

Priscila Modesto Silvestre

CARACTERIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ADIPOSAS DE CÃES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título
de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Adj. Rui Seabra Ferreira Junior
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu/SP

2019

Priscila Modesto Silvestre

**CARACTERIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS ADIPOSAS DE CÃES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título
de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Adj. Rui Seabra Ferreira Junior
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu/SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silvestre, Priscila Modesto.

Caracterização do meio de cultura de células tronco mesenquimais adiposas de cães /
Priscila Modesto Silvestre. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade
de Medicina de Botucatu

Orientador: Rui Seabra Ferreira Junior

Coorientador: Lucilene Delazari dos Santos

Capes: 20801017

1. Cães. 2. Células-tronco. 3. Proteômica. 4. Cultura e meios de cultura (Biologia).

Palavras-chave: Células tronco adiposas; Proteômica; Secretoma celular.

Nome do Autor: PRISCILA MODESTO SILVESTRE

Título: CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA CELULAR DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ADIPOSAS DE CÃES

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Rui Seabra Ferreira Junior

Orientador

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP – CEVAP

Dr. Denis Jeronimo Svicero

Médico Veterinário

Dra. Patrícia Rodrigues de Lima

Bióloga

Dra. Luciana Curtolo de Barros

Bióloga

Dra. Clara Reyes Ochoa

Médica Veterinária

Data da defesa: 27 de agosto de 2019.

Botucatu

Dedicatória

Dedico ao meu Pai, a minha mãe e ao meu filho. Ao meu pai que sempre me incentivou a estudar e batalhar pelas coisas que quero. Que sempre ficou ao meu lado em todos os momentos, aqueles que eu comemorava e aqueles que eu desanimava devido às coisas não saírem como eu desejava. Você pai é a pessoa que me fez trabalhar com muito amor e dedicação, pois foi o senhor que me ensinou o que realmente vale a pena na vida. A minha mãe por ter me ajudado a criar meu filho quando precisei me ausentar por causa dos estudos. Ao meu filho, que sem a menos saber, colocou sabedoria em meu caminho e me mostrou o que quero.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, pela vida maravilhosa que tenho e por todos os problemas que vivi, pois sem eles não teria incentivo para melhorar, sempre assim resolvendo-os da melhor maneira possível e aprendendo muito com eles.

A meu orientador, **Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior**, por todo apoio, dedicação, pelas ideias construtivas, pela oportunidade de realizar este trabalho e por todas as cobranças e exigências para que sempre buscássemos resultados cada vez melhores, chegando assim a conclusão de mais uma etapa.

A minha co-orientadora **Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos** que me ensinou a andar com minhas próprias pernas. No primeiro momento me levando pela mão e após me fazendo caminhar sozinha e me auxiliando para que tudo desse certo. Muito obrigada.

A **Bruna Quirino Jorgetto, Solange Sako Cagliari, Regina Celia Spadin e Diego C. B. de Oliveira** pela disponibilidade, paciência e prontidão em ajudar. Muito obrigada!

A **Carlos Magno** muito obrigada pela disponibilidade e por todo suporte.

A minha **mãe**, por ter me ajudado imensamente na criação do meu filho, em que isso me ajudou a fazer todo o meu trabalho com muito mais tranquilidade. Te amo muito!

Ao meu **pai**, sem ele isso não seria possível. Foi ele que sempre me incentivou para que eu estudasse e estudasse e brigou muitas vezes comigo por causa disso. Muito obrigada pelas brigas e pelo companheirismo pai, a sua educação foi esplendorosa. Amo-te muito!

Ao **meu filho** por simplesmente existir!

Aos meus **amigos** pessoais e de trabalho, Luciana, Laudicéia, Francielle, Claudia, Cristiano, Fausto, Patrícia Rodrigue de Lima sem a ajuda de vocês isso não teria acontecido. Obrigada pela força.

Aos **amigos** pessoais, Valéria, Juliana, Lucas, Natalia, Ariela e Thiago que ficaram me ouvindo reclamar ou comemorar quase todos os finais de semana com muita paciência. Obrigada por tudo.

Aos **colegas do laboratório** da FMVZ – UNESP – Botucatu.

Aos **colegas do laboratório** do IB – UNESP – Botucatu, que me deram todo auxílio dedicando seu tempo a me ajudar e ensinar alguns processos desenvolvidos no projeto.

Aos colegas do laboratório da **UNIPEX** por toda ajuda no nosso trabalho.

Aos **funcionários do CEVAP** pelas colaborações e momentos de alegria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

A todos aqueles que por algum descuido não foram mencionados, mas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos.

