

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Monique Maria Franco da Silva

Análise do efeito de células estromais mesenquimais, suas partículas de membrana e seu meio condicionado sobre neutrófilos

PORTO ALEGRE

2024

Monique Maria Franco da Silva

Análise do efeito de células estromais mesenquimais, suas partículas de membrana e seu meio condicionado sobre neutrófilos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Helena Paz

PORTO ALEGRE

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Carmem e Vanderlei, pelas oportunidades que me concederam desde meu nascimento. Ao meu noivo Gabriel, por ser meu ombro amigo nos momentos difíceis e meu parceiro de vida para tudo. A minha sogra Leila, que me apoiou em inúmeros momentos nessa jornada. Meus amigos, por me ajudarem a me divertir mesmo durante o caos. Aos meus colegas de laboratório, em especial a Mariana, Alessandra, Dienifer, Giovana e Laíza que estiveram comigo durante os experimentos com horários nada convenientes. A minha professora Ana, que entre as múltiplas responsabilidades da vida ainda encontrou tempo e carinho para me orientar, não só academicamente como para a vida. Por fim, dedico este trabalho em celebração a vida de meu sogro Paulo, pois tenho certeza de que ele estaria muito orgulhoso por minha conquista.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os alunos e professores do laboratório de Células, Tecidos e Genes, que comemoravam meus sucessos e me consolavam nos fracassos. Agradeço também minhas colegas do grupo DII, Francine, Larissa, Isadora, Luísa e André. Também agradeço a banca pela disponibilidade e pela oportunidade de aprendizado. Agradeço aos profissionais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por todo o apoio, em particular ao servidor Everaldo e a servidora Emily. Agradeço os órgãos de fomento FINEP e CAPES por tornar esse trabalho possível. Agradeço a professora Elizandra Braganhol pelo apoio e pelos reagentes generosamente cedidos. Agradeço imensamente a todos citados na dedicatória, pelos motivos já mencionados e por serem uma importante parte desses dois anos que passaram. Por fim, agradeço a todos que cruzaram o meu caminho neste período e me ajudaram de alguma forma.

Muito obrigada por tudo.

RESUMO

Os neutrófilos são importantes células do sistema imune, que atuam de diferentes formas e assumem fenótipos de acordo com o ambiente que estão inseridos. De forma simplificada, podemos considerar que existem neutrófilos inflamatórios – N1, e anti-inflamatórios – N2, além de sua forma de repouso, ou *naive*. Os perfis, N1 e N2, podem estar relacionados com patologias. Dentre as possíveis formas para modular o perfil de neutrófilos, está a terapia celular com as células estromais mesenquimais (MSC). As MSC são células multipotentes que podem ser obtidas de vários tecidos adultos, como tecido adiposo, medula óssea, ou anexos embrionários. O potencial imunomodulatório das MSC é conhecido e bem estudado em células imunes como macrófagos, monócitos e linfócitos, porém muito pouco estudado em neutrófilos. Assim, este trabalho teve como objetivo explorar os efeitos de MSC da membrana coriônica (cMSC) sobre neutrófilos maduros, utilizando diferentes tratamentos derivados de cMSC: Meio condicionado, micropartículas de membrana (MP-cMSC) e co-cultivo. As MP-cMSC são uma alternativa de tratamento livre de células que contorna alguns problemas da terapia com células integras, mas mantém a possibilidade de interação da célula alvo com proteínas de membrana das MSC mimetizando o contato célula-célula. Como comparativo, utilizaram-se neutrófilos *naive*, neutrófilos induzidos N1 e neutrófilos induzidos N2.

Observou-se que o tratamento com todos os derivados de cMSC apresentaram efeitos sobre a funcionalidade dos neutrófilos. O tratamento com meio condicionado, e, portanto, efeitos parácrinos, apresentou uma redução na taxa de apoptose, leve aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, aumento do potencial imunossupressor e alterações enzimáticas compatíveis com um perfil semelhante ao anti-inflamatório. Enquanto isso, os efeitos de redução na taxa de apoptose, imunossupressão e alterações enzimáticas não foram significativamente relevantes para MP-cMSC. Isso indica que grande parte dos efeitos avaliados não se deve a interação íntima dos neutrófilos com proteínas de membrana das cMSC. No entanto, as MP-cMSC aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio, indicando uma maior atividade antimicrobiana. Ainda assim, o tratamento com MP-cMSC não se assemelha ao perfil N1, indicando um fenótipo diferente dos extremos N1 e N2. Para

o grupo de co-cultivo de cMSC, foram observados resultados intermediários, visto que esse tratamento possui tanto interações parácrinas quanto interações célula-célula.

Podemos concluir que as cMSC e seus produtos possuem efeitos na modulação de neutrófilos indicando que o meio condicionado apresenta um maior potencial para induzir o fenótipo semelhante ao anti-inflamatório. Contudo, mais estudos são necessários para compreender o mecanismo de ação dos diferentes produtos de cMSC nesse tipo celular.

Palavras chaves: MSC, neutrófilos, células estromais mesenquimais, imunomodulação, micropartículas, meio condicionado, MSC membrana coriônica;

ABSTRACT

Neutrophils are essential cells of the immune system that act in various ways and assume different phenotypes according to their environment. In a simplified way, we can consider that there are inflammatory neutrophils – N1, and anti-inflammatory ones – N2, in addition to their resting, or naïve form. Both profiles, N1 and N2, may be related to several pathologies. There are various ways to modulate neutrophil profiles, one of which is cell therapy with mesenchymal stromal cells (MSC). MSC are multipotent cells obtained from different types of adult tissues, such as adipose tissue, bone marrow, or embryonic appendages. The immunomodulatory potential of MSC is known in several conditions and cell types, affecting immune cells such as macrophages, monocytes, lymphocytes, and neutrophils. The literature on MSC and neutrophils is scarce, lacking important pieces of information about specific mechanisms and having conflicting evidence. This work explores the effects of MSC extracted from the chorionic membrane (cMSC) on mature neutrophils. cMSC has not been extensively explored in the literature, and its interaction with neutrophils is practically unknown. Different cMSC-derived treatments were compared: Conditioned medium, membrane microparticles (MP-cMSC), and co-culture. It is pertinent to highlight the inclusion of MP-cMSC, which is a cell-free alternative that overcomes some problems of whole-cell therapy. As a comparison, naïve neutrophils, N1-induced neutrophils, and N2-induced neutrophils were used. It was observed that all cMSC-derived treatments presented effects on neutrophil functionality. Treatment with a conditioned medium, and therefore paracrine effects, showed a reduction in the rate of apoptosis, a slight increase in the production of reactive oxygen species (ROS), an increase in immunosuppressive potential, and enzymatic changes compatible with an anti-inflammatory profile. Meanwhile, the effects of reducing the rate of apoptosis, immunosuppression, and enzymatic changes were subtle, or even non-existent in MP-cMSC treatment. This indicates that most observed effects are not due to the intimate interaction of neutrophils with cMSC membrane proteins. However, MP-cMSC increased the production of ROS, pointing to an enhanced microbicide capacity. However, MP-cMSC treatments did not present similar characteristics to N1, indicating a different profile when compared to N1 or N2. For the MSC co-culture group, intermediate results were observed, as this treatment has both paracrine interactions

and cell-cell interactions. We can conclude that MSC and their products affect neutrophil modulation, indicating that conditioned medium presents a greater potential for inducing an anti-inflammatory-like phenotype. However, further studies are necessary to understand the mechanism of action of different MSC products on this cell type.

Keywords: MSC, Neutrophil, mesenchymal stromal cells, chorionic membrane MSC, immunomodulation, microparticles, conditioned media.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CXCC: Ligante de quimiocina de motivo CC

CXCL: Ligante de quimiocina de motivo CXC

DMSO: Dimetilsulfóxido

EGF: Fator de crescimento epitelial

GAL: Galectina

G-CSF: Fator estimulador de colônia granulocitária

HB-EGF: Fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação à heparina

IDO: indoleamina-2,3-dioxigenase

IFN- β : Interferon beta

IFN- γ : Interferon gama

IL: Interleucina

MIP: Proteína inflamatória de macrófagos

miRNA: microRNA

mRNA: RNA mensageiro

MTT: a 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

NADPH: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NET: Armadilha extracelular de neutrófilos

NOX: NADPH oxidase

PD-1: proteína de morte celular programada

PD-L1: Ligante de proteína de morte celular programada

ROS: Espécies reativas de oxigênio

TGF- β : Fator de crescimento tumoral beta

TNF: Fator de necrose tumoral

TSG-6: Proteína induzida por TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) 6

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais mecanismos de ação dos neutrófilos e suas características....	14
Figura 2: Representação dos perfis N1 e N2, juntamente com compostos indutores utilizados neste trabalho.....	18
Figura 3: Diferença na formação e composição de diferentes componentes utilizados nos tratamentos com MSC.....	23
Figura 4: Ilustração com os efeitos das MSC sobre diferentes tipos de células imunes.....	24
Figura 5: Diferentes efeitos das MSC sobre neutrófilos juntamente com seus principais mecanismos efetores.....	26

