto pertencem ao mesmo indivíduo) de osso trabecular fresco. Essa indicação se deve à sua rápida incorporação ao local implantado e por ter propriedades osteoindutoras (capacidade

de induzir formação de osteoblastos através do estímulo para diferenciação de células osteoprogenitoras de tecidos circundantes à lesão), osteogênicas (capacidade de produzir novo tecido ósseo pela diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos) e osteocondutoras (capacidade do enxerto de servir como suporte mecânico para migração celular, crescimento de vasos e tecido ósseo novo), que aceleram o processo regenerativo (DIAS et al., 2013; ORYAN et al., 2014). Contudo, apresenta como importantes desvantagens prolongar o período trans-cirúrgico, a morbidade associada à área doadora e a quantidade limitada (DIAS et al., 2013; BACALBASA et al., 2022). FELTRI e colaboradores, 2022, elaboraram uma revisão sistemática onde avaliou-se os resultados, de 4 diferentes grupos de tratamentos para defeitos ósseos críticos em diáfises de ossos longos, quanto taxas de união por 1ª intenção, complicações, reintervenção e falha. O grupo formado por autoenxertos e aloenxertos foi o que apresentou menores taxas de complicação e reintervenção, mas ainda sim configurou em taxas de 25% e 23%, respectivamente, para os parâmetros. Neste estudo concluiu-se que apesar da existência de diferentes técnicas para tratamento de defeitos ósseos de tamanho crítico em ossos longos, nenhum deles satisfaz plenamente em termos de segurança, efetividade e duração do resultado. No mesmo sentido, WISANUYOTIN e colaboradores, 2022, compararam os resultados da aplicação de enxertos autólogo e alógeno em reconstrução tecidual após ressecção de tumores ósseos. Observou-se que ambas as terapias tinham resultados clínicos aceitáveis, porém as taxas de falha de reconstrução avaliadas para enxerto autólogo e alógeno foram, respectivamente, 38% e 55,3%. Além disso, a complicação mais comum recorrente no grupo de avaliação do enxerto autólogo foi a não união óssea (30%).

2.2.2 Enxerto alógeno

Os aloenxertos (cujo local doador de tecido e receptor de tecido são de dois indivíduos geneticamente diferentes da mesma espécie) resolvem as desvantagens de quantidade e tempo transoperatório pois a quantidade de tecido disponível para transplante é maior, podendo ser obtido de bancos de tecidos e não utiliza tempo do procedimento cirúrgico para retirada do enxerto do local doador. Apesar disso, há maior risco de rejeição e de infecção com o uso dos enxertos alógenos, além de serem de maior custo e terem capacidade de osteoindução limitada e não serem osteogênicos (DIAS et al., 2013; ORYAN et al., 2014).

2.2.3 Biomateriais

A busca por novas alternativas terapêuticas conduziu ao estudo dos enxertos sintéticos, que mimetizam o microambiente natural (FERNANDES et al., 2008; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2020). Os biomateriais são normalmente osteocondutores necessitando de contato com abundante vascularização no tecido implantado para sua atuação eficaz. Contudo, os biomateriais não são osteoindutores e nem osteogênicos, tendo ação limitada em não uniões devido à deficiência de vascularização (SHIRANE et al., 2010; GÓMEZ-BARRENA et al., 2015; SULZER et al., 2022).

2.2.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

A aplicação de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no defeito ósseo pode ser uma opção, utilizada no intuito de concentrar fatores de crescimento no local da fratura, possibilitando a aceleração da neoformação óssea (BARBOSA et al., 2008). As plaquetas mimetizam o microambiente inicial da regeneração de fratura após lesão (fase inflamatória), proporcionando otimização da secreção de fatores promotores de angiogênese e osteogênese através do recrutamento de células osteoprogenitoras (STEWART, et al., 2019). Apesar de bons resultados, o PRP apresenta desvantagens de aplicação, tais como morbidade do local de aplicação, podendo ocorrer infecção, injúria tecidual ou formação de cicatriz, quantidade limitada, já que é um concentrado de plaquetas autólogo e falta de padronização no preparo e aplicação (SILVA, 2017; REDDY et al., 2020; VAN LIESHOUT et al., 2021). Diversos estudos tratam sobre a avaliação do uso do PRP para promoção de consolidação óssea, mas os resultados são controversos e pouco consistentes, tanto por conta da falta de padronização do plasma quanto pela fato de a análise ser, muitas vezes, realizada com a associação do PRP a outro meio terapêutico (STEWART, et al., 2019).

2.3 MSCs e EVs

Células estromais ou tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells* - MSCs) são células não especializadas com capacidade de diferenciação em qualquer linhagem celular mesenquimal e de autorrenovação (ZAKRZEWSKI et al., 2019; POLIWODA et al., 2022). Tais células têm sido amplamente estudadas para tratamento de lesões em diversos tecidos pela sua característica de secreção de fatores bioativos e imunomodulatórios em resposta ao microambiente em que foram implantadas (HERTEL et al., 2022). Em tecido ósseo, o uso de MSCs mostrou-se

eficaz no reparo de defeitos ósseos, em função das propriedades osteogênicas e osteoindutoras que essas células são capazes de exercer (FERNANDES et al., 2008).

Apesar de promissor, o uso das MSCs na rotina clínica ainda enfrenta dificuldades relacionadas à escolha do tipo celular ideal e a idade do doador, por envolver a necessidade de procedimento cirúrgico invasivo em ambiente hospitalar para coleta, e dificuldades na logística de utilização, devido à necessidade de aplicação de célula viva e metabolicamente ativa, como num transplante (HERTEL et al., 2022). Outros fatores observados como limitantes do potencial terapêutico dessas células são perda de direcionamento celular após implantação, baixa taxa de sobrevivência celular e capacidade de diferenciação prejudicada das células transplantadas (XUE et al., 2023).

Diversos estudos demonstraram que benefícios terapêuticos das MSCs se dão, em sua maior parte, pela sua capacidade modulatória e ação parácrina e não por sua diferenciação. Isso ocorre por meio das vesículas extracelulares (EVs), pequenas estruturas envolvidas por uma bicamada lipídica sem capacidade de autorreplicação, liberadas por diversos tipos celulares e envolvidas na comunicação intercelular (XUE et al., 2023; WELSH et al., 2023). Seu conteúdo reflete o estado metabólico da célula mãe no momento do brotamento, funcionando como um carreador de componentes diversos, incluindo RNAs mensageiros (mRNAs), microRNAs (miRNAs), proteínas, lipídeos e DNA. É importante deixar claro que estes componentes correspondem aos contidos na célula de origem no momento em que foram secretadas em um microambiente específico, portanto, sofrendo influência deste microambiente (ELSHARKASY et al., 2020; HERTEL et al., 2022). Sendo assim, as EVs são grandes candidatas ao uso em terapia celular regenerativa (IRFAN et al., 2022; XU et al., 2022).

A liberação das EVs e demais ações relacionadas à atividade terapêutica das MSCs está relacionada ao estímulo recebido no local de implantação. XUE e colaboradores (2023) fizeram uma revisão direcionada à avaliação do microambiente celular, em busca de verificar sua influência nos fatores parácrinos liberados pelas MSCs e, portanto, no efeito terapêutico exercido por elas. Estes autores concluíram que o microambiente de cultivo celular e o comportamento biológico das MSCs afetam sua atividade parácrina. A alteração do microambiente de cultivo celular promove a formação de um perfil de secreção diferenciado das células. Tal informação é promissora para a medicina regenerativa à medida que por meio da modulação do microambiente de cultivo celular, pode-se direcionar a ação parácrina das MSCs. O

efeito do microambiente das MSCs nas EVs por elas liberadas também foi evidenciado na revisão sistemática de Hertel et al. (2022), especificamente sobre diferentes métodos de pré-condicionamento para a produção de EVs para a regeneração óssea.

Isso era esperado pelo próprio mecanismo fisiopatológico da consolidação de fraturas. Após uma fratura, o organismo apresenta resposta inflamatória promovendo a produção de diversos fatores de crescimento e citocinas, tais como Fator de crescimento latente-beta (LGF-Beta), produzido pela matriz óssea lesionada, e Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que compõem o microambiente do foco da lesão. Estes e outros fatores como o peptídeo antimicrobiano LL-37 e as Metaloproteinases da Matriz (MMPs) propiciam a migração de MSCs de tecidos adjacentes para atuação no foco da lesão. Com as MSCs no foco da lesão o microambiente da fratura atua sobre elas, e essa interação entre MSCs, vias de sinalização e microambiente é fundamental para a regeneração do tecido. Um exemplo é a presença do RANKL neste microambiente, que atua primeiramente ativando a atividade osteoclástica, importante para remoção dos debris da lesão para aposição de um novo tecido ósseo. Após a remoção do tecido lesionado, diversas vias de sinalização proporcionam a diferenciação das MSCs em osteoblastos e condrócitos para posterior formação de tecido ósseo (HAN et al., 2025).

2.4 miRNAs

EVs são estruturas secretadas pelas MSCs, com habilidade de comunicação entre as células pelo carreamento de diversas proteínas, ácidos nucleicos, como por exemplo os miRNAs, e lipídios (ZAKRZEWSKI et al., 2019; IRFAN et al., 2022). Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA (fita simples) não codificantes, compostas de 19 a 25 nucleotídeos, e que atuam em diversas vias de sinalização endógenas, regulando a expressão gênica nos organismos multicelulares (LI et al., 2013; SHARMA, 2017; IRFAN et al., 2022). Além disso, os miRNAs são moléculas de alta estabilidade e estão presentes em amostras de fácil obtenção, tendo sido estudados para utilização terapêutica como biomarcadores pela sua participação em diversos processos metabólicos (XU et al., 2022).

Todas as células expressam diversos miRNAs. Quando estes são liberados para os fluidos orgânicos, passam a ser denominados miRNAs circulantes e atuam na comunicação célula-a-célula (JORGE et al., 2021). Ligando-se a alguma extremidade não traduzida (UTR) do mRNA, o miRNA maduro geralmente inibe a tradução proteica e, portanto, a expressão gênica. Pode ocorrer também de o miRNA se ligar a uma

região promotora do mRNA, resultando em estímulo da tradução proteica e ativação da expressão gênica (JORGE et al., 2021; XU et al., 2022). A detecção de sub ou super expressão de determinado miRNA pode ser utilizada para diagnóstico e prognóstico clínicos, além de uso para monitoramento de respostas terapêuticas e estudo de vias de ação terapêutica (JORGE et al., 2021; XU et al., 2022).

Cada miRNA atua estimulando ou inibindo algum processo, de acordo com a intervenção em determinada via metabólica. A associação com angiogênese e osteogênese de alguns miRNAs já foi demonstrada, sendo potencialmente interessantes para tratamento de fraturas complicadas (IRFAN et al., 2022). Os miRNAs: miR-20a, miR-21, miR-26a, miR-27a, miR-29a e miR-142 já foram associados ao reparo de defeitos ósseos (; LI et al., 2013; YOU et al., 2016; CHEN et al., 2021; GROVEN et al., 2021; OKA et al., 2021; PENG et al., 2022;)

O miR-21 tem papel importante no remodelamento e na homeostase óssea por atuar na comunicação entre osteoblastos e osteoclastos. Num estudo realizado em modelo murino, demonstrou-se a regulação positiva da diferenciação osteogênica e de mineralização óssea pelo miR-21 por meio do estímulo da expressão de fatores pró-osteogênicos, como a fosfatase alcalina (ALP), o Fator de Transcrição Relacionado ao Runt 2 (RUNX2), a Osteopontina (OPN), Osterix (OSX) e MeF2c (OKA et al., 2021). Além disso, no mesmo estudo, se verificou que a deficiência do miR-21 acarretava a supressão da expressão dos referidos fatores pró-osteogênicos, concluindo-se que este miRNA tem potencial para ser um biomarcador de osteogênese.