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota (Theodore Roosevelt)

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Secreção de proteínas - vias secretoras clássicas e alternativas	13
1.2. Secretoma ou Meio Condicionado para tratamento alternativo de patologias	14
1.3. Obtenção de meio de cultura celular	14
1.4. Concentração da amostra	15
1.5. Análises e identificações proteica	15
1.6. Proteômica	16
1.7. Interpretação de dados e verificação de resultados	17
1.8. Mapeando o secretoma de células primárias e células tronco	17
1.9. Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	17
2. OBJETIVO	18
2.1. Objetivos específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Isolamento e expansão CTMAs	19
3.2. Caracterização das células tronco mesenquimais	19
3.3. Diferenciação adipogênica	20
3.4. Diferenciação condrogênica	20
3.5. Diferenciação osteogênica	20
3.6. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford	21
3.7. Digestão Enzimática das proteínas em solução	21
3.8. Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas	21
3.9. Análise dos dados	22
4. RESULTADOS	22
4.1. Isolamento e caracterização das CTMs	22
4.2. Citometria de fluxo	23
4.3. Diferenciação e marcação celular	23
4.4. Avaliação Proteômica	23
4.4.1. Funções das proteínas exclusivas localizadas no meio de cultivo (MC) do controle quando comparado com MC da primeira passagem.	23
4.4.2. Funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da primeira passagem quando comparado com MC controle	25

4.4.3.	Funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 2º passagem quando comparado com o MC da 1º passagem	27
4.4.4.	Funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 3º passagem quando comparada com o MC da 2º passagem	28
5.	DISCUSSÃO	32
6.	CONCLUSÃO	35
7.	REFERÊNCIAS	36

SILVESTRE, P.M. **Caracterização do secretoma celular de células tronco mesenquimais adiposas de cães**. Botucatu, 2019. xp. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, Departamento de Doenças Tropicais, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

RESUMO

Introdução: O secretoma é definido como proteínas liberadas por uma célula, tecido ou organismo por meio de mecanismos de secreções clássicas e não clássicas. Até o momento, as proteínas secretadas com caracterização melhor, são proteínas liberadas pelas células tronco mesenquimais (CTMs), adiposas (CTMAs), neurais e embrionárias entre outras. As CTMAs podem ser facilmente isoladas em grandes quantidades a partir de tecido adiposo obtido por procedimentos cirúrgicos simples. Estas células expressam uma série de proteínas específicas e marcadores fenotipicamente semelhantes às CTMs. Assim como as CTMs, têm o potencial de se diferenciar em linhagens osteogênicas, condrogênicas, miogênicas, neuronais, cardiomiócitos, epiteliais e endoteliais. Avanços recentes no perfil molecular permitiram mapeamento de proteínas secretadas por vários tipos de células. As técnicas oferecem uma ligeira vantagem na detecção de proteínas menos abundantes em meios condicionados. Métodos baseados nas medições de intensidades de pico espectrais de massa foram introduzidos recentemente em conjunto com melhorias na tecnologia de espectrometria de massa e fornecem uma maneira conveniente e confiável em estudos proteômicos. **Objetivo:** O objetivo foi analisar o meio condicionado de CTMAs de cães, por meio da análise proteômica para identificar alvos expressos na solução e avaliar as suas funções. **Métodos:** As CTMAs foram isoladas a partir de tecido adiposo de cães, diferenciadas e caracterizadas por citometria de fluxo em terceira passagem com os marcadores CD34, CD45, CD90 e CD71. As análises *label free* de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC acoplado à um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive. A identificação das proteínas foram submetidas ao software PatternLab (versão 4.0.0.84). A análise da expressão no secretoma destas células permitiu avaliar relações com proliferação e interação celular, sinalizações, além de modulação do sistema imune e angiogênese. Este conhecimento possibilitará aplicações do secretoma e não mais das células tronco, minimizando assim possíveis riscos de imunogenicidade, questões éticas e regulatórias.

Palavras chaves: secretoma celular, células tronco adiposas, proteômica

ABSTRACT

Introduction: Secretoma is defined as proteins released by a cell, tissue or organism through mechanisms of classical and non-classical secretions. So far, the best characterized secreted proteins are proteins released by mesenchymal stem cells (MSCs), adipose (MSCs), neural and embryonic stem cells among others. CTMAs can be easily isolated in large quantities from adipose tissue obtained by simple surgical procedures. These cells express a series of specific proteins and markers phenotypically similar to MSCs. Like MSCs, they have the potential to differentiate into osteogenic, chondrogenic, myogenic, neuronal, cardiomyocyte, epithelial and endothelial strains. Recent advances in molecular profiling have allowed mapping of proteins secreted by various cell types. The techniques offer a slight advantage in detecting less abundant proteins in conditioned media. Methods based on measurements of mass spectral peak intensities have recently been introduced in conjunction with improvements in mass spectrometry technology and provide a convenient and reliable way for proteomic studies.

Objective: The objective was to analyze the conditioned medium of dog CTMAs by shotgun proteomic analysis to identify targets expressed in the solution and to evaluate their functions.

Methods: CTMAs were isolated from dog adipose tissue, differentiated and characterized by third pass flow cytometry with markers CD34, CD45, CD90 and CD71. Label free mass spectrometry analyzes were performed using an Ultimate 3000 LC liquid nanochromatography equipment coupled with a Q-Exactive mass spectrometry equipment. Protein identification was submitted to PatternLab software (version 4.0.0.84). The analysis of the expression in the secretome of these cells allowed to evaluate relations with cell proliferation and interaction, signaling, besides modulation of the immune system and angiogenesis. This knowledge will enable applications of the secretoma rather than stem cells, thus minimizing possible risks of immunogenicity, ethical and regulatory issues.