Artigo científico

Figure 1: <i>Graphical abstract of methodology timeline</i>	37
Figure 2: Characterization of mesenchymal stem cells (MSC) and MP-cMSC.....	41
Figure 3: MC, MP and MSC treatment <i>effects in</i> neutrophils apoptosis.....	42
Figure 4: MSC-derived treatments cytotoxicity, influence in oxidative burst production, peroxidase, and arginase activity.....	45
Figure 5: Effects of experimental treatments in PD-L1 neutrophil expression and neutrophil effects in MSC viability.....	46
Figure 6: Nuclear morphological effect of MSC-derived treatments in neutrophils...	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
4. ARTIGO CIENTÍFICO	29
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	62
7. PERSPECTIVAS.....	63
8. REFERÊNCIAS:.....	64

1. INTRODUÇÃO

Os neutrófilos são células imunes comumente encontradas na circulação e nos tecidos do corpo humano, compondo cerca de 60% dos leucócitos circulantes no sangue (Kraus; Gruber, 2021). São células originadas na medula, que compõe uma parte essencial do sistema imune inato e adaptativo. Quando liberados pela medula, os neutrófilos circulam através dos vasos sanguíneos, juntamente com hemácias e outras células imunes (Borregaard, 2010). Sua ação no sistema imune inato consiste na formação de uma “primeira linha de defesa”, identificando sinalizações de inflamação e migrando para os tecidos-alvo através do endotélio. Essa migração através do endotélio dos vasos é chamada de extravasamento, permitindo o acesso dos neutrófilos ao tecido inflamado. Quando no tecido, os neutrófilos são atraídos através de um gradiente quimiotático, composto por diversas moléculas sinalizadoras. A partir daí, os neutrófilos exercem sua função de destruição de uma ampla gama de patógenos (Kraus; Gruber, 2021). Apesar do extravasamento de neutrófilos para os tecidos ocorrer principalmente devido a presença de inflamação, se sabe que a migração de neutrófilos pode ocorrer também em situações fisiológicas, formando reservatórios de neutrófilos em diferentes órgãos (Kolaczowska; Kubes, 2013).

O papel dos neutrófilos no sistema imune adaptativo consiste principalmente na regulação de outras células imunes como linfócitos, através da produção de várias citocinas, quimiocinas e outras moléculas sinalizadoras, como por exemplo: Fator de necrose tumoral (TNF) α , Ligante de quimiocina de motivo CXC (CXCL)8, CXCL10, ligante de quimiocina de motivo CC (CCL)2, CCL3, CCL4 e CCL23, fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), outros fatores da família dos TNF e fatores de crescimento como fator de crescimento semelhante ao EGF (fator de crescimento epitelial) de ligação à Heparina (HB-EGF). Além disso, os neutrófilos podem funcionar como células apresentadoras de antígeno e retornarem dos tecidos inflamados para os linfonodos durante infecções parasitárias ou bacterianas (Rosales, 2020).

Dada a sua função, os neutrófilos são capazes de eliminar com rapidez e eficiência uma ampla gama de patógenos e possíveis ameaças ao corpo e seus órgãos. Para isso, os neutrófilos utilizam diversos mecanismos, sendo os principais: Fagocitose, produção de explosão oxidativa, *desgranulação* e formação de

“armadilhas” extracelulares de neutrófilos (NETs; Figura 1) (Papayannopoulos; Zychlinsky, 2009).

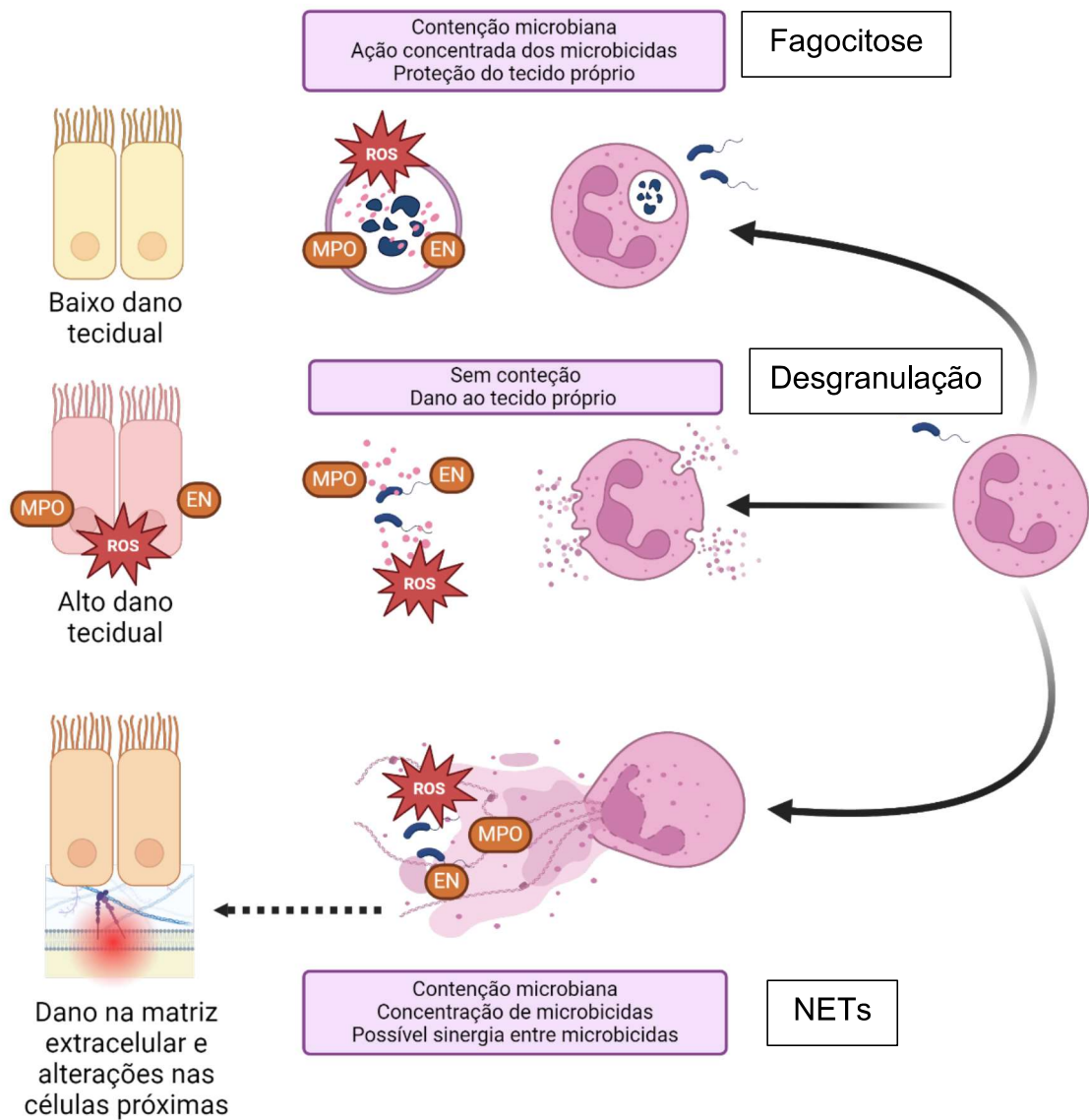


Figura 1: Principais mecanismos de ação dos neutrófilos e suas características. Figura elaborada pela autora. ROS: Espécies reativas de oxigênio; MPO: Mieloperoxidase; EM: Elastase de neutrófilo

O processo da fagocitose consiste no aprisionamento físico de possíveis patógenos pelo neutrófilo, o que resulta na formação de uma vesícula especializada na destruição do que foi internalizado, denominada fagossomo (Nordenfelt; Tapper, 2011). O fagossomo permite a concentração da ação antimicrobiana em locais específicos promovendo, portanto, menos danos colaterais para a célula, isolando

componentes efetores potencialmente nocivos do citoplasma. Normalmente, juntamente com o processo de fagocitose ocorre a junção do fagossomo com grânulos contendo uma série de enzimas, como a NADPH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) oxidase (NOX) e mieloperoxidase (MPO), que possibilitam o funcionamento correto do fagossomo (Burn *et al.*, 2021). O processo que permite a mobilização das vesículas contendo as enzimas essenciais para os fagossomos é denominado desgranulação e induz a mobilização dos diferentes tipos de grânulos para os fagossomos ou para o ambiente extracelular. Os grânulos de neutrófilos podem ser categorizados em quatro grupos: secretores, terciários ou de gelatinase, secundários ou específicos e primários ou azurófilos. Cada tipo de grânulo é caracterizado pelos seus componentes. Os grânulos secretores englobam proteínas plasmáticas e receptores de FC e complemento. Com maior propriedade pró-inflamatória, os grânulos primários são reservatórios de enzimas como a mieloperoxidase, defensinas, elastase e azurocidina. Grânulos secundários contêm proteínas como lisozima, pré-catelidina e lactoferrina e grânulos terciários armazenam gelatinase e acetiltransferase (Borregaard *et al.*, 1993). A desgranulação é estimulada por diversos fatores e está intimamente associada com a fagocitose, explosão oxidativa e secreção de componentes no espaço extracelular (Manara; Chin; Schneider, 1991). Mesmo sendo um processo essencial no funcionamento do neutrófilo, a desgranulação excessiva pode ser prejudicial, pois a liberação de enzimas com efeito antimicrobiano também pode afetar o tecido do próprio organismo (Eichelberger; Goldman, 2020).