RUNX2 é um fator de transcrição que se comunica com promotores de genes alvo pelo seu domínio Runt, facilitando a remodelação óssea pela interação com proteínas e sequências de DNA. As principais isoformas de RUNX2, RUNX2 tipo 1 (RUNX2-I) e RUNX2 tipo 2 (RUNX2-II) são derivadas da codificação, pelo RUNX2, de transcritos derivados dos promotores P1 e P2 e de *splicing* alternativo. O RUNX2 é regulado positivamente durante a diferenciação osteoblástica, sendo expresso desde a célula osteoprogenitora até os osteoblastos ao longo da diferenciação celular. O tipo 1 é expresso de forma constante ao longo da diferenciação osteoblástica e o tipo 2 tem sua expressão elevada quando é induzido pelas Proteínas Morfogênicas Ósseas (BMPs). Nos osteoblastos maduros, o RUNX2 sofre regulação negativa. Sendo assim, pela presença constante ao longo da diferenciação da linhagem celular em células osteoprogenitoras, o RUNX2 é o principal fator de transcrição determinante da

formação óssea e marcador de diferenciação osteoblástica (ZAINAL ARIFFIN et al., 2022).

OSX é um gene também regulado positivamente ao longo da diferenciação osteoblástica e é mais um fator estimulado pelo miR-21. O OSX codifica um fator de transcrição osteoblástico específico, necessário para a ocorrência da formação óssea, sendo altamente expresso nos primeiros dias da diferenciação osteoblástica e, portanto, considerado o principal responsável pela formação do esqueleto (ZAINAL ARIFFIN et al., 2022).

A ALP é considerada um marcador precoce para diferenciação osteoblástica e é produzida pelos osteoblastos; sua concentração tem correlação positiva com a taxa de formação óssea. A ALP aumenta a liberação de fosfato inorgânico local (estímulo da mineralização óssea) e reduz o pirofosfato extracelular (inibidor da mineralização), favorecendo a mineralização óssea (ZAINAL ARIFFIN et al., 2022). Wei e colaboradores (2019) utilizaram a ALP como marcador de diferenciação osteogênica em experimento no qual foi detectado aumento significativo de sua expressão em exossomos derivados de MSCs em estágio inicial de diferenciação osteogênica. Assim como no estudo de WEI e colaboradores, a ALP foi constantemente utilizada para estudos que avaliaram a diferenciação osteogênica e a mineralização *in vitro* (LI et al., 2018; XIE et al., 2020; HERTEL, 2023). OPN, outro fator estimulado pelo miR-21, é uma molécula ácida que, em co-expressão com a Sialoproteína Óssea (BSP), regula a remodelação óssea. A elevada expressão de OPN e BSP indica processo osteogênico, à medida que a OPN realiza a adesão de osteoclastos à matriz óssea e BSP, uma molécula carregada negativamente, e capaz de promover a aposição óssea pelo isolamento de íons cálcio e conservação de regiões com potencial de formação de cristais de hidroxiapatita, além de ativar os osteoclastos fixados pela OPN (ZAINAL ARIFFIN et al., 2022).

O fator de transcrição MeF2c é promotor de diversas vias orgânicas, dentre elas a ossificação endocondral. Esse marcador é associado com densidade mineral óssea, metabolismo ósseo e na determinação do destino da célula osteogênica. O MeF2c possui genes alvo diretamente envolvidos no metabolismo ósseo, como o gene que codifica a cadeia alfa 1 do colágeno tipo X (Col10a1), marcador clássico de condrócito hipertrófico, presente na placa de crescimento ósseo (MORFIN et al., 2025). Col10a1 produz uma proteína denominada colágeno X, presente na cartilagem, e só é ativado na presença de MeF2c. Sua ativação é essencial para permitir que os

condrócitos atinjam a fase hipertrófica da formação óssea endocondral (ARNOLD et al., 2007).

LI et al. (2013) identificaram a associação entre superexpressão do miR-26a e a otimização da formação óssea e de vasos sanguíneos. Observou-se que o miR-26a atuava na regulação positiva do acoplamento angiogênese-osteogênese, por promover diferenciação osteoblástica e ter como alvo reguladores negativos da angiogênese e osteogênese, tais como o homólogo de fosfatase e tensina (PTEN) e a E-caderina, inibindo-os.

PTEN é antagonista da via de sinalização PI3K/AKT. Essa via é responsável pela regulação de proliferação e diferenciação celular, além de participar de outros processos metabólicos, e possui importância na regulação da homeostase óssea, influenciando tanto a formação quanto a reabsorção óssea. Tal via controla a densidade mineral óssea pela promoção de diferenciação e proliferação osteoblástica. Além disso, a via de sinalização PI3K/AKT atua na formação de novos vasos sanguíneos, regulando diversas etapas cruciais da formação de novas estruturas capilares, como sobrevivência das células endoteliais e migração celular (LI et al., 2013; HADDADI et al., 2018; KANG et al., 2022).

A E-caderina é uma proteína que atua na adesão entre células epiteliais, mediando a fusão de vários tipos celulares, e é expressa pela linhagem monócito/macrófago. Está envolvida na diferenciação osteoclástica, estando expressa em alta concentração durante as fases iniciais da diferenciação celular em osteoclastos. O bloqueio dessa proteína promove redução da concentração de células e fatores fundamentais para a fusão entre células para geração dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. A redução do número de células multinucleadas TRAP⁺ (Fosfatase Ácida Resistente a Tartarato), redução de Catepsina K, proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) e Fator nuclear de células T ativadas (NFATc1) pelo bloqueio da E-caderina, gera redução da formação osteoclástica, ocasionando reabsorção óssea (FIORINO et al., 2016).

Assim como miR-21 e miR-26a, o miR-20a também é um regulador da diferenciação osteoblástica (LI et al., 2013). Ele promove a diferenciação osteogênica por ativar a via de sinalização da proteína morfogenética 2 (BMP2) pela inibição dos fatores SMAD6 e BAMBI (inibidor ligado à membrana da actina), que regulam negativamente a via BMP2. Com isso, miR-20 também foi considerado como bom alvo de estudo para a engenharia de tecido ósseo (PENG et al., 2022).

O miR-27a foi objeto de estudo de YOU e colaboradores (2016), e se mostrou fundamental para a diferenciação das células-tronco mesenquimais na linhagem osteoblástica pela ativação da via de sinalização Wnt. Os autores observaram que a alta expressão deste miRNA favorece a diferenciação osteogênica, ao passo que a redução de sua expressão favorece a diferenciação das MSCs em adipócitos, o que ocorre na osteoporose (YOU et al., 2016).

De maneira análoga, CHEN e colaboradores (2021) identificaram outro miRNA associado à diferenciação osteoblástica das MSCs. Os autores observaram que o miR-142 era capaz de aprimorar a função das células endoteliais da veia umbilical humana e de promover osteogênese. A superexpressão de miR-142 promove redução da expressão do receptor 1 do fator de crescimento transformante beta (TGFB1), que é um receptor de membrana ativado pelo TGF- β (CHEN et al., 2021; WU et al., 2024). A ativação deste receptor promove a fosforilação da proteína SMAD2, o que desencadeia a produção de fatores antiangiogênicos como TSP-1 e o fator solúvel em tirosina quinase - 1 (sFlt1). A otimização/aceleração dos processos de angiogênese e osteogênese pelo miR-142 se dá pela supressão da via de sinalização TGFB1/SMAD2 (CHEN et al., 2021).

Em 2021, GROVEN e colaboradores verificaram o papel do miRNA-29a na reparação óssea, pelo aumento da atividade dos osteoblastos e da repressão da expressão da proteína Ligante do Receptor Ativador do Fator nuclear Kappa B (RANKL) e da quimiocina CXCL12 (ou Fator 1 derivado de células estromais - SDF-1), responsáveis por estímulo da osteoclastogênese, favorecendo a reabsorção óssea. O miR-29a inibe a secreção da proteína RANKL pelos osteoblastos, pela ligação com o terminal não traduzido 3' (3'-UTR) da proteína, e inibe também a expressão de CXCL12, quimiocina que atua promovendo a diferenciação osteoclástica, pela regulação negativa de acetilação do resíduo de lisina na posição N-terminal 27 da proteína histona H3 (H3K27ac) nos promotores CXCL12 (LIAN et al., 2019; WU et al., 2023).

2.5 Tipos de pré-condicionamento para regeneração óssea

Em estudos anteriores, diferentes métodos de pré-condicionamento de MSCs foram aplicados no intuito de otimizar a ação das EVs provindas dessas células em regeneração óssea. Os estudos se basearam em pré-condicionamento por indução química ou por alterações das condições de cultura ou através de modificações genéticas ou com associação entre dois destes métodos (HERTEL, et al., 2022). A

revisão sistemática de 2022, elaborada Hertel e colaboradores, membros da mesma equipe de estudo do presente trabalho, abordou 18 artigos no intuito de analisar os diferentes métodos de pré-condicionamento de MSCs utilizados no intuito de coleta de EVs para aplicação em promoção de osteogênese e/ou angiogênese, fatores ocorrentes na regeneração do tecido ósseo. Dos diferentes métodos observados, todos se mostraram eficientes na otimização do efeito terapêutico das EVs na formação óssea, mas a comparação minuciosa entre eles não foi possível de ser realizada, já que além da variação dos métodos de condicionamento, os estudos tinham variações também quanto ao tipo celular utilizado, concentração de EVs utilizada e suportes (*scaffolds*) associados ao tratamento. Apesar de tal dificuldade, concluiu-se a partir da revisão, que a composição do microambiente de cultivo das MSCs exerce influência direta no efeito terapêutico das EVs liberadas por elas e , portanto, é possível, através de sua modulação, otimizar os efeitos terapêuticos.

Ivanisova e colaboradores, 2023, elaboraram uma revisão para focada em regeneração osteocondral através do uso de meios de cultura condicionados. Neste estudo verificou que a abordagem de MSCs em meio condicionado, e as EVs, provindas das mesmas, para aplicação terapêutica em afecções ósseas in vitro demonstra grande potencial para aplicação in vivo, na rotina clínica. A multiplicação da cultura celular em larga escala sem alterar o conteúdo celular/vesicular, ainda é um desafio, já que os meios do pré-condicionamento da cultura contêm diferentes moléculas. Por isso os meios de cultivo devem ser bem padronizados e adequados à diferentes objetivos conforme a demanda de aplicação. A revisão também destaca que o uso de meio de cultura condicionado permite a modulação das MSCs e também de um de seus “produtos”, as EVs. O uso das EVs permite aplicação direta no local de interesse, redução do risco de baixa sobrevivência celular que pode ocorrer quando forem aplicadas MSCs ao invés de EVs, e aumento da biossegurança (menor chance de imunogenicidade).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Fraturas de ossos longos são as mais frequentes dentre as fraturas encaminhadas para rotina clínica médica e cirúrgica de cães e gatos. Pela escassa cobertura de tecidos moles e vascularização das extremidades distais de ossos longos, essas regiões são predispostas a complicações na consolidação de fraturas, como, a não união óssea. Atualmente existem meios de tratamento destas complicações como enxerto autólogo de osso esponjoso e o uso de PRP, porém, com sucesso ainda insatisfatório.