Keywords: cellular secretoma, adipose stem cells, proteomics

1 - Introdução

Células de mamíferos proliferam, diferenciam-se, sobrevivem e acabam morrendo no microambiente chamado de "nicho", que é formado por células, matriz extracelular e fatores solúveis (Discher et al., 2009; Schofield, 1978). O contato dinâmico com o nicho tem um impacto direto no fenótipo celular e é um regulador chave da especificação celular durante o desenvolvimento embrionário, bem como durante a proliferação e diferenciação celular durante a renovação tecidual no período pós-natal e na vida adulta (Lensch et al., 2006; Voog e Jones, 2010).

As moléculas segregadas medeiam a interação intercelular a curtas distâncias através do espaço intersticial ou entram nos fluidos corporais tais como plasma sanguíneo ou fluido cerebrospinal e participam na manutenção da homeostase ao nível de órgãos, sistemas ou mesmo todo o organismo. As proteínas secretadas constituem uma importante classe de moléculas, codificadas por aproximadamente 10% do genoma humano (Pavlou e Diamandis, 2010).

Proteínas segregadas típicas incluem proteínas do soro como por exemplo a albumina, imunoglobulinas de transferrina, proteases da matriz extracelular, como por exemplo os colágenos, proteoglicanos, fibronectina, lamininas e enzimas digestivas como tripsina ou proteínas do leite (Lodish et al., 1999). As proteínas secretadas, pouco abundantes mas altamente bioativas, representadas por fatores de crescimento, hormônios, citocinas ou proteases de processamento de matriz extracelular desempenham um papel na regulação da renovação e diferenciação celular (Skalnikova et al., 2011).

Várias combinações de fatores solúveis, incluindo o crescimento desses fatores são comumente usados *in vitro* para manter a proliferação celular ou diferenciação direta para um tipo de célula específica. Curiosamente, as células sob certas condições são capazes de escapar de seu destino original e se transdiferenciar em um tipo de célula distinta, um fenômeno descrito como "plasticidade celular" (Watt e Hogan, 2000). Essa possibilidade de derivar tipos celulares específicos por transdiferenciação *in vitro*, poderia ser utilizada na substituição de tecidos, bem como em terapias baseadas em células para vários distúrbios humanos. A fim de superar as principais questões relacionadas ao transplante, incluindo a disponibilidade e imunocompatibilidade das células do doador, há esforços renovados para usar as próprias células do paciente, como células tronco mesenquimais derivadas da medula (CTMs) células tronco adiposas (CTAs) ou células tronco pluripotentes induzidas (CTPIs) (Zeidan-Chulia e Noda, 2009; Salewski et al., 2010).

Entendendo o papel dos fatores secretados que mantem a proliferação ou a diferenciação direta desses tipos de células *in vitro* é, portanto, um pré-requisito fundamental para derivação de uma população celular específica adequada para terapias de transplante. Até agora, as células proliferaram principalmente *in vitro* em

cultura de células pela adição de soro ou combinações e concentrações empíricas de vários fatores de crescimento e outras proteínas (Eshghi e Schaffer, 2008; Grivennikov, 2008). Tais combinações estão sendo experimentadas atualmente e uma combinação resultante "afinada" continua a ser elucidada (Skalnikova et al., 2011).

Avanços recentes no perfil molecular permitiram mapeamento de proteínas secretadas por vários tipos de células. Esforços significativos foram direcionados à caracterização de proteínas secretado pelas células cancerígenas, revisto nos trabalhos de Pavlou e Diamandis, 2010; Xue et al., 2008; Maurya et al., 2007, para descobrir novos biomarcadores que podem ser detectados no plasma sanguíneo ou urina do paciente e pode ser potencialmente usado em diagnósticos de câncer, bem como monitoramento da terapia. Uma cultura celular primária isolada diretamente do tecido do doador e mantida *in vitro* com passagens limitadas se assemelharia mais e imitaria as condições *in vivo* e, portanto, é muito mais adequada para estudos simulados de fatores secretados e seu papel na regulação da proliferação e diferenciação celular na haste da pesquisa de células. Em alguns casos, o secretoma fornecido pelo tecido como um todo, acessível por cultura de tecidos, pode ser vantajoso ao fornecer informações mais relevantes sobre a situação *in vivo* (Alvarez-Llamas et al., 2007; Gajendran et al., 2002).

1.1 - Secreção de proteínas - vias secretoras clássicas e alternativas

O secretoma é definido como proteínas liberadas por uma célula, tecido ou organismo através de mecanismos de secreções clássicas e não clássicas. No clássico, também referido como via de secreção convencional, as proteínas recém-sintetizadas são translocadas para o lúmen do retículo endoplasmático transportadas através do complexo de Golgi e liberadas por exocitose (Van Vliet et al., 2003).

Os RNAs mensageiros que codificam essas proteínas contêm uma sequência sinalizadora que direciona o ribossomo para a membrana da matriz extracelular durante a tradução e inicia o transporte do polipeptídeo em crescimento através da membrana em lúmen do retículo endoplasmático.