A explosão oxidativa (ou *burst* oxidativo) é um processo de produção massiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir da estimulação do neutrófilo. Essa produção é catalisada pela enzima NOX. As ROS são moléculas altamente reativas com radicais de oxigênio, que são produzidas fisiologicamente durante o metabolismo celular, participando de processos de sinalização. Nos casos de desregulação de sua produção, seu aumento (estresse oxidativo) pode causar danos as células. Algumas das ROS mais comumente produzidas são o peróxido (H_2O_2), superóxido ($\bullet O_2^-$) e radicais hidroxila (OH^-) (Sahoo *et al.*, 2022). Os neutrófilos utilizam do potencial destrutivo das ROS para eliminação de elementos indesejados (Winterbourn; Kettle; Hampton, 2016). As ROS agem interagindo com moléculas orgânicas, causando danos a estrutura molecular através da oxidação e alteração de sua estrutura,

promovendo danos a componentes celulares como enzimas, lipídeos e DNA (Hajam *et al.*, 2022).

Normalmente, neutrófilos estimulados iniciam, em aproximadamente 10 a 20 minutos, um processo de catalização de ROS aumentado cerca de 30 vezes em relação aos neutrófilos não ativados, sendo uma resposta rápida e direcionada para a eliminação de patógenos (Britt *et al.*, 2022). A atividade da enzima NOX se inicia concomitantemente com a desgranulação (Lacy, 2006). Após sua ativação, a NOX irá “bombear” elétrons para dentro dos fagossomos. A partir daí, os ROS contidos nos fagossomos danificam e destroem o patógeno (Segal, 2005). Além disso, os neutrófilos possuem a enzima MPO, presente em altas concentrações nos grânulos primários, que se fundem aos fagossomos durante a desgranulação. A mieloperoxidase (MPO) converte H_2O_2 (produzido em grandes quantidades pela NADPH) e íon cloreto (Cl^-) em ácido hipocloroso (HOCl), radicais hidroxila (OH^-) e cloraminas, que contribuem para a degradação dos patógenos no fagossomo. Durante a morte celular, a MPO pode ser liberada no ambiente extracelular, onde ao se ligar com receptores da membrana de outros neutrófilos, induzirá desgranulação, formando uma reação em cadeia (Lawrence; Corriden; Nizet, 2018).

Juntamente com a liberação de enzimas antimicrobianas no meio externo, neutrófilos estimulados ejetam redes de DNA pouco condensado, contendo histonas citrulinadas ou NETs e enzimas citoplasmáticas como MPO e elastase neutrofílica (Yazdani *et al.*, 2019). A formação de NETs é induzida por vários estímulos, tanto infecciosos como não infecciosos (Stojkov *et al.*, 2022) e promove o aprisionamento dos microrganismos, impedindo que se espalhem, o que potencializa o efeito das enzimas e produtos secretados (Brinkmann *et al.*, 2004). As NETs têm sido associadas com o desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias e autoimunes, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, fibrose e até mesmo câncer. Diferentes maneiras de desenvolvimento de NETs foram descritas, sendo que estas podem ou não levar a morte do neutrófilo. Além disso, NETs são complexas, podem atuar como pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo do estímulo e das circunstâncias nas quais foram geradas. Classicamente, NETs atuam de forma inflamatória, aumentando a reação de células imunes e auxiliando no combate a infecções, porém em algumas situações, NETs podem exercer sinalizações anti-

inflamatórias, como inibir a ativação de macrófagos, diminuindo a secreção de interleucina (IL)-6 e aumentando a secreção de IL-10 (Melbouci; Haidar Ahmad; Decker, 2023). Adicionalmente, NETs causam danos na matriz extracelular e alteram o funcionamento de células próprias, dificultando a recuperação do tecido (Zhu *et al.*, 2021).

Dada a ampla gama de mecanismos e funções desenvolvidas pelos neutrófilos, pode-se constatar a grande variedade de fenótipos que neutrófilos podem assumir. Atualmente, existe uma forte discussão sobre como classificar os diferentes tipos de neutrófilos. Várias classes de neutrófilos já foram sugeridas, tais como maduros, imaturos, de baixa densidade, hiper segmentados, inflamatórios (N1) e anti-inflamatórios (N2) além de classificações específicas de acordo com receptores expressados (Hellebrekers; Vrisekoop; Koenderman, 2018). Para fins práticos, muitos autores consideram o mesmo tipo de classificação utilizado para macrófagos, nos quais se consideram os fenótipos M1 (inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) (Abumaree *et al.*, 2013). Para neutrófilos, considera-se o neutrófilo em repouso (não estimulado), o neutrófilo ativado classicamente (inflamatório) denominado N1 e o neutrófilo anti-inflamatório N2. Entre os dois fenótipos extremos (Figura 2), considera-se a existência de um gradiente de fenótipos bastante complexo. Enquanto N1 está relacionado com a destruição de patógenos, produção de ROS e aumento da inflamação, N2 tem uma redução na produção de marcadores inflamatórios, menor produção de ROS e um aumento da capacidade fagocítica e supressão imune. Neutrófilos N2 são comumente relacionados com tumores, sendo considerados pró-tumorigênicos (Ohms; Möller; Laskay, 2020; Xie *et al.*, 2023).

Entretanto, a indução da polarização de neutrófilos nos dois fenótipos básicos - N1 e N2 – *in vitro* não está ainda bem estabelecida, principalmente devido à dificuldade de mimetizar o microambiente necessário. Normalmente, utiliza-se Lipopolisacarídeo (LPS) e interferon gama (IFN- γ) (Marchi *et al.*, 2014; Ohms; Möller; Laskay, 2020) para induzir o fenótipo N1 com certa facilidade, porém para indução de N2 existe uma grande inconsistência na literatura, variando desde a utilização de coquetéis contendo fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), lactato, adenosina, prostaglandina E2 (PGE-2), IL-10, e G-CSF (Ohms; Möller; Laskay, 2020) protocolos mais simples com IL-4 e TGF- β (Shen *et al.*, 2007). Além da composição dos

indutores de fenótipo, suas concentrações variam muito na literatura, não se tendo, portanto, um consenso para sua utilização.



Figura 2: Representação dos perfis N1 e N2, juntamente com compostos indutores utilizados neste trabalho. Elaborada pela autora. ROS: Espécies reativas de oxigênio; NO: óxido nítrico; IFN-γ: Interferon Gama; LPS: Lipopolissacarídeo; TGF-β: Fator de crescimento tumoral beta; IL-4: Interleucina 4; H₂O₂: Peróxido de hidrogênio; TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa;

Muitos trabalhos *in vitro* envolvendo neutrófilos são realizados com linhagens celulares que possuem algumas características semelhantes aos neutrófilos, como PLB-985, NB4, Kasumi-1 e HL-60 (Blanter; Gouwy; Struyf, 2021). Dentre essas linhagens, a HL-60 é a mais utilizada, composta de células pró-mieloblásticas, isoladas de uma paciente com leucemia promielocítica aguda. Essa linhagem de células pode ser diferenciada em outros tipos celulares parecidos com células imunes maduras da linhagem mieloide, tais como granulócitos (similares a neutrófilos) e monócitos/macrófagos. Apesar de se diferenciarem espontaneamente, o cultivo com dimetilsulfóxido (DMSO) ou ácido retinóico induz a diferenciação em granulócitos com características compartilhadas com neutrófilos (Collins, 1987). As HL-60 diferenciadas em neutrófilos possuem várias características em comum com os neutrófilos maduros, mas ainda assim possuem diferenças significativas quanto as suas respostas, tais como a expressão de diversos genes, deficiência na produção de grânulos secundários e mudanças em sua resposta a estímulos (Blanter; Gouwy; Struyf, 2021; Collins, 1987; Rincón; Rocha-Gregg; Collins, 2018)

Dessa forma, o uso de neutrófilos maduros extraídos diretamente do sangue venoso de doadores, torna-se uma alternativa interessante, pois reproduz de forma mais adequada as características fisiológicas de neutrófilos *in vivo*. Entretanto, o uso de neutrófilos maduros possui algumas dificuldades na sua utilização *in vitro*.