No estudo intitulado “*Extracellular vesicles from preconditioned mesenchymal stromal cells for bone regeneration*” realizado por HERTEL (2023) observou que EVs provindas de células estromais mesenquimais perivascularres do cordão umbilical canino (cPVMSCs) pré-condicionadas em meio osteogênico apresentaram importantes vantagens em relação às EVs obtidas das mesmas células sem o pré-condicionamento. Entre tais vantagens está a maior quantidade de EVs, importante para obtenção em larga escala em produção para aplicação *in vivo*. O autor ainda ressalta que ambas as EVs, provindas de MSCs pré-condicionadas e não pré-condicionadas, não aumentaram a proliferação celular, mas foram capazes de aumentar a diferenciação celular e mineralização óssea. Ainda, apesar das EVs obtidas de MSCs não pré-condicionadas favorecerem a diferenciação óssea *in vitro*, as EVs pré-condicionadas mostraram, além dessa característica, o aumento da migração celular de novas células osteoprogenitoras, essencial para consolidação do defeito ósseo. Concluiu-se, portanto, que as EVs derivadas de cPVMSCs são ótimas candidatas para aplicação em regeneração de defeitos ósseos.

Assim, considerando que foi demonstrado que ambas as EVs apresentaram aumento na diferenciação celular, que as EVs de cPVMSCs pré-condicionadas apresentaram maior efeito na migração celular, e que miRNAs demonstraram associação com os processos de osteogênese, objetivou-se com o presente trabalho, avaliar a expressão de miRNAs específicos, nas EVs derivadas de cPVMSCs com e sem pré-condicionamento osteogênico, pré-selecionados por conhecida atuação em angio e/ou osteogênese. Assim, buscou-se avaliar a influência do microambiente osteogênico *in vitro* nos miRNAs de EVs. Têm-se, então, os seguintes objetivos específicos:

- Verificar a presença dos miRNAs cfa-miR-21, cfa-miR26a, cfa-miR-27a e cfa-miR-29a, nas EVs derivadas de cPVMSCs;

- Comparar a expressão destes miRNAs nas EVs provindas das MSCs pré-condicionadas em meio osteogênico com os expressos pelas EVs provenientes das células que não passaram por tal condicionamento.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi registrado sob o número de registro 50559482075 e dá continuidade ao projeto de obtenção e caracterização das EVs de cPVMSCs (reg. n. 50559275892/SISPPG/UFV; CEUA/UFV, n. 07/2022) descrito anteriormente. Assim, utilizou as EVs obtidas durante o projeto anterior e, portanto, não envolveu manipulação animal.

4.1 Preparação das Vesículas Extracelulares em Etapas Anteriores

A metodologia de obtenção e a caracterização das EVs de cPVMSCs foram realizadas e descritas anteriormente (HERTEL, 2023). Brevemente, cordões umbilicais provenientes de cesárias terapêuticas de cadelas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (HOV-UFV) foram coletados e seus vasos foram utilizados para o isolamento das cPVMSCs. As células foram cultivadas em meio de proliferação contendo DMEM, soro fetal bovino e solução de antibióticos, até a quarta passagem quando então receberam meio de coleta (meio de proliferação não acrescido de soro fetal bovino) no grupo de cPVMSCs não pré-condicionada (CTRL-EVs: amostras cinco e seis). Este meio foi acrescido de fatores osteogênicos para obtenção das amostras do grupo OSTEO-EVs (amostras um, dois, três e quatro). Em ambos os grupos, as cPVMSCs permaneceram em meio de coleta por 48h antes dos processos para obtenção das EVs. Estes meios passaram então, separadamente, por ciclos de centrifugação, filtração e ultracentrifugação de acordo com Hertel (2023). As vesículas obtidas foram armazenadas a -80°C , divididas em seis amostras, sendo quatro delas de EVs provenientes de cPVMSCs pré-condicionadas em meio osteogênico (OSTEO-EVs), e duas amostras de EVs provenientes das células sem pré-condicionamento (CTRL-EVs). Os detalhes dessa metodologia não foram aqui incluídos devido à solicitação de patente da metodologia de produção das EVs pré-condicionadas.

4.2 Nanotracking Analysis (NTA)

Para o rastreamento de nanopartículas (NTA), utilizou-se o equipamento Nanosight Malvern-NS300 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para o preparo das amostras, utilizaram-se 50 μL de cada uma das amostras em *ependorfs* de 1,5 mL. Para cada uma das amostras, adicionaram-se 950 μL de PBS. Após o preparo, as amostras foram injetadas no equipamento com seringas de 1mL a temperatura ambiente e um total de cinco ciclos de 2 minutos foram

gravados, realizando-se a leitura no aparelho e análise no software analítico NTA 3.1 (Nanosight Ltd.).

4.3 Análise de miRNAs

4.3.1 Seleção de sequências (primers alvo)

Com base em descrições da literatura, foram selecionados seis miRNAs alvo (primers-alvo) com conhecida ação em diferenciação osteoblástica das MSCs (tabela 1). Cfa-U6 foi utilizado como primer endógeno.

Tabela 1 - Sequências dos primers alvo caninos selecionados para análise

miRNA	Sequência
Cfa-miR-20a	5'-TAA AGT GCT TAT AGT GCA GGT AG-3'
Cfa-miR-21	5'-TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG A-3'
Cfa-miR-26a	5'- TTC AAG TAA TCC AGG ATA GGC T-3'
Cfa-miR-27a	5'- TTC ACA GTG GCT AAA TCG GTT A -3'
Cfa-miR-29a	5'- TAG CAC CAT CTG AAA TCG GTT A-3'
Cfa-miR-142	5'- CCC ATAAAG TAG AAA GCA CTA - 3'
Cfa-U6	5'-CGC TTC GGC ACA TAT AC-3'

Metabion international AG

4.3.2 Extração do conteúdo de miRNAs das amostras

A extração dos miRNAs das EVs foi realizada utilizando-se o kit NucleoSpin® miRNA Plasma (Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, 300 µL de cada uma das amostras foram lisados com uso de 90 µL de tampão de lise MLP. O lisado foi então homogeneizado em vórtice por 5 segundos e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Para a purificação do miRNA foram adicionados 30 µL de tampão de precipitação de proteínas MPP ao lisado. A solução foi levada em *ependorf* ao vórtice por 5 segundos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugada por 3 minutos a 11000 g para granulação proteica. Nessa etapa ocorre a separação da solução em duas fases, uma fase inferior

orgânica, na qual estão precipitadas as proteínas e uma fase superior aquosa, que contém o miRNA das amostras. O sobrenadante foi então transferido para um novo microtubo e o precipitado foi descartado. No novo microtubo foram adicionados 400 µL de Isopropanol, com intuito de fornecer condições de ligação apropriadas para todas as moléculas de miRNA, e o mesmo foi levado ao vórtice por mais 5 segundos. A amostra foi então transferida para uma coluna de miRNA NucleoSpin® (membrana de sílica), previamente colocada em um tubo coletor de 2 mL sem tampa, e o conjunto foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. O miRNA total se ligou à membrana. A amostra foi então centrifugada por 30 segundos a 11000 g e descartou-se o líquido filtrado. A coluna passou por sucessivas lavagens com solução tampão, centrifugações e descarte do filtrado para remoção do fenol contido no kit e outros contaminantes. O RNA de alta qualidade foi então eluído, adicionando-se à membrana da coluna um pequeno volume de água livre de RNase (30 µL), seguindo-se incubação, centrifugação, descarte da coluna e armazenamento do líquido filtrado. Foram obtidos 30 µL de miRNA total.

4.3.3 Quantificação do RNA total das amostras

A concentração de RNA total foi determinada pela absorbância no NanoDrop Lite (Thermo Scientific™, Waltham, Estados Unidos). Para isso, 2 µL de cada amostra foram levados ao equipamento para mensuração da concentração e da pureza do RNA presente nas amostras. Os índices avaliados pelo equipamento são A260/A280 (avaliação da pureza) e A260 (quantificação da concentração de RNA na amostra). Valor de A260/A280 entre 1,8 e 2,0 é o ideal, representando amostras com pouca ou nenhuma contaminação por proteínas ou compostos orgânicos.

4.3.4 Confecção do cDNA

4.3.4.1 Poliadenilação

Devido ao pequeno tamanho dos miRNAs, foi necessário alongá-los para fornecer maior estabilidade. Esse alongamento é feito por meio de reação de poliadenilação na região 3'. Na extremidade 5', foi inserido um primer adaptador para transcriptase reversa, formando uma cauda universal (tag de sequência universal) em cada cadeia de cDNA sintetizada.

4.3.4.2 Conversão de miRNA em cDNA

A conversão dos miRNAs em cDNA ou a Síntese do cDNA para cada uma das amostras foi realizada com uso do kit miRNAFirst-StrandcDNASynthesis (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Foram utilizados 80 ng de RNA extraídos por reação.

4.3.4.3 Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)

Para testar as seis amostras para os sete primers (seis primers alvo + primer endógeno U6), foi realizada a preparação de duas placas de 96 poços. Na placa um testaram-se as amostras um, dois e três e a amostra seis foi eleita como controle. Na placa dois a amostra seis também foi utilizada como controle e foram testadas as amostras quatro e cinco.

A montagem das placas foi feita considerando volume final de 25 µL por poço (6,3 µL de cDNA das amostras ou água, nos poços NTC, e 18,7 µL de mistura de reagentes: primer universal, Master Mix, CXR, primer alvo e água livre de RNase).

O protocolo da RTq-PCR utilizado foi o sistema GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation). O equipamento foi programado para aquecimento até 95°C por 2 minutos, na ativação da polimerase. Realizaram-se 60 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos), anelamento e amplificação (60°C por 1 minuto).

Utilizou-se o equipamento Applied Biosystems QuantStudio 5 - Real Time PCR System (Thermo Fischer™) para realização da PCR, com a detecção da fluorescência ao final de cada fase de extensão. O método $\Delta\Delta C_t$ foi aplicado para quantificação relativa. Para descartar a presença de contaminações por produtos inespecíficos da PCR, como dímeros de primers, foi realizada a análise da curva de dissociação de todos os produtos ao final da reação. O controle endógeno utilizado foi U6 para correlação e quantificação relativa da expressão dos miRNAs alvo (Cfa-miR-20a, Cfa-miR-21, Cfa-miR-26a, Cfa-miR-27a, Cfa-miR-29a e Cfa-miR-142). Tanto o primer universal, fornecido no Kit miRNA First-Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific), quanto os primers-alvo foram utilizados na concentração original do primeiro, 3.125 µM.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 NTA

A análise de rastreamento de nanopartículas foi realizada e somada a outras duas técnicas para caracterização das EVs, o Western Blotting (WB) e a Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electron Microscopy* -TEM), realizadas em projeto anterior. O NTA é uma avaliação essencial para analisar a concentração de partículas por mL e o tamanho (nm) das vesículas (gráfico 1), observando-se que em ambos os grupos a maior parte das vesículas apresentaram o tamanho esperado para sua caracterização (200 nm), apesar de mostrarem-se heterogêneas em tamanho.

Aqui, o NTA foi utilizado primordialmente para quantificação e verificação de padrão, que demonstrou os seguintes resultados. As modas do tamanho das vesículas das amostras OSTEO-EVs foram de $185,3 \pm 7,8$; $198,5 \pm 9,9$; $188,0 \pm 11,4$ e $205,6 \pm 17,6$ nm, enquanto que as modas em relação ao tamanho para as amostras CTRL-EVs foram de $234,3 \pm 27,6$ e $246,8 \pm 58,4$ nm. A NTA determinou a concentração das EVs nas amostras (partículas/mL) sendo: $1,47 \times 10^9 \pm 2,65 \times 10^8$; $4,70 \times 10^9 \pm 1,62 \times 10^8$; $1,44 \times 10^9 \pm 1,94 \times 10^8$ e $1,83 \times 10^9 \pm 1,76 \times 10^8$ para as amostras OSTEO-EVs e $5,71 \times 10^8 \pm 1,08 \times 10^8$ e $8,34 \times 10^8 \pm 1,66 \times 10^8$ para as amostras CTRL-EVs.