Uma sequência de sinal do retículo endoplasmático é tipicamente amino-terminal e contém um ou mais aminoácidos carregados positivamente seguidos por um trecho contínuo de 6-12 resíduos hidrofóbicos. As sequências de sinal não são normalmente encontradas em polipeptídeos completos feitos em células, implicando que a sequência de sinal é clivada da proteína enquanto continua a crescer no ribossomo (Lodish et al., 1999).

Vários reguladores cruciais da resposta imune, crescimento celular, diferenciação e angiogênese são secretados sem um peptídeo sinal através da chamada via não clássica, que não segue a rota clássica através do retículo endoplasmático e Complexo de Golgi. Exemplos bem conhecidos incluem fator de crescimento de fibroblastos (bFGF), lectinas específicas de b-galactosídeo (galectina 1, galectina 3) e

certos membros da família das interleucinas (por exemplo, IL-1b). Para a secreção de tais proteínas, alguma atividade da caspase-1 é necessária (Nickel e Rabouille, 2009). Diversas ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas para prever a presença de um sinal de secreção ou prever a localização extracelular da proteína. Ferramentas adicionais de software aplicáveis para previsão da localização de proteínas dentro da célula estão agora disponíveis (Emanuelsson et al., 2007).

1.2 - Secretoma ou Meio Condicionado para tratamento alternativo de patologias

As células possuem grandes possibilidades terapêuticas no tratamento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer. As suas secreções interagem com outras células e influenciam os tecidos adjacente. Assim muitas evidências suportam o uso destas secreções para melhorar as interações celulares desejadas como, crescimento, proliferação e migração (Makridakis et al., 2013). Entretanto seu uso enfrenta uma série de problemas incluindo, alto custos, segurança, necessidade de expertise para manejo e procedimentos invasivos para sua coleta. Além disso, a sobrevivência celular dependendo do arcabouço é limitada em apenas algumas semanas (Kinnaird et al., 2004).

1.3 - Obtenção de meio de cultura celular

O isolamento de células e a conformação de culturas celular têm uma forte influência na qualidade das células e dos meios condicionados por células e na detecção das proteínas secretadas. Os principais desafios incluem a obtenção da população celular pura do tecido do doador, minimizando o estresse celular. Além disso, a sobrevivência da maioria dos tipos celulares *in vitro* é fortemente dependente da presença de soro no meio de cultura celular, o que frequentemente dificulta a análise proteômica subsequente de proteínas secretadas de baixa abundância. Assim, as células são frequentemente incubadas em meios livres de soro por várias horas (normalmente de 18 a 48 horas) para reduzir a complexidade, evitando interferências de proteínas nutricionais presentes nos meios, aumentando a reprodutibilidade e permitindo a detecção de proteínas de baixa abundância (Planque et al., 2009).

A lavagem das células e frascos de cultura durante a troca de meio de cultura padrão contendo soro para meio isento de soro não pode ser omitido, uma vez que desempenha um papel importante na remoção de proteínas séricas contaminantes da amostra. Para a remoção da proteína sérica, etapas de lavagem prolongadas podem ser necessárias e, em alguns casos, podem durar várias horas.

Por exemplo, no estudo do secretoma do tecido adiposo visceral, os passos de lavagem e os intervalos de tempo de condicionamento foram otimizados para remover as proteínas do soro originadas do tecido adiposo e prevenir a presença de proteínas celulares das células mortas. A melhor remoção de soro foi alcançada em 1 h de incubação de células em meio isento de soro, seguido por incubação durante a noite e

uma incubação de 8 h ou duas de 4 h, antes da adição do novo meio sem soro para condicionamento (Alvarez-Llamas et al., 2007).

Além disso, a seleção do tampão de lavagem e o tempo de lavagens podem influenciar no fenótipo celular e, assim, no secretoma. Com base na observação de Dowell e colaboradores em 2009 a solução salina tamponada com fosfato (PBS) comumente usada adequadamente para a lavagem de astrócitos, pois contem à astrogliose reativa. Tal ativação de astrócitos não foi detectada quando as células foram lavadas em solução salina de equilíbrio de Hank (Dowell et al., 2009). A lavagem de células em meio isento de soro pode ser outra alternativa. O número de células e a viabilidade devem ser avaliadas no final do condicionamento, pois a porcentagem de células vivas e mortas, e as células progredindo para apoptose na população, podem ter um papel crucial na constituição da amostra secretoma (Skalnikova et al., 2011).