Devido a sua natureza, os neutrófilos são facilmente ativados por diversos estímulos que podem ocorrer durante o seu isolamento e cultivo, tais como temperatura inadequada (Salanova *et al.*, 2005), e estímulos mecânicos (Yap; Kamm, 2005). Além disso, neutrófilos possuem um tempo de vida muito curto na circulação de um indivíduo saudável. Em média, estima-se que um neutrófilo permaneça apenas de 12 a 18 horas em circulação (Tak *et al.*, 2013). No entanto, já foram descritos na literatura neutrófilos com uma maior capacidade de sobrevivência, chegando à identificação de neutrófilos com viabilidade superior a 5 dias (Pillay *et al.*, 2010). Quando mantidos fora do corpo (*Ex vivo*) e nas condições adequadas para cultivo celular, a viabilidade média de neutrófilos é de apenas 24h, aumentando os graus de apoptose com o tempo decorrido. Além disso, a própria manipulação e exposição *in vitro* parece ter um efeito redutor na viabilidade dos neutrófilos (Pillay *et al.*, 2010). Cabe ressaltar que, quando recrutados para tecidos periféricos ou estimulados *in vitro*, os neutrófilos podem persistir por períodos muito mais longos (Pérez-Figueroa *et al.*, 2021). Essa estimulação pode ser exercida por componentes inflamatórios, como LPS, componentes anti-inflamatórios ou pró tumorais, como fatores estimuladores de colônias (com o G-CSF e IL-3) (Pylaeva; Lang; Jablonska, 2016).

Normalmente, neutrófilos eliminam a ameaça e permitem a regeneração do tecido, no entanto, em algumas situações a sua atuação pode ser prejudicial para o organismo. Diversas doenças possuem a participação de neutrófilos superativados, onde seu potencial destrutivo acaba prejudicando o próprio organismo (Hellebrekers; Vrisekoop; Koenderman, 2018). Dentre elas, podemos citar a doença obstrutiva pulmonar crônica, lúpus e artrite reumatoide (Fresneda Alarcon; McLaren; Wright, 2021; Hoenderdos; Condliffe, 2013; Ma Et Al.,2016)

Na doença obstrutiva pulmonar crônica, existe uma grande quantidade de neutrófilos pulmonares ativados pela hipóxia tecidual. Apesar disso, pessoas com doença obstrutiva pulmonar crônica sofrem frequentemente de infecções bacterianas e virais que acabam agravando o caso. Acredita-se que isso ocorra, pois, a hipóxia da área afeta os neutrófilos, diminuindo sua capacidade de combater patógenos, aumentando a secreção de proteases e inibindo a sua apoptose (Hoenderdos; Condliffe, 2013). No trabalho de Ma e colaboradores, foi observado que neutrófilos presentes no tecido cardíaco pós-infarto também apresentam um perfil

majoritariamente N1, principalmente nos três primeiros dias. Entretanto, esse perfil é revertido gradualmente para N2 a partir do quarto dia pós-infarto. Interessantemente, os períodos com uma maior fração de neutrófilos N1, ou seja, nas 72h iniciais, estavam fortemente relacionados com uma fragilização do tecido cardíaco infartado, enquanto a presença de neutrófilos N2 inibia essa fragilização (Ma *et al.*, 2016). Em patologias como artrite reumatoide, nefrite lúpica e lúpus eritematoso sistêmico, a ativação aberrante de neutrófilos parece ser um importante gatilho para o desenvolvimento da doença. Na artrite reumatoide, neutrófilos ativados com um perfil muito semelhante a N1 causam danos devido a liberação excessiva de ROS e derivados, diminuição nas taxas de apoptose e liberação de enzimas que danificam os tecidos. Já para o lúpus eritematoso sistêmico, a ativação excessiva de neutrófilos cursa com aumento de ROS e um aumento muito brusco na apoptose, levando ao acúmulo de resíduos e autoanticorpos que perpetuam a inflamação (Fresneda Alarcon; McLaren; Wright, 2021).

Algumas doenças também são impactadas pela presença de neutrófilos N2, no qual o perfil anti-inflamatório é prejudicial. Por exemplo, nos casos em que neutrófilos não funcionais impossibilitam a atuação correta do sistema imune, como no caso de infecções sistêmicas, onde neutrófilos N2 acabam não conseguindo combater os patógenos (Neely *et al.*, 2014). No caso dos tumores, neutrófilos presentes no microambiente tumoral assumem o fenótipo N2 e contribuem para a permanência e crescimento da neoplasia, sendo um componente importante a se considerar, juntamente com outras células imunes alteradas pelo microambiente tumoral. (Fridlender; Albelda, 2012).

Uma possível estratégia para modular neutrófilos são as células estromais mesenquimais, do inglês *Mesenchymal Stromal Cells* (MSC). As MSC são células multipotentes que podem se diferenciar em osteócitos, condrócitos e adipócitos e outros tipos celulares além de manter potencial de autorrenovação (Pittenger, 1999). São caracterizadas pela expressão de marcadores CD73, CD90 e CD105 e ausência de CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR (Dominici *et al.*, 2006). As MSC possuem como principal função a participação no processo de regeneração e reparo de praticamente todos os tecidos do corpo, atuando na modulação do microambiente da lesão (Caplan; Hariri, 2015). A modificação desse microambiente se dá através do grande potencial imunomodulatório das MSC, ou seja, sua capacidade de alterar o

funcionamento de células imunes (Huang; Wu; Tam, 2022). Devido a sua presença frequente nos tecidos pós-natais, as MSC podem ser isoladas de uma grande variedade de tecidos, tanto de origem adulta como por exemplo, tecido adiposo e medula óssea, quanto de anexos embrionários como da placenta, membrana coriônica ou cordão umbilical (Araújo *et al.*, 2017; Klingemann; Matzilevich; Marchand, 2008).

Devido ao seu potencial imunomodulatório, as MSC tornaram-se foco de investigação, principalmente associando a imunomodulação como estratégia terapêutica (Huang; Wu; Tam, 2022). Ao longo do tempo, constatou-se que a imunomodulação exercida pelas MSC envolve tanto a produção de vesículas e moléculas secretadas no microambiente (o que constitui os fatores solúveis ou o meio condicionado), quanto por proteínas de membrana que atuam quando existe contato direto entre MSC e células alvo. Tanto as moléculas secretadas quanto as interações diretas variam de acordo com o tipo de célula interagindo com as MSC (Jiang; Xu, 2020). Dentre os constituintes do meio condicionado, podem-se ressaltar as vesículas extracelulares (EV). Essas vesículas são classificadas em dois grandes grupos: Ectossomos (ou microvesículas) e exossomos. Ectossomos são formados a partir da compressão da membrana citoplasmática para fora da célula, enquanto os exossomos possuem origem endossomal e possuem em média 100nm de diâmetro (Kalluri; LeBleu, 2020). Dentro dos exossomos podem se encontrar uma grande variedade de moléculas (Kalluri; LeBleu, 2020), tornando estes um alvo frequente de investigação. Tanto os ectossomos quanto os exossomos são gerados naturalmente pelas células, seja durante a homeostase quanto em situações patológicas. O potencial imunomodulatório das MSC vem sendo estudado para diversas células, incluindo linfócitos, monócitos, macrófagos e neutrófilos (González-González *et al.*, 2020).

Para tratamento com MSC, geralmente a rota de administração preferida é a infusão intravenosa. Essa forma de administração possui algumas limitações. Primeiramente, existem os riscos inerentes ao uso de células vivas, visto que não existe um controle dessas células uma vez que são administradas. Além disso, devido ao seu tamanho aumentado, as MSC ficam detidas em capilares e vasos menores. Isso dificulta a chegada das células nos locais-alvo do tratamento, além de aumentar o risco de acidentes de obstruções vasculares (Ge *et al.*, 2014). O uso de meio condicionado contendo exossomos e fatores solúveis ou isolados de exossomos são

utilizados como uma forma mais segura de tratamento, porém essas alternativas não mimetizam as interações célula-célula exercidas pelas MSC sobre as células imunes. Com essa premissa, foram desenvolvidas as micropartículas de membrana (MP) de MSC (MP-MS).C).

As MP-MS.C são partículas de membrana geradas artificialmente a partir do rompimento de MSC, seja por utilização de uma solução hipotônica ou ciclos de congelamento e descongelamento. Diferentemente das EV (exossomos e ectossomos) as micropartículas não são formadas naturalmente pelas células, tratando-se de um produto gerado exclusivamente através da manipulação dessas células (Figura 3). Além das proteínas de membrana plasmática, as MP-MS.C também apresentam uma ampla gama de proteínas de origem nucleica, vesículas plasmáticas, citoesqueleto e derivadas de organelas como mitocôndrias, lisossomos, complexo de golgi e retículo endoplasmático. Quando comparadas com vesículas extracelulares (geradas naturalmente pelas células), as MP-MS.C apresentam uma maior diversidade de proteínas, além de uma melhor resposta a diversificação de proteínas através do *priming* das MSC por IFN- γ (Tejeda-Mora *et al.*, 2021). As MP-MS.C geradas a partir de MSC previamente estimuladas com IFN- γ possuem um perfil diferente significativamente das MP-MS.C geradas de MSC não estimuladas, ressaltando a possibilidade do direcionamento e modulação do perfil para diferentes condições. Além disso, ao contrário dos exossomos, as MP-MS.C não apresentam contaminação significativa com fatores solúveis (Tejeda-Mora *et al.*, 2021). O tamanho das MP-MS.C varia de 63nm até 700nm, sendo extremamente pequena quando comparada com MSC inteiras, que passam dos 20 μ m. Isso facilita a circulação das MP-MS.C, prevenindo problemas com aprisionamento em capilares menores. Ainda que sua interação com monócitos, linfócitos (Gonçalves *et al.*, 2017), macrófagos (da Costa Gonçalves *et al.*, 2021) e outros tipos de células não imunes (Merino *et al.*, 2021a) já tenha começado a ser explorada, não existe nenhum tipo de investigação dos efeitos das MSC-MP em neutrófilos.