Tais resultados estão de acordo com HERTEL (2023) que avaliou que o pré-condicionamento das células em meio osteogênico proporcionou maior rendimento de EVs, verificado pelo maior número de partículas por mL do que no grupo sem pré-condicionamento. WANG e colaboradores (2018) também observaram aumento do rendimento de EVs em grupo proveniente de células com indução osteogênica. De forma semelhante também quanto à morfologia, tendo as OSTEO-EVs se mostrado menores do que nas amostras CTRL-EVs. Tal fato provavelmente se relaciona à origem das EVs, por serem provenientes de células-tronco condicionadas em um meio com fatores osteogênicos, proporcionando proliferação e maturação (processo de formação estrutural e funcional das EVs) mais rápida do que as vesículas das células não estimuladas, que chegaram à tamanhos maiores, mas em menor quantidade. SHEKARI e colaboradores (2023) defendem que se padronize um meio de cultura celular para obtenção de EVs destinadas à terapia celular, diferente do meio de cultura utilizado para pesquisas básicas de EVs, exatamente pelo fato do meio de cultivo atuar diretamente na liberação e composição bioquímica das EVs, portanto, também agindo na função a ser desempenhada por essas estruturas.

A diferença entre o tamanho das vesículas talvez possa estar relacionada ao estresse celular gerado pela falta do soro fetal bovino no meio de coleta durante 48 h, como também discutido por LEHRICH et al. (2021). O soro fetal bovino (SFB) começou a ser utilizado nas culturas celulares em 1958 como estimulador de crescimento celular (URZÌ et al., 2022). Ele contém aminoácidos, proteínas, vitaminas, fatores de crescimento, sais, dentre outras substâncias que são essenciais para a fixação e manutenção das células cultivadas e estabilidade do meio de cultivo (CHELLADURAI et al., 2021). Interessantemente, LEHRICH, et al. (2021) relatam que 83% dos membros da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) fazem o uso de meio de cultura condicionado como material de partida, sendo que mais da metade destes utilizam meios contendo Soro Fetal Bovino como aditivo em sua composição para estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. URZÌ et al. (2022) pontua que, ao mesmo tempo que a proliferação celular de MSCs da medula óssea de humanos é diretamente proporcional à concentração de soro fetal bovino no meio, a produção de fatores como interleucina 10 e indoleamina 2,3-dioxygenase 1 pelas MSCs tem ótima produção com porcentagem de 7 a 10 % de soro no meio de cultivo. Porcentagens maiores acabam por reduzir a produção destes. Com isso é de grande importância que o meio de cultivo seja preparado com concentrações adequadas de aditivos, coerentes com a viabilidade da cultura celular envolvida no presente estudo.

Apesar de comumente ser utilizado e das referidas vantagens do uso do SFB, por ser um componente animal, tem composição não padronizada e varia de forma importante entre lotes. A revisão de URZÌ e colaboradores (2022) ressalta a influência do lote no perfil do SFB, pela comparação entre três lotes de diferentes fabricantes na ação em cultura de células epiteliais pigmentadas adultas da retina. O crescimento da cultura celular promovido e o perfil proteômico sérico foram distintos entre as culturas que receberam cada lote. Pedraza e colaboradores (2007) verificaram a presença de cristais de oxalato de cálcio em alguns lotes de soro e avaliaram que presença destes alterava a adesão celular. Além da variação de fabricante do lote, a variação da qualidade e do momento de coleta do soro também altera a cultura celular. Já Barasova et al. (2021) observaram alteração de crescimento, viabilidade e morfologia celular em cultivos com soros de lotes obtidos em estações distintas. Tal variação nos lotes de SFB e sua influência na atividade celular *in vitro* é conhecida já a algum tempo, tendo Marazzi et al. (2011) relatado a presença residual de endocanabinóides como a Araquidonoiletanolamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), além de N-

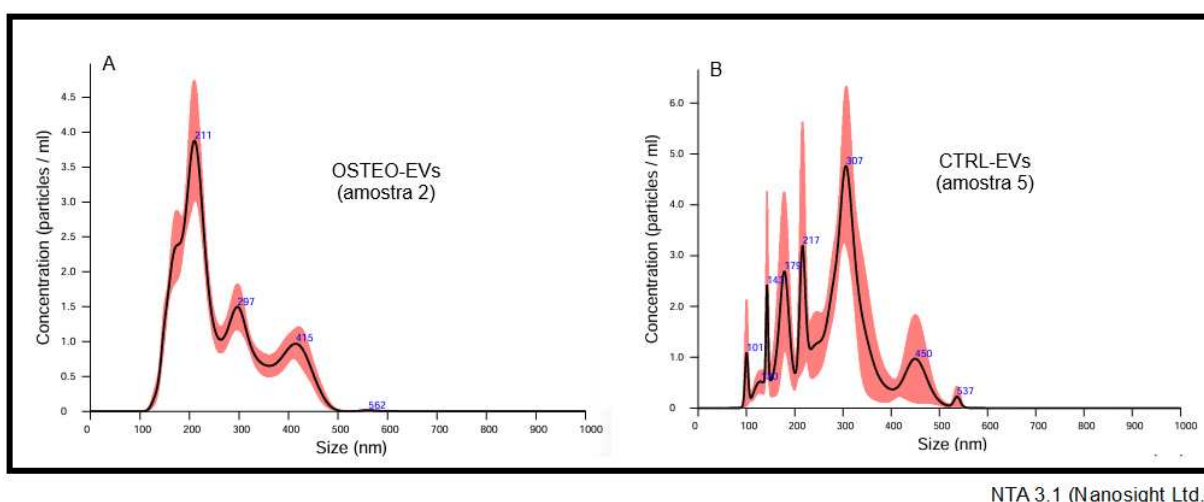
etanolaminas em lotes de SFB de diferentes fabricantes. Estes compostos atuaram em receptores de células do sistema imune como monócitos e macrófagos, interferindo em diversas vias de sinalização e, consequentemente, no comportamento celular, afetando diretamente o resultado final dos testes realizados.

Além disso, o SFB pode conter EVs provenientes do próprio soro, que apresentam propriedades diferentes das EVs de interesse e que podem ser confundidas com estas por possuírem tamanho, densidade e/ou componentes de RNA semelhantes. Isso pode proporcionar maior heterogeneidade na população de vesículas e gerar resultados equivocados em análise de EVs. Apesar de poderem conter fatores contaminantes e serem confundidos com as EVs de interesse do estudo, pesquisas têm sugerido que as EVs próprias do SFB têm papel importante no crescimento e na viabilidade celular, com mecanismo ainda pouco estudado (LEHRICH et al., 2021). Sendo assim, THÉRY e colaboradores (2006) propuseram alternativas, dentre elas, a realização de um protocolo para depleção das EVs séricas do SFB, incluindo a diluição do meio com soro fetal bovino e a realização de ultracentrifugação em alta velocidade. Apesar disto, o processo não é capaz de tornar o meio equivalente ao meio livre de SFB e, além disso, os processos de depleção de vesículas provenientes do SFB são baseados em densidade e tamanho de partículas podendo ocorrer a retirada de partículas diferentes das EVs séricas. Adicionalmente, o uso destes protocolos de depleção tem mostrado variação muito grande de resposta celular nos meios de cultura entre os diversos estudos (LEHRICH et al., 2021). Shelke et al. (2014), por exemplo, verificaram que, em comparação com o meio de cultivo sem depleção das EVs do SFB, no meio com a depleção, ocorreu prejuízo na migração celular, e Angelini et al. (2016) observaram que o processo de ultracentrifugação ocasionou redução no diâmetro das células. Por fim, outra desvantagem da utilização do SFB também relacionada à procedência animal e à não padronização no processo de obtenção do soro, é a maior possibilidade de variabilidade do produto final e do mesmo conter proteínas e outros fatores imunogênicos, os quais, em aplicação clínica, têm alto potencial de xenoimunização e de possibilidade de transmissão indesejada de agentes zoonóticos (LEHRICH et al., 2021). Com desvantagens tão importantes para a aplicação final das EVs, optou-se por utilizar no presente projeto a metodologia de meio de coleta sem SFB.

Apesar disso, a ausência do SFB em meios de cultivo celular é um fator muito discutido pois sua ausência também traz importantes pontos negativos. Diante

desses fatores prós e contras do uso do SFB, pesquisadores de EVs estudaram, *in vitro*, o uso de meios livres de SFB para isolamento das EVs provenientes das células em cultivo. Observou-se que a troca do meio que requer o uso do SFB por meio livre de soro no momento de confluência celular recomendado para obtenção das EVs ocasionou estresse, autofagia celular, alterações no fenótipo celular e no conteúdo das EVs liberadas, e consequentemente de seus efeitos nas células alvo (LEHRICH et al., 2021). A privação de SFB é associada à morte celular em MSCs, além de gerar alteração no número e em fatores estruturais das EVs liberadas pelas células cultivadas, como conteúdo e tamanho (ZHU et al., 2006; POTIER et al., 2007; SUN et al., 2014; GUDBERGSSON et al., 2016;). Apesar desses fatores, a opção pela ausência do SFB no meio de coleta foi realizada na metodologia do presente projeto tendo como base: (i) os resultados *in vitro*, que demonstraram efeito das EVs na migração e na diferenciação osteogênica e (ii) considerando sua utilização terapêutica, obter um produto com menor probabilidade de ação imunogênica. Apesar da ausência do SFB no meio de cultivo, as vesículas foram mantidas no mesmo por tempo curto, apenas 48 h. Com isso, embora tenha ocorrido heterogeneidade de tamanho entre as EVs, provavelmente por estresse celular, a capacidade carreadora de fatores dessas estruturas ainda foi observada, visto que, *in vitro*, tanto as CTRL-EVs quanto as OSTEO-EVs se mostraram eficientes na diferenciação osteogênica.

Gráfico 1 - Curvas de concentração por tamanho das EVs



Nota: O gráfico A corresponde aos grupos de EVs de MSCs pré-condicionadas com fatores osteogênicos (OSTEO-EVs). O gráfico B corresponde aos grupos de EVs de MSCs sem pré-condicionamento (CTRL-EVs). A amostra 2 ($198,5 \pm 9,9$ nm; $4,70 \times 10^9 \pm 1,62 \times 10^8$ partículas/mL) foi utilizada para exemplificar o grupo OSTEO e a amostra 5 ($234,3 \pm 27,6$ nm; $5,71 \times 10^8 \pm 1,08 \times 10^8$ partículas/mL) foi utilizada para exemplificar o grupo CTRL.

5.2 RT-qPCR

Previamente, a avaliação das amostras por NANODROP demonstrou a quantidade de miRNA presente nas amostras analisadas, dado que foi utilizado para a realização dos procedimentos seguintes (tabela 2).

Tabela 2: Quantificação da concentração de RNA nas amostras de EVs providas de MSCs de cordões umbilicais caninos (A260) e avaliação da pureza (A260/A280) pelo NANODROP.