1.4 - Concentração da amostra

Como as proteínas secretadas são produzidas em pequenas quantidades e diluídas no meio de cultura, reduzir o volume da amostra e a concentração das proteínas antes da análise pode ser necessário. A amostra pode ser efetivamente concentrada por liofilização ou centrifugação a vácuo sozinha ou em combinação com a etapa de dessalinização (Lim e Bodnar, 2002; Bendall et al., 2009). Os dois métodos mais aplicados para a concentração proteica representada pela precipitação de proteínas pelo ácido tricloroacético e ultrafiltração foram comparados por Dowel e colaboradores em 2009. A precipitação do ácido tricloroacético com o transportador lauroil-sarcosinato de sódio resultou em perda significativa da amostra, enquanto a ultrafiltração resultou em uma boa recuperação da amostra (Dowel et al., 2009). Métodos adicionais baseados em colunas cromatográficas têm sido utilizados para a concentração de proteínas, como ligação de proteínas à coluna de extração de balanço hidrofílico-lipofílico (Yoon et al., 2009) ou ligação à resina de sílica em fase sólida com grupos hidroxila (resina StrataClean) (Canals et al., 2006). A resina StrataClean produziu a maioria das proteínas e também pontos no gel 2-D quando comparada com a ultrafiltração (5 kDa de peso molecular) e a precipitação de ácido tricloroacético (Canals et al., 2006).

1.5 - Análises e identificações proteica

No perfil de proteínas secretadas em geral, a base de gel ou independente de gel, técnicas são rotineiramente usadas para separação de proteínas e peptídeos. Devido à sua abundância relativamente baixa, alta moléculas bioativas como fatores de crescimento, citocinas ou hormônios peptídicos são frequentemente difíceis de identificar usando técnicas convencionais baseadas em gel. As técnicas independentes de gel parecem oferecer uma ligeira vantagem na detecção de proteínas menos abundantes

em meios condicionados, bem como a possibilidade de combinação de identificação de peptídeos com quantificação isobárica.

A estratégia adicional não convencional de DIMAL-K (diferença na análise de massa usando lisina marcada) para quantificação foi utilizada por Delcourt e colaboradores na análise de secretoma de astrócito (Delcourt et al., 2005). Métodos de quantificação livres de marcadores, baseados nas medições de intensidades de pico espectrais de massa ou contagens espectrais, foram introduzidos recentemente em conjunto com melhorias na tecnologia de espectrometria de massa e fornecem uma maneira conveniente e confiável em estudos proteômicos diferenciais (Xu et al., 2008).

1.6 - Proteômica

Atualmente existe um esforço da proteômica em desvendar a secreção de proteínas ósseas pelas células tronco e caracterizar moléculas responsáveis pelos mecanismos imunomodulatórios, antiinflamatório, angiogênico etc. Cada estágio e cada condição que a célula se encontra há uma alteração destas proteínas (Makridakis et al., 2013).

O secretoma das CTMs tem sido estudado pela proteômica que revelou grande parte das citocinas presentes no meio que são moduladores da resposta inflamatória e angiogênese. A secreção das CTMs originárias de rato e a CTMs originária de humanos obtiveram uma semelhança de 62% demonstrando uma assinatura comum entre estes dois meios de cultivo. As CTMhs foram mais eficazes em induzir a diferenciação de macrófagos. A presença de muitos componentes torna difícil a caracterização funcional de cada qual e sugere o efeito auto regulatório deles. As metaloproteinases, por exemplo, possuem um efeito anti angiogênico e estão presente em maior quantidade no meio das CTMhs (Maffioli et al., 2017).

Uma grande variedade de citocinas, fatores de crescimento, hormônios, proteínas extracelulares e enzimas tem sido encontradas usando a proteômica. A investigação do secretoma e as vesículas das CTMs podem ajudar no tratamento de grande número de doenças e este pode ser o caminho do futuro das pesquisas devido a seu enorme potencial terapêutico (Chen et al., 2008). Os meios de cultivos possuem um pool de proteínas moduladoras e muitas delas possivelmente ainda não foram catalogadas. O seu uso torna muito mais atrativo que proteínas isoladas, pois atendem melhor a complexidade da biologia do osso. Diferentes estágios de diferenciação das CTMs geram diferentes meios de cultivos, cada qual pode possuir um potencial terapêutico diferentes para cada tecido do organismo (Chen et al., 2008).

1.7 - Interpretação de dados e verificação de resultados

Os resultados obtidos a partir de estudos proteômicos, necessitam de interpretação cuidadosa e métodos adicionais para verificação de dados. Usando as

ferramentas de predição computacional, caracteristicamente apenas metade das proteínas identificadas por abordagens proteômicas em vários secretomas são preditas como sendo secretadas. Estudos adicionais são necessários para validar a localização das proteínas presentes no secretoma e para proteínas secretadas de artefatos potenciais devido à preparação da amostra (Skalnikova et al., 2011).

1.8 - Mapeando o secretoma de células primárias e células tronco

Proteínas secretadas por células primárias isoladas de vários tecidos e células tronco de humanos, camundongos, ratos e suínos foram recentemente identificadas. Até o momento, as proteínas secretadas com caracterização melhor são proteínas liberadas pelas CTMs, células adiposas, astrócitos, células tronco neurais, células tronco embrionárias e células alimentícias de fibroblastos, seguidas de cardiomiócitos, células endoteliais e células do musculo esquelético (Skalnikova et al., 2011).