Em relação aos linfócitos, a literatura mostra que as MSC inibem a maturação de linfócitos B através da secreção de IL-1RA (Luz-Crawford *et al.*, 2016), além de suprimir a produção de anticorpos através da secreção de CCL2 (Rafei *et al.*, 2008). As MSC ainda inibem diretamente a atividade de linfócitos B através da via da proteína de morte celular programada (PD-1) e do ligante da proteína de morte celular

programada 1 (PD-L1) (Schena *et al.*, 2010). O contato célula-célula entre MSC e linfócitos B também inibe a apoptose em linfócitos B (Healy *et al.*, 2015). Em linfócitos T, as MSC inibem sua ativação e proliferação (Di Nicola *et al.*, 2002; Krampera *et al.*, 2003). A secreção de IL-25 (Wang *et al.*, 2015), indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), e micro RNAs (miRNA) (Gong *et al.*, 2020) por parte das MSC também possui influência sobre os linfócitos T. Ainda, a expressão de proteínas como galectina GAL 1 (Gieseke *et al.*, 2010), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1) (Ren *et al.*, 2010), receptor toll-like (TLR)3, TLR4 (Liotta *et al.*, 2008), PD-L1 (Gu *et al.*, 2013) e ligante da proteína de morte celular programada 2 (PD-L2) (Davies *et al.*, 2017) atuam na imunomodulação dos linfócitos através do contato direto. Os tratamentos com MSC reduzem a proliferação de linfócitos T, ao mesmo tempo que aumentam a eficiência do seu funcionamento, gerando uma resposta imune adequada (Jiang; Xu, 2020; Song; Scholtemeijer; Shah, 2020) (Figura 4).

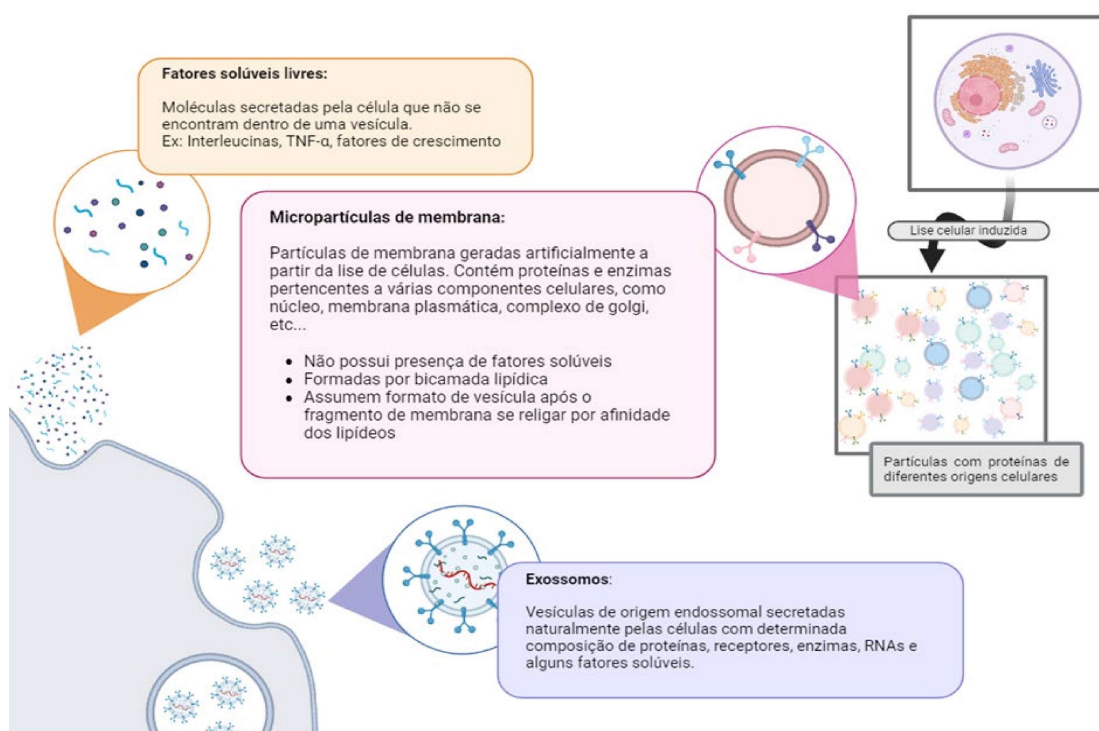


Figura 3 :Diferença na formação e composição de diferentes componentes utilizados nos tratamentos com MSC, representando fatores solúveis livres, micropartículas de membrana e exossomos. Elaborada pela autora. TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa.

Os macrófagos e os monócitos são um componente importante na imunomodulação realizada pelas MSC, visto que se presume que grande parte dos

efeitos de maior magnitude são explicados pela influência de monócitos/macrófagos no local da inflamação (Jiang; Xu, 2020). Em monócitos, o contato com as MSC induz um fenótipo anti-inflamatório através da secreção de IL-10 e PGE-2. Já em macrófagos, a interação de PGE-2 também ocorre por contato direto com as MSC. Além disso, As MSC secretam fatores moduladores como a: proteína induzida por TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) 6 (TSG-6), TGF- β , fator de crescimento de hepatócitos (HGF), IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-12, proteína inflamatório de macrófago (MIP)-1 α . O efeito de todas essas interações é o direcionamento de macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório M2 (Song; Scholtemeijer; Shah, 2020). Outros mecanismos como a fagocitose de MSC também parece promover efeitos modulatórios sobre monócitos e macrófagos, além da produção de miRNAs e transferência de organelas, como mencionado na revisão por (Sant'Ana *et al.*, 2021).

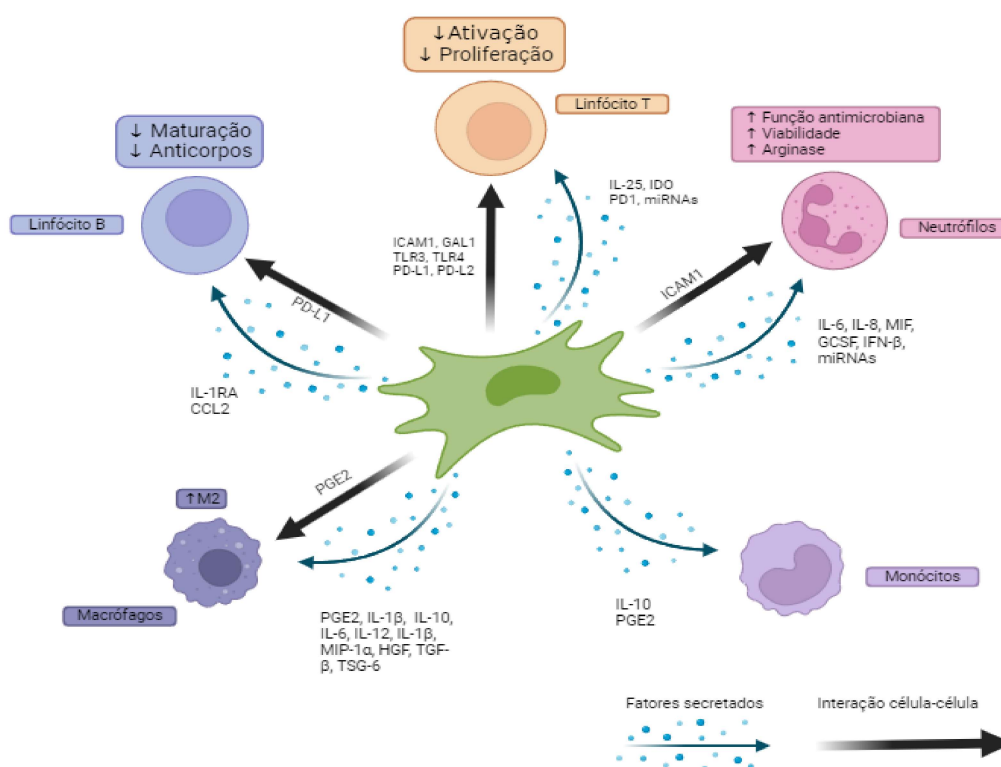


Figura 4: Ilustração com os efeitos das MSC sobre diferentes tipos de células imunes, incluindo o tipo de relação e exemplos de moléculas e interações responsáveis pelos efeitos observados. Abreviações: CCL2 (MCP1): Proteína quimioatrativa de monócitos 1; GAL1: Galectina 1; G-CSF: Fator estimulados de colônias granulocitárias; HGF: Fator de crescimento de hepatócitos; ICAM1: Molécula de adesão intercelular 1; IDO: indoleamina-2,3-dioxigenase; MIF: Fator de inibição da migração de macrófagos; MIP-1 α : Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa; PD1: Proteína de morte programada 1; PD-L1: Ligante 1 da proteína de morte programada; PD-L2 Ligante 2 da proteína de morte programada; PGE2: Prostaglandina E2; TGF- β : Fator de crescimento tumoral beta; TLR: Receptor toll-like; TSG-6: Proteína induzida por TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) 6. Elaborada pela autora