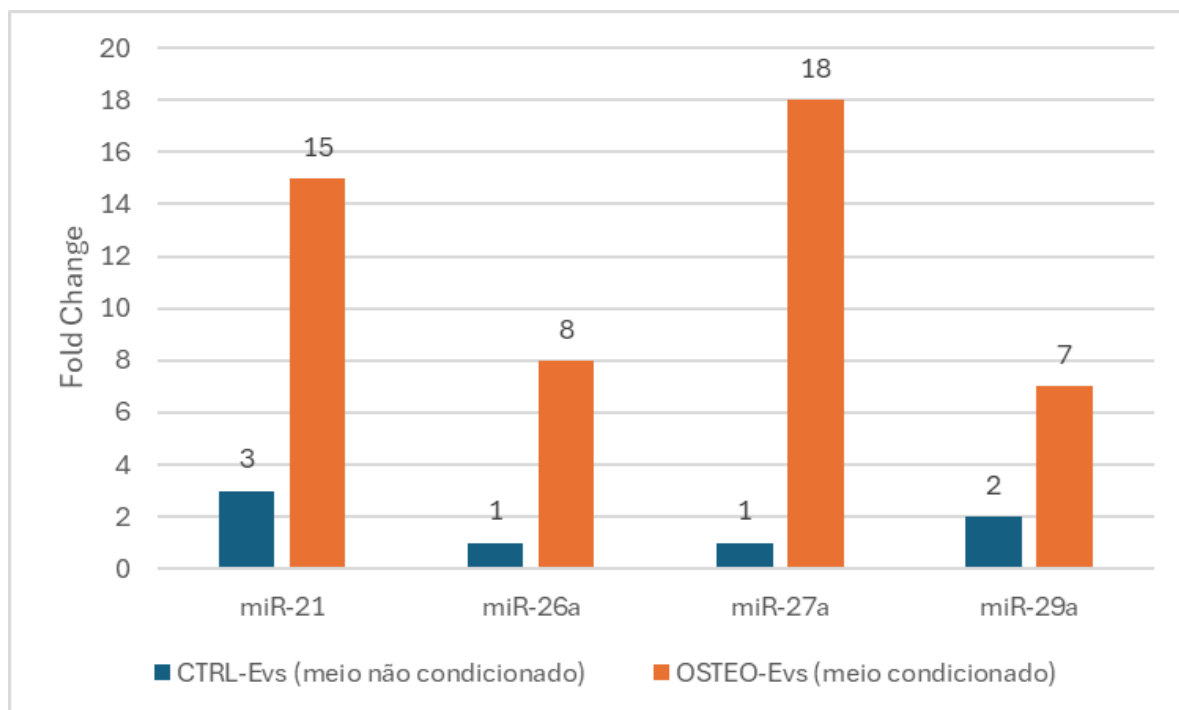
Amostra	miRNA (ng/μL)	A260/A280
1	6,2	1.71
2	5,9	1,76
3	20,7	1,44
4	6,7	1,65
5	9,3	1,53
6	6,0	1,73

Elaborada pela autora.

Após o tratamento dos dados obtidos a partir de PCR quantitativa em tempo real, a expressão gênica dos miRNAs de interesse no grupo tratado (OSTEO-EVs) em relação ao controle (CTRL-EVs) foi avaliada. Os miRNAs Cfa-miR-20 e Cfa-miR-142 foram excluídos dos resultados devido à reprodutibilidade insuficiente dos dados e sua análise será realizada em projetos futuros.

Observou-se que os quatro miRNAs avaliados apresentarem-se mais expressos no grupo OSTEO-EVs do que no controle (CTRL-EVs) (gráfico 2).

Gráfico 2 - Avaliação da expressão gênica nos grupos controle (não condicionado) e tratado (condicionado)



Elaborado pela autora

Legenda: O eixo horizontal faz referência aos miRNAs analisados nas amostras e o eixo vertical se refere à expressão gênica relativa ("fold change") do gene alvo entre grupo de EVs provindo de MSCs com pré-condicionamento osteogênico e grupo de Evs provindas de MSCs sem pré condicionamento.

Os quatro miRNAs avaliados, como relatado anteriormente, têm ação na promoção da regeneração óssea por meio da interação com diversas vias de sinalização, e, como esperado, o meio osteogênico promoveu o aumento da expressão destes miRNAs nas EVs das cPVMSCs. O miR-27a mostrou expressão mais de 18 vezes maior no grupo das OSTEO-EVs, sendo o gene que se apresentou mais expresso na amostra tratada, dentre os quatro genes alvo. Em seguida o miR-26a mostrou-se oito vezes mais expresso nas OSTEO-EVs do que nas CTRL-EVs, o miR-21, cinco vezes mais expresso e miR-29a, 3,5 vezes mais expresso.

A diferença de expressão gênica dos miRNAs relacionados com a regeneração óssea e vascular entre os grupos sugere que o microambiente no meio de cultivo pré-condicionado atua sobre as MSCs, que respondem com o aumento da atividade efetora. Tal observação está de acordo com o relatado por HERTEL et al. (2022), de que as células apresentam diferentes respostas de acordo com o microambiente em que se encontram. Com isso possibilita-se a modulação de conteúdo e ação das EVs liberadas por essas células.

A alteração do microambiente de cultivo exerce influência sobre o metabolismo das células, observada no presente trabalho pela diferente expressão dos miRNAs alvo nas OSTEO-EVs, e no estudo anterior (HERTEL, 2023), quando se observou que as OSTEO-EVs tiveram maior ação na migração celular *in vitro*. De forma semelhante, WEI et al. (2019) observaram que vesículas provenientes de células com indução osteogênica apresentavam efeito pró osteogênico.

A interação entre microambiente e MSCs é uma via de mão dupla. Ambos influenciam um ao outro. Assim, quando as MSCs foram colocadas *in vitro* em meio osteogênico (SARUGASER et al., 2005), estas MSCs foram estimuladas a produzir EVs contendo fatores pró-osteogênicos, algo que ocorre *in vivo* e que “propaga” a cascata de regeneração por meio da comunicação intercelular contribuindo para manutenção do microambiente favorável à proliferação óssea.

Tais resultados podem ser relacionados com estudos prévios realizados por Al-Sharabi e colaboradores (2024) que consideraram dois grupos de vesículas extracelulares, Naive-EVs (derivadas de MSCs da medula óssea humana indiferenciadas) e Osteo-EVs (derivadas de MSCs da medula óssea humana durante estágio inicial da osteogênese), e realizaram sua aplicação em defeito ósseo de tamanho crítico no crânio de ratos. Observou-se diferença significativa entre os grupos em relação ao perfil proteico constituinte e em relação às funções exercidas pelas EVs *in vitro* e *in vivo*. *In vitro* foi observado aumento da proliferação e migração celular em ambos os grupos, porém, o grupo Osteo-EVs apresentou aumento da diferenciação osteogênica, percebido pela superexpressão dos genes SPP1 (codificador da proteína osteopontina), BSP e BGLAP (codificador da proteína osteocalcina), relacionados à diferenciação e maturação osteogênica, e de maior deposição de cálcio. *In vivo*, o grupo Osteo-EVs apresentou maior regeneração óssea e formação de tecido ósseo morfológicamente mais consistente. Assim, as vesículas provenientes de células em início de diferenciação osteogênica apresentaram um perfil proteico mais propício à promoção da osteogênese demonstrando a influência do microambiente no conteúdo proteico das EVs. De forma semelhante, o presente estudo demonstrou tal influência do microambiente no conteúdo das EVs, agora no perfil de quatro miRNAs, com influência semelhante na migração e diferenciação osteogênica *in vitro* (HERTEL, 2023).

É importante lembrar do potencial *in vivo* que pode ser exercido pelos miRNAs pela internalização das EVs que os contêm. Após serem liberadas pela célula fonte,

as EVs aderem à matriz extracelular e às células vizinhas ou são carreadas pelo sangue, linfa e outras vias humorais para órgãos mais distantes da origem. A partir daí, as vesículas exercem mediação de vias de sinalização celulares por interação entre receptores de membrana, transferindo informações celulares para as células alvo por contato direto com ligantes da superfície celular, ou por internalização da EV pela célula alvo, pela fusão das membranas de ambas e liberação do conteúdo da vesícula (proteínas, ácidos nucleicos, DNA, miRNAs) no interior da célula alvo. Uma vez dentro da célula as EVs se acumulam nos lisossomos e escapam da degradação que normalmente é por eles realizada. Com isso, após a internalização, as EVs conseguem atuar na função da célula receptora por meio de seu conteúdo carreado para o interior celular (FANG et al., 2024). Nesse sentido, as EVs estudadas no presente trabalho foram internalizadas por MSCs, como demonstrado por HERTEL (2023) por microscopia confocal e de fluorescência.

Os miRNAs vêm sendo estudados quanto à sua ação moduladora de diversas vias de sinalização, por meio da ligação em sequências específicas de mRNAs, bloqueando a tradução proteica e alterando expressão gênica de diversos fatores. Cada miRNA interfere em algum processo de tradução que acaba por aumentar ou reduzir a ocorrência de determinada via metabólica, como as diversas vias envolvidas na homeostase óssea (LIAN et al., 2012). Por esse motivo, buscou-se estudar os miRNAs nas EVs pré-condicionadas, objetivando adicionar mais informações na cascata de eventos da regeneração óssea promovida pelas EVs de MSCs.

No presente estudo detectou-se a presença de cfa-miR-21, cfa-miR-26a, cfa-miR-27a e cfa-miR-29a em ambos os grupos, mas com maior expressão no grupo proveniente de células com pré-condicionamento osteogênico.

O mir-27a que, dentre os miRNAs, apresentou a maior expressão relativa, é conhecido por promover ativação da via de sinalização Wnt. As proteínas Wnt atuam na organização estrutural dos tecidos durante a embriogênese e exercem função de manutenção da homeostase em tecidos maduros, por meio de três possíveis mecanismos de sinalização. Dois destes mecanismos, a via canônica Wnt/ β -catenina e a via não canônica Wnt/ Ca^{2+} , estão ligados à maturação das células osteoblásticas e à promoção da formação de tecido ósseo (ABUNÁ, 2019). A ativação da via de sinalização Wnt favorece o fenômeno de diferenciação celular osteogênica. Tal informação está de acordo com a observação de aumento da diferenciação celular na avaliação *in vitro* da aplicação das EVs provenientes das cPVMCSs pré-

condicionadas em ambiente com fatores promotores de formação óssea, avaliada no projeto anterior (HERTEL, 2023).

Os osteoblastos, produzem proteínas de matriz óssea, sendo o colágeno tipo 1 (COL1A) a proteína mais abundante no meio extracelular e responsável pela mineralização óssea. A diferenciação osteoblástica pode ser detectada pela produção de diversas proteínas da matriz extracelular tais como: COL1A, Osteocalcina (OCN), OPN e a Sialoproteína óssea (BSP), além de ser concomitante com o crescimento da atividade da enzima ALP. OPN e ALP são fatores estimulados pelo miRNA-21, por exemplo (TOBEIHA et al., 2020; ZAINAL ARIFFIN et al., 2022), que se mostrou mais expresso nas OSTEO-EVs.

Os miRNAs miR-21 e miR-26a, também presentes em maior quantidade no grupo OSTEO-EVs, assim como o miR-27a, atuam no estímulo da diferenciação osteogênica das células mesenquimais. O primeiro estimula os fatores pró-osteogênicos ALP, Runx2, OPN, OSX e MeF2c, promovendo a diferenciação celular em osteoblastos e mineralização óssea. O segundo inibe o gene homólogo de fosfatase e tensina (PTEN) e a E-caderina, reguladores negativos da angiogênese e osteogênese, favorecendo com isso a diferenciação osteoblástica e angiogênese (LI et al., 2013).