1.9 - Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

As células adiposas desempenham um papel central na patogênese da obesidade e de suas doenças relacionadas, como diabetes tipo II, dislipidemia, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer pela secreção de fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos (Chen et al., 2005). Simultaneamente, o tecido adiposo é capaz de influenciar as funções neuroendócrinas, endoteliais, imunológicas, hematológicas, angiogênicas e vasculares de maneira endócrina, parácrina e autócrina e espera-se que essas funções possam ser, entre outras, mediadas por células tronco ou estromais adiposas (Salgado et al., 2010).

As CTAs podem ser facilmente isoladas em grandes quantidades a partir de tecido adiposo obtido por procedimentos cirúrgicos simples, o que torna as CTAs bastante atraentes tanto para pesquisas quanto para aplicações biomédicas (Salgado et al., 2010). As CTAs expressam uma série de proteínas específicas de células e marcadores CD fenotipicamente semelhantes às células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e, similarmente às CTMs, têm o potencial de se diferenciar em linhagens osteogênicas, condrogênicas, miogênicas, neuronais, cardiomiócitos, epiteliais e endoteliais (Salgado et al., 2010). Além dos adipócitos, o tecido adiposo contém células endoteliais, macrófagos e fibroblastos (fração estromal) que pode modular o padrão geral de secreção do tecido (Skalnikova et al., 2011).

Diferentes marcadores de superfície, como CD29, CD44 e CD90 foram utilizados para caracterizar o tecido adiposo canino em CTMAs (Kang et al., 2012; Screven et al., 2014; Vieira et al., 2010). Outros marcadores, como os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45, precisam estar ausentes ou ter uma expressão muito baixa (Kang et al., 2012; Screven et al., 2014). Há disponibilidade limitada de reagentes de citometria de

fluxo específicos para caninos, assim, na maioria dos casos, são utilizados anticorpos específicos para humanos ou camundongos que possuem reatividade cruzada com caninos. No entanto, um problema é que a reatividade cruzada resulta em diferentes proporções de células positivas para uma variedade de marcadores; assim, há controvérsia sobre quais marcadores de superfície são mais apropriados para CTMs caninas (Requicha et al., 2012; Screven et al., 2014).

Inicialmente, a fonte mais comum de CTMs era a medula óssea (Strem et al., 2005), mas atualmente, a fonte de tecido adiposo, descrito pela primeira vez por Zuk e colaboradores em 2001 é mais comumente estudado. As CTMs têm várias vantagens sobre as derivadas da medula óssea, com o uso de tecido adiposo resultando em uma maior quantidade de CTMs e também tem maior capacidade proliferativa (Strem et al., 2005; Requicha et al., 2012). Além disso, o método de extração do tecido adiposo é menos invasivo (Kang et al., 2012) e CTMs conservam seu estado indiferenciado durante mais passagens (Lee et al., 2014).

Essas características motivaram pesquisadores a concentrar-se no tecido adiposo como uma fonte segura e conveniente de CTMs para uso em medicina regenerativa (Guercio et al., 2013, Kang et al., 2012). Vários estudos em humanos e modelos animais compararam as características das CTMs derivadas de diferentes locais anatômicos, como as áreas subcutânea e visceral.

Estudos de multipotencialidade em CTMs de ambas as origens mostraram resultados contrastantes em relação à capacidade de diferenciação e capacidade de propagação *in vitro* (Baglioni et al., 2009; Peptan et al., 2006; Requicha et al., 2012).

2 - Objetivo

Caracterizar o secretoma de CTMs do tecido adiposo de cães por meio de análise proteômica.

2.1 - Objetivos específicos

- Padronizar a análise do secretoma das CTMs;
- Identificar os fatores liberados pelas CTMs;
- Analisar o proteoma do meio condicionado de células multipotentes mesenquimais de tecido adiposo;
- Identificar proteínas diferentemente expressas que possam sugerir a melhor aplicação para uma determinada abordagem terapêutica.

3 - Material e métodos

Os procedimentos realizados nesse experimento foram avaliados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob o número 1290/2019.

3.1 - Isolamento e expansão CTMAs

Aproximadamente 2 a 7 g de tecido adiposo foram fracionados em pequenos pedaços e lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) duas vezes.

O tecido adiposo colhido foi acondicionado em tubos falcon contendo meio completo de DMEM (DMEM; Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado com Soro Fetal Bovino (20%) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA), 10 µL /ml de solução de penicilina/ estreptomicina (Gibco Laboratories) e 3 µg/ml of anfotericina B (Gibco Laboratories). Em câmara de fluxo no laboratório de cultivo, o tecido foi colocado em tubo falcon com PBS + penicilina/ estreptomicina + anfotericina B por 10 minutos, para lavar o tecido. Em seguida o tecido foi cortado em fragmentos menores em uma placa de petri e colocado em tubos falcon com collagenase 0,04% (4 mg de collagenase em 10 mL de PBS).

O tecido com collagenase foi colocado no banho-maria a 37 °C por 50 minutos, até a digestão do tecido. Após a digestão, o material foi passado num filtro de 70 micrometros (BD), e centrifugado a 10 minutos por 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* celular foi adicionado 1 mL de meio completo de DMEM. As células foram distribuídas nos frascos de cultivo celular (75cm²) e foram acondicionadas em estufa de cultivo celular a 37,5°C e 5% de CO₂. Após 5 dias o meio de cultivo foi trocado e as trocas foram realizados 2 vezes por semana. Quando as células atingirem 80% de confluência foi realizada a primeira passagem celular. O acompanhamento do crescimento e aderência celular foram realizados por contagem em câmara de Neubauer no microscópio invertido.