Em relação aos neutrófilos (Figura 5), existem poucos estudos que avaliam sua interação com MSC. Entretanto, um dos efeitos mais conhecidos das MSC sobre os neutrófilos é a extensão da sua viabilidade, o que possibilita um melhor efeito terapêutico (Cassatella *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017). Exossomos secretados por MSC possuem diversos fatores que podem influenciar nesse aumento na viabilidade dos neutrófilos, dentre eles a transferência de mRNAs e miRNAs como o miRNA-21, que atua na via PI3K/AKT (Cheng *et al.*, 2018), conhecida pela regulação de processos como proliferação celular e apoptose. Além disso, o sobrenadante do cultivo de MSC, contém fatores solúveis como G-CSF, IL-6 e interferon beta (IFN- β), capazes de induzir um aumento na viabilidade dos neutrófilos, reduzindo sua apoptose (Cassatella *et al.*, 2011; Raffaghello *et al.*, 2008). Ainda que a maior parte dos estudos relate um aumento na viabilidade dos neutrófilos, Su *et al.* (Su *et al.*, 2019) demonstrou que MSC induzem apoptose em neutrófilos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ressaltando a complexidade das interações dos diferentes tipos de MSC em diferentes condições e ambientes com neutrófilos (que também possuem interações extremamente complexas).

Além dos efeitos na viabilidade, as MSC também aumentam o potencial fagocítico de neutrófilos, melhorando sua capacidade bactericida. Tal interação provavelmente está relacionada com a modulação do eixo de CXCR4, visto que a inibição de seus componentes em MSC e de CXCR4 em neutrófilos diminui significativamente esse efeito (Kwon *et al.*, 2020). Também foi relatado que MSC atuam na regulação da formação de NETs (Zheng *et al.*, 2021), aumentando a sua formação, além de aumentar a produção de ROS pelos neutrófilos (Taghavi-Farahabadi *et al.*, 2020), auxiliando no combate a agentes infecciosos. Ainda assim, existem evidências conflitantes sobre a produção de ROS, que indicam que MSC reduzem a sua produção em neutrófilos (Chu *et al.*, 2023). Como revisado por Aubin *et al.*, 2023, MSC também aumentam a ativação e adesão de neutrófilos, enquanto diminuem a secreção de enzimas classicamente inflamatórias como MPO e elastase de neutrófilo. Também ocorre o aumento da atividade da arginase e aumento na expressão de genes com efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, tornando a interação de MSC com neutrófilos extremamente complexa.

Adicionalmente, as MSC possuem moléculas de adesão em sua membrana que podem interagir com os neutrófilos. Por exemplo, a molécula ICAM1, que é encontrada em MSC, interage com neutrófilos, prevenindo sua morte (Song; Scholtemeijer; Shah, 2020). Ainda que a proteômica das MSC já esteja bem estabelecida (Park; Shin; Kim, 2007), os estudos envolvendo proteínas de membrana das MSC e neutrófilos ainda são muito deficientes, deixando uma lacuna que dificulta o entendimento do mecanismo de imunomodulação de MSC sobre neutrófilos.

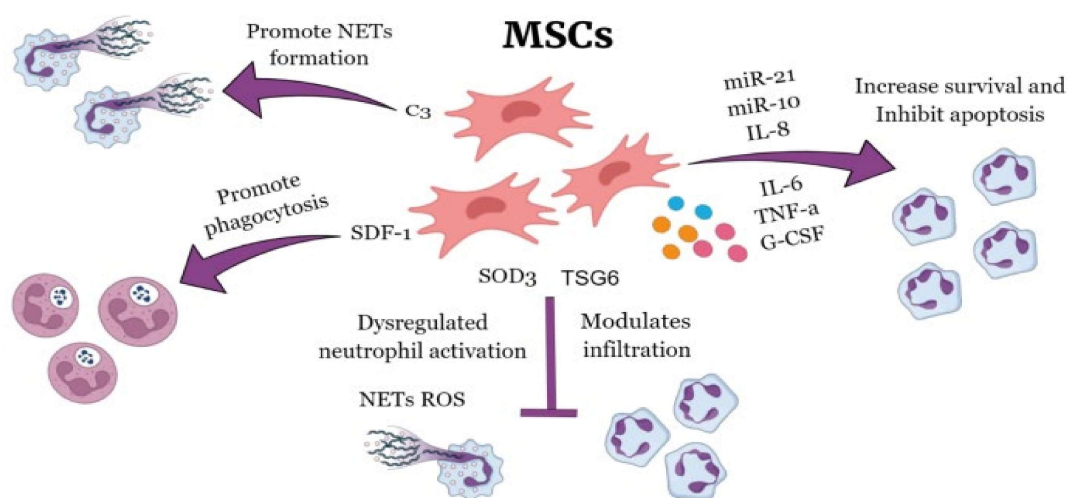


Figura 5: Diferentes efeitos das MSC sobre neutrófilos juntamente com seus principais mecanismos efetores. NET: Armadilha extracelular de neutrófilos; SDF-1: Fator derivado de células estromais 1; SOD3: Superóxido dismutase 3; TSG6: Proteína induzida por TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) 6; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; miRNA: MicroRNA; IL: Interleucina; G-CSF: Fator de crescimento de colônia granulocitária; ROS: Espécies reativas de oxigênio. Fonte: Aubin et al., 2023.

Por fim, ressalta-se a escassa literatura sobre a modulação de neutrófilos MSC, principalmente quando comparados às demais células imunes. Em particular, as interações célula-célula (neutrófilo-MS) são muito pouco exploradas.

2. JUSTIFICATIVA

As células utilizadas no presente trabalho (MSC isoladas de córion - cMSC) não possuem dados publicados em relação a sua interação com neutrófilos, mesmos nos tratamentos convencionais (co-cultura e meio condicionado) nesse sentido o conhecimento gerado na dissertação de mestrado se caracteriza como inédito. Além disso o potencial imunomodulatório das MP-MSC já foi comprovado em in vitro em macrófagos, monócitos, células endoteliais (da Costa Gonçalves *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2017; Merino *et al.*, 2021b, 2021a) e em um modelo animal de colite ulcerativa induzida por DSS em camundongos (Serafini *et al.*, 2023), nos quais os resultados indicaram atividade anti-inflamatória. Ainda assim, uma avaliação mais aprofundada sobre a interação das MP com os diferentes tipos de células imunes é necessária. Dada a grande relevância da atividade dos neutrófilos na imunidade, é de suma importância que se avalie a interação das MP com essas células, a fim de identificar seu potencial terapêutico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos e a interação das células estromais mesenquimais coriônicas, seu meio condicionado e micropartículas em neutrófilos humanos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar e comparar, os seguintes parâmetros nos neutrófilos expostos a diferentes formas de tratamento com cMSC, comparando-os com neutrófilos controle, N1 e N2:

- Influência dos tratamentos na apoptose e viabilidade dos neutrófilos, através de citometria de fluxo com Anexina e Iodeto de propídio e colorimetricamente através da incorporação de vermelho neutro.
- Parâmetros de metabolismo e geração de ROS com MTT
- Atividade da enzima arginase e peroxidase como marcadores anti-inflamatórios e inflamatórios, através de ensaios colorimétricos
- A expressão de PD-L1 como marcador de neutrófilos com perfil imunossupressor por citometria de fluxo
- Alterações morfológicas nucleares e suas correlação com citotoxicidade.

8. REFERÊNCIAS:

- ABOULKHEYR ES, Hamidreza *et al.* Mesenchymal stem cells induce PD-L1 expression through the secretion of CCL5 in breast cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 236, n. 5, p. 3918–3928, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.30135>.
- ABUMAREE, M. H. *et al.* Human Placental Mesenchymal Stem Cells (pMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-inflammatory M2 Macrophages. **Stem Cell Reviews and Reports**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 620–641, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12015-013-9455-2>.
- ARAÚJO, Anelise Bergmann *et al.* Comparison of human mesenchymal stromal cells from four neonatal tissues: Amniotic membrane, chorionic membrane, placental decidua and umbilical cord. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 577–585, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324917304255>.
- AUBIN, Mariana R.; PAZ, Ana H.; ARAÚJO, Anelise B. The Impact of Mesenchymal Stromal Cells on Neutrophils: A Concise Review. **Current Stem Cell Research & Therapy**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 878–891, 2023. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/211292/article>.
- BLANTER, Marfa; GOUWY, Mieke; STRUYF, Sofie. Studying Neutrophil Function in vitro: Cell Models and Environmental Factors. **Journal of Inflammation Research**, [s. l.], v. Volume 14, p. 141–162, 2021. Disponível em: <https://www.dovepress.com/studying-neutrophil-function-in-vitro-cell-models-and-environmental-fa-peer-reviewed-article-JIR>.
- BORREGAARD, Niels *et al.* Human neutrophil granules and secretory vesicles. **European Journal of Haematology**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 187–198, 1993. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0609.1993.tb00629.x>.
- BORREGAARD, Niels. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761310004176>.
- BRANDAU, Sven *et al.* Mesenchymal Stem Cells Augment the Anti-Bacterial Activity of Neutrophil Granulocytes. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. e106903, 2014. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0106903>.
- BRINKMANN, Volker *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, [s. l.], v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1092385>.
- BRITT, Emily C. *et al.* Switching to the cyclic pentose phosphate pathway powers the oxidative burst in activated neutrophils. **Nature Metabolism**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 389–403, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42255-022-00550-8>.
- BURN, Garth Lawrence *et al.* The Neutrophil. **Immunity**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 1377–1391, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761321002508>.
- CAPLAN, Arnold I.; HARIRI, Robert. Body Management: Mesenchymal Stem Cells Control the Internal Regenerator. **Stem Cells Translational Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 695–701, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/stcltm/article/4/7/695-701/6397274>.
- CASSATELLA, Marco A. *et al.* Toll-Like Receptor-3-Activated Human Mesenchymal Stromal Cells Significantly Prolong the Survival and Function of Neutrophils. **Stem Cells**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1001–1011, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/stmcls/article/29/6/1001-1011/6419927>.