O miR-29a também apresentou maior expressão relativa no grupo pré-condicionado do que no controle. A ação deste miRNA, embora não seja diretamente na diferenciação osteoblástica, atua a favor da formação óssea, na medida que suprime a expressão dos fatores RANKL e Quimiocina CXCL12, fatores fundamentais para a formação dos osteoclastos e reabsorção óssea (LIAN et al., 2019; WU et al., 2023). A presença de RANKL, produzido por osteoblastos, permite a sobrevivência das células de reabsorção óssea, os osteoclastos, pela ligação deste com o receptor RANK (Receptor ativador do fator nuclear kappa B) localizado na superfície de precursores dos osteoclastos. Já a osteoprotegerina (OPG), também uma substância produzida pelos osteoblastos, entra na via RANK/RANKL/OPG se ligando ao RANKL e inviabilizando sua interação com o receptor RANK, reduzindo, portanto, o processo de osteoclastogênese. Neste contexto, observa-se que a coordenação entre a atividade osteoblástica e osteoclástica regula o metabolismo ósseo (TOBEIHA et al., 2020; ZAINAL ARIFFIN et al., 2022), e os miRNAs podem estimular a diferenciação e mineralização óssea ou favorecendo a formação ou inibindo a reabsorção óssea pela interferência em diversas vias de sinalização. Essa coordenação entre osteoblastos e

osteoclastos é muito importante *in vivo* e o conhecimento da atuação dos miRNAs na interação entre essas células é promissor para futura aplicação das EVs *in vivo*, transportando estas moléculas e otimizando a regeneração óssea.

Assim, sugere-se que o pré-condicionamento contribuiu para maior atividade pró-osteogênica das EVs, diretamente relacionado ao efeito na migração celular observada *in vitro*. Desta forma, acredita-se que a utilização terapêutica das EVs pré-condicionadas em meio osteogênico poderá refletir de forma importante no seu uso terapêutico.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, concluiu-se que os miRNAs miR-27a, miR-26a, miR-21 e miR-29a estão presentes nas vesículas extracelulares (EVs) de MSCs do cordão umbilical canino (cPVMSCs); os miRNAs se mostram mais expressos nas EVs de cPVMSCs quando estas são pré-condicionadas em meio osteogênico por 48 h. Sendo assim, sugere-se o potencial promissor do uso das EVs provindas de MSCs pré-condicionadas para aplicação na regeneração óssea.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUNÁ, Rodrigo Paolo Flores. **Participação das Vias de Sinalização Wnt no Potencial Osteogênico de Superfície de Titânio com Nanotopografia**. 2019. 107 p. Tese (Doutor em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

AL-SHARABI, Niyaz; MOHAMED-AHMED, Samih; SHANBHAG, Siddharth; KAMPLEITNER, Carina; ELNOUR, Rammah; YAMADA, Shuntaro; RANA, Neha; BIRKELAND, Even; TANGI, Stefan; GRUBER, Reinhard; MUSTAFA, Kamal. Osteogenic human MSC derived extracellular vesicles regulate MSC activity and osteogenic differentiation and promote bone regeneration in a rat calvarial defect model. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 33, n. 15, p. 1-21, 2024. DOI <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03639-x>. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-024-03639-x>. Acesso em: 19 jun. 2025.

ANGELINI, Francesco; IONTA, Vittoria; ROSSI, Fabrizio; MIRALDI, Fabio; MESSINA, Elisa; GIACOMELLO, Alessandro. Foetal bovine serum-derived exosomes affect yield and phenotype of human cardiac progenitor cell culture. **Bioimpacts**, v. 6, n. 1, p. 15-24. 2016. <http://dx.doi.org/10.15171/bi.2016.03>.

ARNOLD, Michael A.; KIM, Yuri; CZUBRYT, Michael P.; PHAN, Dillon; MCANALLY, John; QI, Xiaoxia; SHELTON, John M.; RICHARDSON, James A.; BASSEL-DUBY, Rhonda; OLSON, Eric N. MEF2C Transcription Factor Controls Chondrocyte Hypertrophy and Bone Development. **Cell press: Developmental Cell**, v. 12, p. 377-389. 2007. DOI 10.1016/j.devcel.2007.02.004.

BACALBASA, Nicolae; BALESCU, Irina; STOICA, Claudia; POP, Lucian; VARLAS, Valentin; MARTAC, Cristina; VOICHITOU, Andrei; MASSAWI, Tariq. Autologous grafts for vascular resections after extended resections for locally advanced or borderline resectable pancreatic tumors. **Romanian Journal of Medical Practice**, v. 88, n. 2, p. 76-79. 2022. DOI: 10.37897/RJMP.2022.2.6.

BARBOSA, Anna Laetícia Trindade; CARLO, Ricardo Junqueira Del; GOMES, Hayala Castro; OLIVEIRA, Aécio Carlos de; MONTEIRO, Betania Souza; CARLO, Brunna Nadur Del. Platelet-rich plasma for canine bone restoration. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1335-1340. 2008.

BAROSOVA, Hana; MELDRUM, Kirsty; KARAKOÇAK, Bedia Begum; BALOG, Sandor; DOAK, Shareen H.; PETRI-FINK, Alke; CLIFT, Martin J.D.; ROTHEN-RUTISHAUSER, Barbara. Inter-laboratory variability of A549 epithelial cells grown under submerged and air-liquid interface conditions. **Toxicology In Vitro**, v. 75, p. 1-10. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105178>.

BATATINHA, Rafael; BARAÚNA JÚNIOR, Durval; SANTOS, Cássia Regina; COSTA, Sérgio Diego; CORREIA, Patrícia; MOREIRA, Pâmela Raiele. Prevalência de fraturas em cães e gatos atendidos em projeto de extensão da clínica cirúrgica na Cidade de Petrolina/PE – 2016 a 2018. **Research, Society And Development**, v. 10, n. 6, p. 1-

9, 27 maio 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15480>.

CHELLADURAI, Karthikeyan Subbiahanadar; CHRISTYRAJ, Jackson Durairaj Selvan; RAJAGOPALAN, Kamarajan; YESUDHASON, Beryl Vedha; VENKATACHALAM, Saravanakumar; MOHAN, Manikandan; VASANTHA, Niranjana Chellathurai; CHRISTYRAJ, Johnson Retnaraj Samuel Selvan. Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. **Heliyon**, n. 7, p. 1-9. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07686>. Disponível em: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>. Acesso em: 2 jun. 2025.

CHEN, Lang; XIONG, Yuan; HU, Yiqiang; YU, Chenyan; PANAYI, Adriana C.; ZHOU, Wu; CAO, Faqi; SUN, Yun; LIU, Mengfei; LIU, Guodong; XUE, Hang; HU, Liangcong; MI, Bobin; LIU, Guohui. Regulatory T cell-exosomal miR-142-3p promotes angiogenesis and osteogenesis via TGFBR1/SMAD2 inhibition to accelerate fracture repair. **Chemical Engineering Journal**, v. 427, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131419>. Disponível em: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>. Acesso em: 7 maio 2025.

DIAS, Maria Isabel Ribeiro.; De SOUZA, Cristina Maria Peixoto; De CARVALHO, Pedro Miguel Pires; LEMPEK, Marthin Rabock; VIEGAS, Carlos Alberto Antunes; De AZEVEDO, Jorge Manuel Teixeira. Bone grafts and substitutes in small animal orthopaedic reconstructive surgery. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 4, p. 339-350. 2013.

ELSHARKASY, Omnia M.; NORDIN, Joel Z.; HAGEY, Daniel W.; JONG, Olivier G.; SCHIFFELERS, Raymond M.; ANDALOUSSI, Samir, El.; VADER, Pieter. Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how?. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.04.004>.

FANG, Fel; YANG, Jie; WANG, Jiahe; LI, Tiantian; WANG, Erxiang; ZHANG, Demao; LIU, Xiaoheng; ZHOU, Cehnchen. The role and applications of extracellular vesicles in osteoporosis. **Springer Nature: Bone Research**, v. 4, n. 12, p. 1-16. 2024. DOI <https://doi.org/10.1038/s41413-023-00313-5>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41413-023-00313-5>. Acesso em: 19 jun. 2025.

FELTRI, Pietro; SOLARO, Luca; MARTINO, Alessandro di; CANDRIAN, Christian; ERRANI, Costantino; FILARDO, Giuseppe. Union, complication, reintervention and failure rates of surgical techniques for large diaphyseal defects: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 3-14, 1 jun. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-12140-5>.

FERNANDES, Danieli Perez; LEITE, Daniela de Alcântara da Silva; MIYAUCHI, Tatimara Mara. Tratamento cirúrgico de união retardada e não-união de fraturas em cães: revisão. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 26. 2008.

FIORINO, Cara; HARRISON, Rene E. E-cadherin is important for cell differentiation during osteoclastogenesis. **Bone**, n. 86, p. 106-118. 2016. DOI

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2016.03.004>. Disponível em: www.elsevier.com/locate/bone. Acesso em: 24 jun. 2025.

GARCÍA-GONZÁLEZ, Mario; GUZÓN, Fernando María Muñoz; GONZÁLEZ-CANTALAPIEDRA, Antonio; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Pío Manuel; PÉREZ, Rafael Otero; RODRÍGUEZ, Julia Asunción Serra. Application of Shark Teeth–Derived Bioapatites as a Bone Substitute in Veterinary Orthopedics. Preliminary Clinical Trial in Dogs and Cats. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.574017>. Accessed 6 June 2022.

GÓMEZ-BARRENA, Enrique; ROSSET, Philippe; LOZANO, Daniel; STANOVICI, Julien; ERMTHALLER, Christian; GERBHARD, Florian. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. **Bone**, n. 70, p. 93-101. 2015. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.033>. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/bone>. Acesso em: 2 jul. 2025.

GROVEN, Rald V. M.; KOLL, Johan van; POEZE, Martijn; BLOKHUIS, Taco J.; GRIESVEN, Martijn van. MiRNAs Related to Different Processes of Fracture Healing: An Integrated Overview. **Frontiers in Surgery**, v. 8. 2021. DOI <https://doi.org/10.3389/fsurg.2021.786564>. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 7 maio 2025.

GUDBERGSSON, Johann Mar; JOHNSEN, Kasper Bendix; SKOV, Martin Najbjerg; DUROUX, Meg. Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 579-592. 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-015-9913-6>.

HADDADI, Nahal; LIN, Yiguang; TRAVIS, Glena; SIMPSON, Ann M.; NASSIF, Najah T.; MCGOWAN, Eileen M. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy. **Molecular Cancer**, v. 37, n. 17, p. 1-14. 2018. DOI <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0803-3>.

HAN, Dong; LIU, Weiwei; GONG, Jinpeng; MA, Yupeng; SUN, Zhengwen. Challenges and future perspectives in using mesenchymal stem cells for efficient bone fracture healing. **Frontiers: in Bioengineering and Biotechnology**, v. 13. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1568914>.

HERTEL, Fernanda Campos. Extracellular vesicles from preconditioned mesenchymal stromal cells for bone regeneration. 2023. 99 p. Thesis (Doctor Scientiae in Veterinary Medicine) – Universidade Federal de Viçosa, 2023.

HERTEL, Fernanda Campos; SILVA, Aline Silvestrine da; SABINO, Adriano de Paula; VALENTE, Fabrício Luciani; REIS, Emily Correna Carlo. Preconditioning Methods to Improve Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in Bone Regeneration - A Systematic Review. **Biology**, v. 11, p. 733. 2022. <https://doi.org/10.3390/biology11050733>

IRFAN, Daniyal; AHMAD, Irfan; PATRA, Indrajit; MARGIANA, Ria; RASULOVA, Mokhidil Tursunalievna; SIVARAMAN, R.; KANDEEL, Mahmoud; MOHAMMAD, Hawraa Jabbar; AL-QAIM, Zahraa Haleem; JAWAD, Mohammed Abed; MUSTAFA,

Yasser Fakri; ANSARI, Mohammad Javed. Stem cell-derived exosomes in bone healing: focusing on their role in angiogenesis. **Cytotherapy**, v. 25, p. 353-361. 2022.