3.2 - Caracterização das células tronco mesenquimais

A caracterização imunofenotípica foi realizada nas células em passagem 3 na concentração de 1x10⁶ processadas no equipamento FACSCalibur BD®. Os marcadores utilizados foram CD34, CD45, CD90 (Thy-1) e CD71

3.3 - Diferenciação adipogênica

Para diferenciação adipogênica, as células de cada grupo foram submetidas, separadamente, à ação da tripsina e plaqueadas na densidade de 1x10⁴ células/cm², em seis repetições em placas de seis poços. Após a obtenção de 60 a 70% de confluência

celular, o meio basal foi substituído por meio adipogênico, que é constituído de DMEM enriquecido com soro fetal bovino (10%), dexametasona (1 μ M), insulina (10 μ L/mL), indometacina (100mM) e isobutilmetilxantina (500mM). Em seguida, foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 21 dias e o meio de cultura foi trocado a cada quatro dias. Transcorrido esse período, as células foram fixadas em formalina 10% por 60 minutos, coradas pela técnica de Oil Red e avaliadas por microscopia óptica, para confirmação da diferenciação adipogênica.

3.4 - Diferenciação condrogênica

Para diferenciação condrogênica, as células de cada grupo foram submetidas, separadamente, à ação da tripsina, 1x10⁴ células de cada grupo foram semeadas em tubos falcon de 15 mL e cultivadas em meio basal por 24 horas. Após esse período, o meio basal foi substituído por meio condrogênico, que é constituído de DMEM enriquecido com soro fetal bovino (1%), albumina sérica bovina (0,0125g/mL), piruvato (100 μ M), insulina (6,25 μ g/mL), transferrina (6,25 μ g/mL), ácido ascórbico (50 μ gM), dexametasona (100nM) e TGF- β 1 (10ng/mL). Em seguida, as células foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 21 dias e o meio de cultura foi trocado a cada quatro dias. Transcorrido esse período, os *pellets* celulares foram fixados em formalina 10% por 60 minutos e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Cortes histológicos com 5,0 μ m de espessura foram corados pela técnica de PAS e avaliados por microscopia óptica, para confirmação da diferenciação condrogênica.

3.5 - Diferenciação osteogênica

Para diferenciação osteogênica, as células de cada grupo foram submetidas, separadamente, à ação da tripsina e plaqueadas na densidade de 1x10⁴ células/cm², em seis repetições em placas de seis poços (Techno Plastic Products in Trasadingen, Alemanha). Após a obtenção de 60 a 70% de confluência celular, o meio basal foi substituído por meio osteogênico, que é enriquecido com ácido ascórbico (50 μ g/mL), β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich, USA) (10 mM) e dexametasona (Aché, Brasil) (0,1 μ M), acrescido de 10% de soro fetal bovino. Em seguida, as células foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 21 dias. Ao término desse período, as culturas foram fixadas em álcool 70% por 24 horas, coradas pelo método de Von Kossa adaptado de Alves et al. (6) e avaliadas por microscopia óptica, para confirmação da diferenciação osteogênica.

3.6 - Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

As proteínas presentes nas amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o kit BioRad® Protein Assay (cod. 500-0001), tendo albumina bovina (BSA), como proteína padrão.

3.7 - Digestão Enzimática das proteínas em solução

Primeiramente, 50µg de proteínas totais liofilizadas foram diluídas em 60µL de bicarbonato de amônio 50 mM e em seguida, 25µL do surfactant Padrao RapiGest SF (código 186001861, Waters) foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas à 37°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas às etapas de redução e alquilação, utilizando DTT 10 mM e iodoacetamida 45 mM, respectivamente. A digestão enzimática em solução foi realizada por meio da enzima tripsina na concentração 1:100 (enzima: amostra) solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorrerá durante 18 horas e foi interrompida com a adição de 10µL de ácido fórmico 5% (v/v). As amostras foram encubadas por 90 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, centrifugadas à 14.000xg à 6°C por 30 minutos. O sobrenadante foi removido para um tubo novo. Os digestos trípticos contido em cada amostra foram submetidos às colunas de dessalinização Peptide Cleanup C18 Spin (código 5188-2750 Agilent Technologies) segundo as recomendações do fabricante.