CHENG, Xiaofei *et al.* Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-21 via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 261–276, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.13316>.

CHU, Ziqiang *et al.* Novel neutrophil extracellular trap-related mechanisms in diabetic wounds inspire a promising treatment strategy with hypoxia-challenged small extracellular vesicles. **Bioactive Materials**, [s. l.], v. 27, p. 257–270, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452199X23001251>.

COLLINS, SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 1233–1244, 1987. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/70/5/1233/166188/The-HL60-promyelocytic-leukemia-cell-line>.

COLOTTA, F *et al.* Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood**, [s. l.], v. 80, n. 8, p. 2012–2020, 1992. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/80/8/2012/169721/Modulation-of-granulocyte-survival-and-programmed>.

DA COSTA GONÇALVES, Fabiany *et al.* Mesenchymal Stromal Cell Derived Membrane Particles Are Internalized by Macrophages and Endothelial Cells Through Receptor-Mediated Endocytosis and Phagocytosis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.651109/full>.

DAVIES, Lindsay C. *et al.* Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. **Stem Cells**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 766–776, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/stmcls/article/35/3/766-776/6423293>.

DI NICOLA, Massimo *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, [s. l.], v. 99, n. 10, p. 3838–3843, 2002. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/99/10/3838/106967/Human-bone-marrow-stromal-cells-suppress>.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324906708817>.

EICHELBERGER, Kara R.; GOLDMAN, William E. Manipulating neutrophil degranulation as a bacterial virulence strategy. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. e1009054, 2020. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1009054>.

ENGLISH, Karen. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. **Immunology & Cell Biology**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 19–26, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/icb.2012.56>.

EVARD, Maximilien *et al.* Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. **Immunity**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 364–379.e8, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761318300384>.

FRANCK, Thierry *et al.* Muscle Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Activity of the Free and the Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Bond Myeloperoxidase. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 3486, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/12/3486>.

FRESNEDA ALARCON, Michele; MCLAREN, Zoe; WRIGHT, Helen Louise. Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O.

- Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.649693/full>.
- FRIDLENDER, Zvi G. *et al.* Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 183–194, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610809002153>.
- FRIDLENDER, Z. G.; ALBELDA, S. M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe?. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 949–955, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgs123>.
- GE, Jianfeng *et al.* The Size of Mesenchymal Stem Cells is a Significant Cause of Vascular Obstructions and Stroke. **Stem Cell Reviews and Reports**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 295–303, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12015-013-9492-x>.
- GIESEKE, Friederike *et al.* Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. **Blood**, [s. l.], v. 116, n. 19, p. 3770–3779, 2010. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/116/19/3770/28015/Human-multipotent-mesenchymal-stromal-cells-use>.
- GONÇALVES, Fabiany da C. *et al.* Membrane particles generated from mesenchymal stromal cells modulate immune responses by selective targeting of pro-inflammatory monocytes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 12100, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-12121-z>.
- GONG, Bangdong *et al.* Mesenchymal stem cells negatively regulate CD4+ T cell activation in patients with primary Sjögren syndrome through the miRNA-125b and miRNA-155 TCR pathway. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–1, 2020. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2020.11681>.
- GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Alberto *et al.* Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. **World Journal of Stem Cells**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1529–1552, 2020. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v12/i12/1529.htm>.
- GU, Yan-zheng *et al.* Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. **Human Immunology**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 267–276, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885912006490>.
- HAJAM, Younis Ahmad *et al.* Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 552, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/3/552>.
- HALL, Sean R. R. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Improve Survival During Sepsis in the Absence of Heme Oxygenase-1: The Importance of Neutrophils. **Stem Cells**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 397–407, 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/stmcls/article/31/2/397-407/6408014>.
- HEALY, Marc E. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Protect Against Caspase 3-Mediated Apoptosis of CD19 + Peripheral B Cells Through Contact-Dependent Upregulation of VEGF. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 24, n. 20, p. 2391–2402, 2015. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2015.0089>.
- HELLEBREKERS, Pien; VRISEKOOOP, Nienke; KOENDERMAN, Leo. Neutrophil phenotypes in health and disease. **European Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 48, n. S2, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eci.12943>.

HOENDERDOS, Kim; CONDLIFFE, Alison. The Neutrophil in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Too Little, Too Late or Too Much, Too Soon?. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 531–539, 2013. Disponível em: <https://www.atsjournals.org/doi/10.1165/rcmb.2012-0492TR>.

HU, Xiaoyu *et al.* Programming of the Development of Tumor-Promoting Neutrophils by Mesenchymal Stromal Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 1802–1814, 2014. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/362959>.

HUANG, Yutong; WU, Qiang; TAM, Paul Kwong Hang. Immunomodulatory Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 17, p. 10023, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/10023>.

JIANG, Wei; XU, Jianyong. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Cell Proliferation**, [s. l.], v. 53, n. 1, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cpr.12712>.

JOEL, Mbobda Defo Marius *et al.* MSC: immunoregulatory effects, roles on neutrophils and evolving clinical potentials. **American journal of translational research**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 3890–3904, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31312397>.

KALLURI, Raghu; LEBLEU, Valerie S. The biology , function , and biomedical applications of exosomes. **Science**, [s. l.], v. 367, n. 6478, 2020. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aau6977>.

KEAN, Thomas J. *et al.* MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2013, p. 1–13, 2013. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/sci/2013/732742/>.

KESHARI, Ravi S. *et al.* Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 532–540, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.24391>.

KLINGEMANN, Hans; MATZILEVICH, David; MARCHAND, James. Mesenchymal Stem Cells – Sources and Clinical Applications. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 2–2, 2008. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/142333>.

KOBAYASHI, Scott D *et al.* Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage–colony stimulating factor. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 1408–1418, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/jleukbio/article/78/6/1408/6922701>.

KOLACZKOWSKA, Elzbieta; KUBES, Paul. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri3399>.

KRAMPERA, Mauro *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, [s. l.], v. 101, n. 9, p. 3722–3729, 2003. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/101/9/3722/105864/Bone-marrow-mesenchymal-stem-cells-inhibit-the>.

KRAUS, Richard Felix; GRUBER, Michael Andreas. Neutrophils—From Bone Marrow to First-Line Defense of the Innate Immune System. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.767175/full>.

KWON, Min-Young *et al.* Expression of Stromal Cell–Derived Factor-1 by Mesenchymal Stromal Cells Impacts Neutrophil Function During Sepsis. **Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. e409–e417, 2020. Disponível em: <https://journals.lww.com/10.1097/CCM.00000000000004244>.

LACY, Paige. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 98, 2006. Disponível em: <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1710-1492-2-3-98>.

LAWRENCE, Shelley M.; CORRIDEN, Ross; NIZET, Victor. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 82, n. 1, 2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.00057-17>.

LIOTTA, Francesco *et al.* Toll-Like Receptors 3 and 4 Are Expressed by Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Can Inhibit Their T-Cell Modulatory Activity by Impairing Notch Signaling. **Stem Cells**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 279–289, 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/stmcls/article/26/1/279-289/6401857>.

LUZ-CRAWFORD, Patricia *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation. **Stem Cells**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 483–492, 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/stmcls/article/34/2/483-492/6407505>.

MA, Yonggang *et al.* Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 51–61, 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/cvres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvw024>.

MAHMOUDI, Mohammad *et al.* Comparison of the effects of adipose tissue mesenchymal stromal cell-derived exosomes with conditioned media on neutrophil function and apoptosis. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 74, p. 105689, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576919306964>.

MANARA, F Suzi; CHIN, Jean; SCHNEIDER, Donald L. Role of Degranulation in Activation of the Respiratory Burst in Human Neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 489–498, 1991. Disponível em: <https://academic.oup.com/jleukbio/article/49/5/489/6977611>.

MARCHI, L.F. *et al.* In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: Increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 228–235, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576913004979>.

MELBOUCI, Dyhia; HAIDAR AHMAD, Ahmad; DECKER, Patrice. Neutrophil extracellular traps (NET): not only antimicrobial but also modulators of innate and adaptive immunities in inflammatory autoimmune diseases. **RMD Open**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. e003104, 2023. Disponível em: <https://rmdopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/rmdopen-2023-003104>.