IVANISOVA, Dana; BOHAC, Martin; CULENOVA, Martina; SMOLINSKA, Veronika; DANISOVIC, Lubos. Mesenchymal-Stromal Cell-Conditioned Media and Their Implication for Osteochondral Regeneration. **Int. J. Mol. Sci.** 2023, 24, 9054. <https://doi.org/10.3390/ijms24109054>.

JORGE, Ariany Lima; PEREIRA, Erik Ribeiro; OLIVEIRA, Christian Sousa de; FERREIRA, Eduardo dos Santos; MENON, Edmara Toledo Ninzoli; DINIZ, Susana Nogueira; PEZUK, Julia Alejandra. MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. **Einstein**, 2021; 19. 1-7. DOI: 10.31744/einstein_journal/2021RB5996.

KALLIANPUR, Nitish; SINGH, Kiranjeet; GOPINATHAN, Aswathy; SARANGOM, Sherin B.; JOHN, Christina; SOWBHARENYA, Chelladuraai; SHARMA, Pallvi. (2018). Investigation on Relation between Factors Affecting Occurrence and Outcome of Repair of Long Bone Fractures in 216 Dogs. **International Journal of Livestock Research**, 2018, 8(2), 225-234. <http://dx.doi.org/10.5455/ijlr.20170823024229>

KANG, Wen-qian; WEI, Pei-feng; OU, Li; LI, Min; LIU, Chun-yu. The mechanism study of inhibition effect of prepared Radix Rehmanniainon combined with Radix Astragali osteoporosis through PI3K-AKT signaling pathway. **Acta Cirúrgica Brasileira: Experimental Surgery**, v. 37, p. 1-9. 2022. DOI <https://doi.org/10.1590/acb371101>.

KANG, Byung-Jae; RYU, Hak-Hyun; PARK, Sungsu; KIM, Yongsun; KWEON, Oh-Kyeong; HAYASHI, Kei. Clinical evaluation of a mini locking plate system for fracture repair of the radius and ulna in miniature breed dogs. **Vet Comp Orthop Traumatol**, n. 29, p. 522-527. 2016. DOI <http://dx.doi.org/10.3415/VCOT-16-01-0014>. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.3415/VCOT-16-01-0014>. Acesso em: 30 jun. 2025.

KEOSENTHONG, Amphone; KAMPA, Naruepon; JITPEAN, Supranee; SEESUPA, Suvaluk; KUNKITTI, Panisara; HOISANG, Somphong. Incidence and classification of bone fracture in dogs and cats: a retrospective study at a Veterinary Teaching Hospital, Khon Kaen University, Thailand (2013-2016). **Veterinary Integrative Sciences**, n. 17, p. 127-139. 2019. Disponível em: <http://www.vet.cmu.ac.th/cmvj>. Acesso em: 30 jun. 2025.

KUMAR, P. Ravi; PRASAD V. Devi; SREENU, M.; NAIDU, G. Venkata and RAJU, N Kranthi Bhushan. Incidence, Occurrence and Classification of Long Bone Fractures in Dogs: A Retrospective Study. **Indian Journal of Animal Research**, 2022. DOI: 10.18805/IJAR.B-4876.

LEHRICH, Brandon M.; LIANG, Yaxuan; FIANDACA, Massimo S. Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses. **Journal Of Extracellular Vesicles**, v. 10, n. 3, p. 1-16. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jev2.12061>.

LI, Yan; FAN, Longkun; LIU, Shiyu; LIU, Wenjia; ZHANG, Hao; ZHOU, Tao; WU, Dan; YANG, Ping; SHEN, Lijuan; CHEN, Jihua; JIN, Yan. The promotion of bone

regeneration through positive regulation of angiogenic and osteogenic coupling using microRNA-26a, **Biomaterials**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.052>

LI, Wenyue; LIU, Yunsong; ZHANG, Ping; TANG, Yiman; ZHOU, Miao; JIANG, Weiran; ZHANG, Xiao; WU, Gang; ZHOU, Yongsheng. Tissue-Engineered Bone Immobilized with Human Adipose Stem Cells-Derived Exosomes Promotes Bone Regeneration. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, 2018, 10, 6, p. 5240–5254.

LIAN, Jane B.; STEIN, Gary S.; VAN WIJNEN, Andre J.; STEIN, Janet L.; HASSAN, Mohammad Q.; GAUR, Tripti; ZHANG, Ying. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. **National Institute of Health - NIH: Nat Rev Endocrinol.**, n. 4, p. 2012-227. 2012. DOI 10.1038/nrendo.2011.234. Disponível em: NIH Public Access. Acesso em: 20 jun. 2025.

LIAN, Wei-Shiung; KO, Jih-Yang; CHEN, Yu-Shan; KE, Huei-Jing; HSIEH, Chin-Kuei; KUO, Chung-Wen; WANG, Shao-Yu; HUANG, Bo-Wun; TSENG, Jung-Ge; WANG, Feng-Sheng. MicroRNA-29a represses osteoclast formation and protects against osteoporosis by regulating PCAF mediated RANKL and CXCL12. **Nature: Cell Death and Disease**, v. 10, n. 705, p. 1-14. 2019. DOI <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1942-1>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-019-1942-1>. Acesso em: 18 jun. 2025.

MAJIDINIA, Maryam; SADEGHPOUR, Alireza; YOUSEFI, Bahman. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. **Journal of Cellular Physiology: Wiley Periodicals**, v. 233, p. 2937 – 2948. 2018. DOI DOI: 10.1002/jcp.26042. Disponível em: wileyonlinelibrary.com/journal/jcp. Acesso em: 30 jun. 2025.

MARAZZI, Janine; KLEYER, Jonas; PAREDES, Juan Manuel Viveros; GERTSCH, Jürg. Endocannabinoid content in fetal bovine sera — Unexpected effects on mononuclear cells and osteoclastogenesis. **Journal Of Immunological Methods**, v. 373, n. 1-2, p. 219-228. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2011.08.021>.

MARTINS, Thayná de Souza; SCHMITT, Bernardo; SERAFINI, Gabriele Maria Callegaro. Appendicular fractures in dogs and cats: treatment methods and outcome. **Ciência Animal**, v. 33, n. 1, p. 79-85. 2023.

MORFIN, Cesar; SEBASTIAN, Aimy; WILSON, Stephen P.; AMIRI, Beheshta; MURUGESH, Deepa K.; HUM, Nicholas R.; CHRISTIANSEN, Blaine A.; LOOTS, Gabriela G. Mef2c regulates bone mass through Sost-dependent and independent mechanism. **Bone**, n. 179. 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bone.2023.116976>. Disponível em: <https://www.elsevier.com/locate/bone>. Acesso em: 23 jun. 2025.

OKA, Shunichi; LI, Xiaoyan; ZHANG, Fengshu; TEWARI, Nitesh; MA, Ri; ZHONG, Liangjun; MAKISHIMA, Makoto; LIU, Yi; BHAWAL, Ujjal K. MicroRNA-21 facilitates osteoblast activity. **Biochemistry and Biophysics Reports**, n. 25, p. 1-8. 2021.

ORYAN, Ahmad; ALIDADI, Soodeh; MOSHIRI, Ali; MAFFULLI, Nicola. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 9, n. 18. 2014. DOI

<https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>. Disponível em: <https://jorsonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1749-799X-9-18>. Acesso em: 1 jul. 2025.

PALOMINO, Diana Carolina Torres; MARTI, Luciana Carvalheiro. Quimiocinas e imunidade. **Einstein: Revendo Ciências Básicas**, v. 3, n. 13, p. 469-473. 2015. DOI 10.1590/S1679-45082015RB3438. Disponível em: <https://journal.einstein.br/pt-br/article/quimiocinas-e-imunidade/>. Acesso em: 18 jun. 2025.

PEDRAZA, Claudio E.; CHIEN, Yung-Ching; MCKEE, Marc D. Calcium oxalate crystals in fetal bovine serum: implications for cell culture, phagocytosis and biomineralization studies in vitro. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 5, p. 1379-1393. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21515>.

PENG, Zhuli; MAI, Zhihui; XIAO, Feng; LIU, Guanqi; WANG, Yixuan; XIE, Shanshan; AI, Hong. MiR-20a: a mechanosensitive microRNA that regulates fluid shear stress-mediated osteogenic differentiation via the BMP2 signaling pathway by targeting BAMBI and SMAD6. **Annals of Translational Medicine**. v. 12, n. 10, p. 1-15. 2022. DOI <https://dx.doi.org/10.21037/atm-22-2753>.

POLIWODA, Salomon; NOOR, Nazir; DOWNS Evan; SCHAAF, Amanda; CANTWELL, Abigail; GANTI, Latha; KAYE, Alan D.; MOSEL, Luke I.; CARROL, Caroline B.; VISWANATH, Omar; URITS, Ivan. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. **Orthopedic Reviews**, v. 14, n.3. 2022.

POTIER, Esther; FERREIRA, Elisabeth; MEUNIER, Alain; SEDEL, Laurent; LOGEART-AVRAMOGLU, Delphine; PETITE, Hervé. Prolonged Hypoxia Concomitant with Serum Deprivation Induces Massive Human Mesenchymal Stem Cell Death. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 6, p. 1325-1331. 2007. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2006.0325>.

REDDY, Shwetha Hulimavu Ramaswamy; REDDY, Roopa; BABU, N. Chaitanya; ASHOK, G. N. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies: Review Article. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 22, n. 3. 2018.

SARUGASER, Rahul; LICKORISH, David; BAKSH, Dolores; HOSSEINI, M. Morris; DAVIES, John E. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. **Stem Cells**, n. 23, p. 220-229. 2005.

SHARMA, Salil, Immunomodulation: A definitive role of microRNA-142, **Developmental and Comparative Immunology**. 2017, v.77, p. 150-156. Doi: 10.1016/j.dci.2017.08.001.

SHEKARI, Faezeh; ALIBHAI, Faisal J.; BAHARVAND, Hossein; BÖRGER, Verena; BRUNO, Stefania; DAVIES, Owen; GIEBEL, Bernd; GIMONA, Mario; SALEKDEH, Ghasem Hosseini; MARTIN-JAULAR, Lorena; MATHIVANAN, Suresh; NELISSEN, Inge; HOEN, Esther Nolte-‘t; O’DRISCOLL, Lorraine; PERUT, Francesca; PLUCHINO, Stefano; POCSEFALVI, Gabriella; SOLOMON, Carlos; SOEKMADJI, Carolina; STAUBACH, Simon; TORRECILHAS, Ana Claudia; SHELKE, Ganesh Vilas; TERTEL, Tobias; ZHU, Dandan; THÉRY, Clotilde; WITWER, Kenneth; NIEUWLAND, Rienk. Cell

culture-derived extracellular vesicles: Considerations for reporting cell culturing parameters. **Journal of Extracellular Biology - ISEV**, v. 17. 2023. DOI <https://doi.org/10.1002/jex2.115>. Disponível em: <https://wileyonlinelibrary.com/journal/jex2>. Acesso em: 3 jul. 2025.

SHELKE, Ganesh Vilas; LÄSSER, Cecilia; GHOSH, Yong Song; LÖTVALL, Jan. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. **Journal of Extracellular Vesicles**. v. 3, n. 1, p. 1-8. 2014. <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.24783>.

SHIOJIMA, Ichiro; WALSH, Kenneth. Role of Akt Signaling in Vascular Homeostasis and Angiogenesis. **Circulation Research**, n. 90, p. 1243-1250. 2002. DOI 10.1161/01.RES.0000022200.71892.9F. Disponível em: <http://www.circresaha.org>. Acesso em: 24 jun. 2025.

SHIRANE, Henrique Yassuhiro; ODA, Diogo Yochizumi; PINHEIRO, Thaigo Cerizza; DA CUNHA, Marcelo Rodrigues. Implantes De Biomateriais Em Falha Óssea Produzida Na Fíbula De Ratos. **Rev Bras Ortop.**, v. 5, n. 45, p. 478-482. 2010.

SILVA, Vanessa Pamplona. **Tratamentos À Base De Plasma Rico Em Plaquetas Em Equinos**. 2017. 112 p. Dissertação de mestrado (Mestrado integrado em medicina veterinária) - Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal.

SRIHARSHA, Gali Venkata; KUMARESAN, A.; KOKILA, S.; ARULMOZHI, A.; KATHIRVEL, S; DHARMACEELAN, S. A retrospective study on the incidence of long bone fractures in dogs. **International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry**. 2024;9(5):800-803.

STEWART, S. K. Fracture Non-Union: a review of clinical challenges and future research needs. **Malaysian Orthopaedic Journal**, v. 13, n. 2, p. 1-10, 1 jul. 2019. Malaysian Orthopaedic Association. <http://dx.doi.org/10.5704/moj.1907.001>.

SULZER, Bruno Golçalves; BORGES, Emilly Cristina Costa; SILVA, Laís Fernanda Arcangelo. Biomateriais aplicados na substituição óssea em procedimentos odontológicos. **Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde - PECIBES**, v. 8, n. 1, p. 30-47. 2022.

SUN, Li; WANG, Hong-Xiang; ZHU, Xiao-Jian; WU, Pin-Hui; CHEN, Wei-Qun; ZOU, Ping; LI, Qiu-Bai; CHEN, Zhi-Chao. Serum deprivation elevates the levels of microvesicles with different size distributions and selectively enriched proteins in human myeloma cells in vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 3, p. 381-393. 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2013.166>.

TATEIWA, Daisuke; NISHIDA, Masahiro; KODAMA, Joe; HIRAI, Hiromasa; NAKAGAWA, Shinichi; UKON, Yuichiro; TAKEYAMA, Kazuhiro; YAMAMORI, Natsumi; HIRANO, Kyoko; IKUTA, Masato; KITAHARA, Takayuki; FURUICHI, Takuya; BUN, Masayuki; OKADA, Seiji; KAITO, Takashi. Development of a novel rat long-bone nonunion model and efficacy evaluation of a prostaglandin EP4 selective agonist

(AKDS001) combined with iliac bone grafting. **Bone & Joint Research**, v. 14, ed. 3, p. 166-175, 2025. DOI 10.1302/2046-3758. 143.BJR-2024-0220.R1.

THÉRY, Clotilde; AMIGORENA, Sebastian; RAPOSO, Graça; CLAYTON, Aled. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. **Current Protocols In Cell Biology**: v. 30, n. 1, p. 2-28. 2006. <http://dx.doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>.

THOMAS, Joshua D.; KEHOE, James L. Bone Nonunion [Atualização em 6 de março de 2023]. In: **StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**. 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554385/>. Acesso em: 24 abr. 2025.

TOBEIHA, Mohammad; MOGHADASIAN, Mohammed H.; AMIN, Negin; JAFARNEJAD, Sadegh. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling: Review article. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1 – 11. 2020. DOI <https://doi.org/10.1155/2020/6910312>. Disponível em: RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. Acesso em: 25 jun. 2025.

URZÌ, Ornella; BAGGE, Roger Olofsson; CRESCITELLI, Rossella. The dark side of foetal bovine serum in extracellular vesicle studies. **Journal of Extracellular Vesicles: International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)**, p. 1-18, 21. 2022. DOI <https://doi.org/10.1002/jev2.12271>. Disponível em: <https://wileyonlinelibrary.com/journal/jev2>. Acesso em: 2 jun. 2025.

VAN LIESHOUT, Esther M. M.; HARTOG, Dennis Den. Effect of platelet-rich plasma on fracture healing. **Injury**, n. 5252, p. 558-566. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.12.005>. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/injury>. Acesso em: 3 jul. 2025.

VENKATACHALAM, Saravanakumar; MOHAN, Manikandan; VASANTHA, Niranjan Chellathurai; CHRISTYRAJ, Johnson Retnaraj Samuel Selvan. Alternative to FBS in animal cell culture: An overview and future perspective. **Heliyon**, n. 7, p. 1-9. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07686>. Disponível em: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>. Acesso em: 2 jun. 2025.

WANG, Tiantian; DESMET, Judith; PORTE, Cinta. Protective role of fetal bovine serum on PLHC-1 spheroids exposed to a mixture of plastic additives: A lipidomic perspective. **Toxicology in Vitro**, n. 96, p. 1-8. 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2024.105771>. Disponível em: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Acesso em: 2 jun. 2025.

WANG, Xiaoqin; OMAR, Omar; VAZIRISANI, Forugh; THOMSEN, Peter; EKSTRÖM, Kerin. Mesenchymal stem cell-derived exosomes have altered microRNA profiles and induce osteogenic differentiation depending on the stage of differentiation. **PLOS ONE**. 2018. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193059>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0193059>. Acesso em: 3 jul. 2025.

WEI, Fei; LI, Zhengmao; CRAWFORD, Ross; XIAO, Yin; ZHOU, Yinghong. Immunoregulatory role of exosomes derived from differentiating mesenchymal stromal cells on inflammation and osteogenesis. **J. Tissue Eng. Regen. Med.** 2019, v. 13, p. 1978–1991.

WELSH, Joshua A.; GOBERDHAN, Deborah C. I.; O'DRISCOLL, Lorraine; BUZAS, Edit I.; BLENKIRON, Cherie; BUSSOLATI, Benedetta; CAI, Houjian; DI VIZIO, Dolores; DRIEDONKS, Tom A. P.; ERDBRÜGGER, Uta; FALCON-PEREZ, Juan M.; FU, Qing-Ling; HILL, Andrew F.; LENASSI, Metka; LIM, Sai Kiang; MAHONEY, My G.; MOHANTY, Sujata; MÖLLER, Andreas; NIEUWLAND, Rienk; OCHIYA, Takahiro; SAHOO, Susmita; TORRECILHAS, Ana; ZHENG, Lei; ZIJLSTRA, Andries; ABUELREICH, Sarah; BAGADAS, Reem; BERGESE, Paolo; BRIDGES, Esther M.; BRUCALÉ, Marco; BURGER, Dylan; CARNEY, Randy P.; COCUCCHI, Emanuele; CRESCITELLI, Rossella; HANSER, Edveena; HARRIS, Adrian L.; HAUGHEY, Norman J.; HENDRIX, An; IVANOV, Alexander R.; JAVANOVIC-TALISMAN, Tijana; KRUH-GARCIA, Nicole A.; FAUSTINO, Vroniqa Ku'ulei-Lyn; KYBURZ, Diego; LÄSSER, Cecilia; LENNON, Kathleen M.; LÖTVALL, Jan; MADDUX, Adam L.; MARTENS-UZUNIVA, Elena S.; MIZENKO, Rachel, R.; NEWMAN, Lauren A.; RIDOLFI, Andrea; ROHDE, Eva; ROJALIN, Tatu; ROWLAND, Andrew; SAFTICS, Andras; SANDAU, Ursula S.; SAUGSTAD, Julie A.; SHEKARI, Faezeh; SWIFT, Simon; TER-OVANESYAN, Dmitry; TOSAR, Juan P.; USECKAITE, Zivile; VALLE, Francesco; VARGA, Zoltan; POL, Edwin van der; HERWIJNEN, Martijn J. C. van; WAUBEN, Marca H. M.; WEHMAN, Ann M.; WILLIAMS, Sarah; ZENDRINI, Andrea; ZIMMERMAN, Alan J; MISEV Consortium; THÉRY, Clotilde; WITWER, Kenneth W. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **J Extracell Vesicles**, n. 13. 2024. DOI <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>. Disponível em: <https://wileyonlinelibrary.com/journal/jev2>. Acesso em: 1 jul. 2025

WISANUYOTIN, Taweechok; PAHOLPAK, Permsak; SIRICHATIVAPEE, Winai; KOSUWON, Weerachai. Allograft versus autograft for reconstruction after resection of primary bone tumors: a comparative study of long-term clinical outcomes and risk factors for failure of reconstruction. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 23 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-18772-x>.

WU, Mengrui; WU, Shali; CHEN, Wen; LI, Yi-Ping. The roles and regulatory mechanisms of TGF- β and BMP signaling in bone and cartilage development, homeostasis and disease. **Springer Nature: Cell Research**, v. 34, p. 101-123. 2024. doi: <https://doi.org/10.1038/s41422-023-00918-9>

WU, Yan-Lin; LIN, Zheng-Jun; LI, Chang-Chun; LIN, Xiao; SHAN, Su-Kang; GUO, Bel; ZHENG, Ming-Hui; LI, Fuxingzi; YUAN, Ling-Qing; LI, Zhi-hong. Epigenetic regulation in metabolic diseases: mechanisms and advances in clinical study. **Nature: Signal Transduction and Target Therapy**, v. 8, n. 98. 2023. DOI <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01333-7>. Disponível em: www.nature.com/sigtrans. Acesso em: 24 jun. 2025.

XIE, Liangkun; GUAN, Zheng; ZHANG, Mingzhu; LYU, Sha; THUAKSUBAN, Nattawut; KAMOLMATTAYAKUL, Suttatip; NUNTANARANONT, Thongchai; YAZAWA, T.

Exosomal circLPAR1 Promoted Osteogenic Differentiation of Homotypic Dental Pulp Stem Cells by Competitively Binding to hsa-miR-31. **BioMed Res. Int.** 2020.

XU, Dongjie; DI, Kaili; FAN, Boyue; WU, Jie; GU, Xinrui; SUN, Yifan; KHAN, Adeel; LI, Peng; LI, Zhiyang. MicroRNAs in extracellular vesicles: Sorting mechanisms, diagnostic value, isolation, and detection technology. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, 2022, 10:948959. doi: 10.3389/fbioe.2022.948959

XUE, Zhixin; LIAO, Yunjun; LI, Ye. Effects of microenvironment and biological behavior on the paracrine function of stem cells. **Gene & Diseases: KeAi chinese roots global impact**, p. 135-147. 2023. DOI <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.03.013>. Disponível em: www.keaipublishing.com/en/journals/genes-diseases. Acesso em: 30 jun. 2025

YOU, Li; PAN, Ling; CHEN, Lin; GU, Wensha; CHEN, Jinyu. MiR-27a is Essential for the Shift from Osteogenic Differentiation to Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Postmenopausal Osteoporosis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 253-265. 2016. DOI 10.1159/000445621. Disponível em: www.karger.com/cpb. Acesso em: 7 maio 2025.

ZAINAL ARIFFIN, Shahrul Hisham; LIM, Ker Wei; MEGAT ABDUL WAHAB, Rohaya; ZAINAL ARIFFIN, Zaidah; RUS DIN, Rus Dina; SHAHIDAN, Muhammad Ashraf; JOHARI, Anis Nabilah; ZANOL ABIDIN, Intan Zarina. Gene expression profiles for in vitro human stem cell differentiation into osteoblasts and osteoclasts: a systematic review. **PeerJ.**, v.10. 2022. DOI <http://doi.org/10.7717/peerj.14174>

ZAKRZEWSKI, Wojciech; DOBRZYŃSKI, Maciej; SZYMONOWICZ, Maria; RYBAK, Zbigniew. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Res Ther.**, v.10, p. 68. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.

ZHU, Weiquan; CHEN, Jinghai; CONG, Xiangfeng; HU, Shengshou; CHEN, XI. Hypoxia and Serum Deprivation-Induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 416-425. 2005. <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2005-0121>.