MERINO, Ana *et al.* Membrane Particles Derived From Adipose Tissue Mesenchymal Stromal Cells Improve Endothelial Cell Barrier Integrity. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021a. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.650522/full>.

MERINO, Ana *et al.* Membrane particles from mesenchymal stromal cells reduce the expression of fibrotic markers on pulmonary cells. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. e0248415, 2021b. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0248415>.

MIHAILA, Andreea C. *et al.* Transcriptional Profiling and Functional Analysis of N1/N2 Neutrophils Reveal an Immunomodulatory Effect of S100A9-Blockade on the Pro-Inflammatory N1 Subpopulation. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.708770/full>.

- NEELY, Crystal J. *et al.* Flagellin Treatment Prevents Increased Susceptibility to Systemic Bacterial Infection after Injury by Inhibiting Anti-Inflammatory IL-10+ IL-12- Neutrophil Polarization. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e85623, 2014. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0085623>.
- NORDENFELT, Pontus; TAPPER, Hans. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 271–284, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/jleukbio/article/90/2/271/6960218>.
- OHMS, Mareike; MÖLLER, Sonja; LASKAY, Tamás. An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00532/full>.
- PAPAYANNOPOULOS, Venizelos; ZYCHLINSKY, Arturo. NETs: a new strategy for using old weapons. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 513–521, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490609001550>.
- PARK, Hye Won; SHIN, Jun-Seop; KIM, Chan-Wha. Proteome of mesenchymal stem cells. **PROTEOMICS**, [s. l.], v. 7, n. 16, p. 2881–2894, 2007. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200700089>.
- PÉREZ-FIGUEROA, Erandi *et al.* Neutrophils: Many Ways to Die. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.631821/full>.
- PILLAY, Janesh *et al.* In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, [s. l.], v. 116, n. 4, p. 625–627, 2010. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/116/4/625/27467/In-vivo-labeling-with-2H2O-reveals-a-human>.
- PITTENGER, M. F. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, [s. l.], v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.284.5411.143>.
- PRUETT, Stephen B.; LOFTIS, Audrey Y. Characteristics of MTT as an Indicator of Viability and Respiratory Burst Activity of Human Neutrophils. **International Archives of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 189–192, 1990. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/235212>.
- PYLAEVA, Ekaterina; LANG, Stephan; JABLONSKA, Jadwiga. The Essential Role of Type I Interferons in Differentiation and Activation of Tumor-Associated Neutrophils. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 7, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00629/full>.
- RAFEI, Moutih *et al.* Mesenchymal stromal cell–derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. **Blood**, [s. l.], v. 112, n. 13, p. 4991–4998, 2008. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/112/13/4991/24886/Mesenchymal-stromal-cell-derived-CCL2-suppresses>.
- RAFFAGHELLO, Lizzia *et al.* Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. **Stem Cells**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 151–162, 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/stemcells/article/26/1/151-162/6401872>.
- REN, Guangwen *et al.* Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 184, n. 5, p. 2321–2328, 2010. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/184/5/2321/82548/Inflammatory-Cytokine-Induced-Intercellular>.

RINCÓN, Esther; ROCHA-GREGG, Briana L.; COLLINS, Sean R. A map of gene expression in neutrophil-like cell lines. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 573, 2018. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4957-6>.

ROSALES, Carlos. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 377–396, 2020. Disponível em: <https://academic.oup.com/jleukbio/article/108/1/377/6884420>.

SAHOO, Biswa Mohan *et al.* Reactive Oxygen Species (ROS): Key Components in Cancer Therapies. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 215–222, 2022. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/193924/article>.

SALANOVA, Birgit *et al.* The effect of fever-like temperatures on neutrophil signaling. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1–23, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.04-2983fje>.

SANSORES-ESPAÑA, Luis Daniel *et al.* Neutrophil N1 and N2 Subsets and Their Possible Association with Periodontitis: A Scoping Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 20, p. 12068, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/20/12068>.

SANT'ANA, Alexia Nedel *et al.* Effects of living and metabolically inactive mesenchymal stromal cells and their derivatives on monocytes and macrophages. **World Journal of Stem Cells**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1160–1176, 2021. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v13/i9/1160.htm>.

SCHENA, Francesca *et al.* Interferon- γ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 62, n. 9, p. 2776–2786, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.27560>.

SEGAL, Anthony W. HOW NEUTROPHILS KILL MICROBES. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 197–223, 2005. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>.

SERAFINI, Michele Aramburu *et al.* Mesenchymal stromal cell-derived membrane particles: A novel cell-free therapy for inflammatory bowel diseases. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 118, p. 110076, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576923003971>.

SHEN, L *et al.* Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor- β 1. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 149, n. 1, p. 155–161, 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/cei/article/149/1/155/6457753>.

SONG, Na; SCHOLTEMEIJER, Martijn; SHAH, Khalid. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 653–664, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009>.

STOJKOV, Darko *et al.* Physiological and Pathophysiological Roles of Metabolic Pathways for NET Formation and Other Neutrophil Functions. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.826515/full>.

SU, Vincent Yi-Fong *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Induces Neutrophil Apoptosis Associated with Inhibition of the NF- κ B Pathway in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 2208, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2208>.

TAGHAVI-FARAHABADI, Mahsa *et al.* Evaluation of the effects of mesenchymal stem cells on neutrophils isolated from severe congenital neutropenia patients. **International**

Immunopharmacology, [s. l.], v. 83, p. 106463, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576920306615>.

TAGHAVI-FARAHABADI, Mahsa *et al.* Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Exosomes and Conditioned Media Increased Neutrophil Lifespan and Phagocytosis Capacity. **Immunological Investigations**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 1042–1057, 2021. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08820139.2020.1801720>.

TAK, Tamar *et al.* What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 595–601, 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/jleukbio/article/94/4/595/6959340>.

TEJEDA-MORA, Hector *et al.* Proteomic Analysis of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Reconstructed Membrane Particles. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 23, p. 12935, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/12935>.

TI, Dongdong *et al.* LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 308, 2015. Disponível em: <http://www.translational-medicine.com/content/13/1/308>.

TU, Chengshu *et al.* Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Promote Macrophage PD-L1 Expression and Attenuate Acute Lung Injury in Mice. **Current Stem Cell Research & Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 564–575, 2022. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/200576/article>.

WANG, Li-Tzu *et al.* Human Placental MSC-Secreted IL-1 β Enhances Neutrophil Bactericidal Functions during Hypervirulent Klebsiella Infection. **Cell Reports**, [s. l.], v. 32, n. 13, p. 108188, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124720311773>.

WANG, Wei-Bei *et al.* Interleukin-25 Mediates Transcriptional Control of PD-L1 via STAT3 in Multipotent Human Mesenchymal Stromal Cells (hMSCs) to Suppress Th17 Responses. **Stem Cell Reports**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 392–404, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213671115002192>.

WINTERBOURN, Christine C.; KETTLE, Anthony J.; HAMPTON, Mark B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 765–792, 2016. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>.

XIE, Meizhen *et al.* Neutrophil Heterogeneity and its Roles in the Inflammatory Network after Ischemic Stroke. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 621–650, 2023. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/206667/article>.

XU, Yanan; ZHANG, Qian; ZHAO, Yong. The functional diversity of neutrophils and clustered polarization of immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 1212–1214, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41423-020-0378-y>.

YAJUK, Olga *et al.* The PD-L1/PD-1 Axis Blocks Neutrophil Cytotoxicity in Cancer. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1510, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/6/1510>.

YAO, Jia *et al.* Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate rat hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and neutrophil inflammatory response. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 1695–1710, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.201800131RR>.

YAP, Belinda; KAMM, Roger D. Cytoskeletal remodeling and cellular activation during deformation of neutrophils into narrow channels. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 2323–2330, 2005. Disponível em: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/jappphysiol.00503.2005>.

YAZDANI, Hamza O. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Drive Mitochondrial Homeostasis in Tumors to Augment Growth. **Cancer Research**, [s. l.], v. 79, n. 21, p. 5626–5639, 2019. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/79/21/5626/657617/Neutrophil-Extracellular-Traps-Drive-Mitochondrial>.

YIN, Hanlin *et al.* Tumor-associated N1 and N2 neutrophils predict prognosis in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma: A preliminary study. **MedComm**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mco2.183>.

ZHAO, Qinjun; REN, Hongying; HAN, Zhongchao. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. **Journal of Cellular Immunotherapy**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 3–20, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352177515000047>.

ZHENG, Zhiyuan *et al.* Lung mesenchymal stromal cells influenced by Th2 cytokines mobilize neutrophils and facilitate metastasis by producing complement C3. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 6202, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-26460-z>.

ZHU, Yueniu *et al.* Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Improve Survival and Bacterial Clearance in Neonatal Sepsis in Rats. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 26, n. 14, p. 1054–1064, 2017. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2016.0329>.

ZHU, Shuainan *et al.* The emerging roles of neutrophil extracellular traps in wound healing. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 984, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-021-04294-3>.