3.8 - Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas

As análises *labell free* de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado à um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: A) ácido fórmico 0,1% [v/v] em água LCMS e B, ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v]. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30µm x 5mm (Código 164649, ThermoFisher Scientific), e desalinizados num gradiente isocrático de 4%B por 3 minutos à um fluxo de 300 nL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica Reprosil-Pur C18-AQ, 3µm, 120 Å, 105mm, Código 1PCH7515-105H354-NV, PICOCHIP) utilizando um gradiente linear de 4-55%B por 30 min, 55% à 90%B por 1 min, mantido à 90%B por 5 minutos e reequilibrado à 4%B por 20 minutos à um fluxo de 300 nL/min. A ionização foi obtida utilizando uma fonte Nanospray ion source (PICOCHIP). O modo de operação foi ionização positiva utilizando o método DDA. Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 à m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 a 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10s. Os dados de espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

3.9 - Análise dos dados

Os dados brutos no formato RAW foram submetidos ao software PatternLab (versão 4.0.0.84 [Carvalho et al, 2016]) para a obtenção da identificação das proteínas. Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram: banco de dados Swiss-Prot

(taxonomia *Equus caballus*); enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS 40 ppm e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (*Falso Discovery*) máxima foi considerada de < 1%.

4 – Resultados

4.1 – Isolamento e caracterização das CTMs

As células foram usadas na terceira passagem na concentração de 1×10^6 quando apresentavam confluência. As células demoraram aproximadamente 3 a 7 dias para atingir a confluência e sofrer nova tripinização. Antes de serem usadas foi feita a contagem celular com auxílio de uma câmara de Neubauer. As características morfológicas das CTMs podem ser verificadas na figura 1.

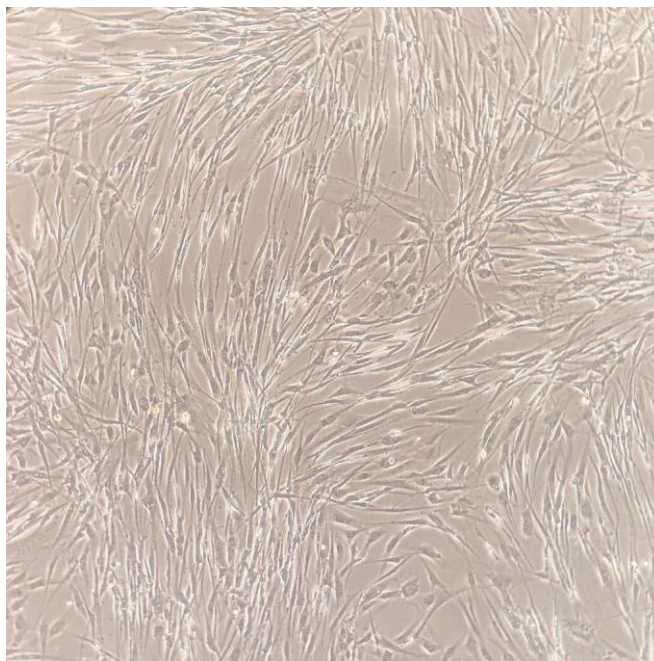


Figura 1 – Cultura primária de células tronco mesenquimais aderidas, células confluentes com morfologia fusiforme.

4.2 – Citometria de fluxo

A análise da intensidade da fluorescência dos histogramas demonstrou ausência dos antígenos CD34 e CD45 de origem hematopoiética e expressão positiva das moléculas de adesão CD90 (Thy-1) e do marcador de proliferação e ativação celular CD71 (*transferrin receptor*), confirmando a origem mesodermal das células tronco mesenquimais caninas.

4.3 – Diferenciação e marcação celular

A diferenciação celular foi realizada em passagem 3. Todas as amostras de CTMAs caninas apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica conforme a figura 2.

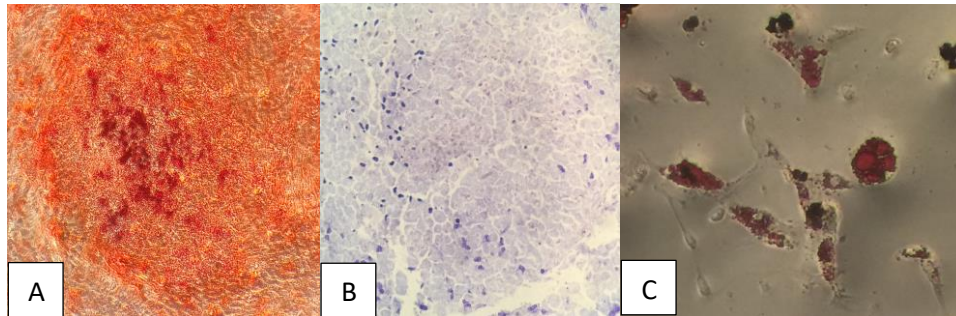


Figura 2 – Células tronco mesenquimais diferenciadas em osteócitos (A); em condrócitos (B); em adipócitos (C).

4.4 Avaliação Proteômica

4.4.1 – Funções das proteínas exclusivas localizadas no meio de cultivo (MC) do controle quando comparado com MC da primeira passagem.

No meio de cultivo das CTMAs de meio de cultivo foram identificadas exclusivamente as seguintes proteínas com as respectivas funções:

1. **Plasmina:** responsável dissolve a fibrina dos coágulos sanguíneos e atua como um fator proteolítico em uma variedade de outros processos, incluindo desenvolvimento embrionário, remodelação tecidual, invasão tumoral e inflamação. Na ovulação, enfraquece as paredes do folículo de Graaf. Ele ativa o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase, collagenases e vários zimogênios complementares, como C1 e C5. A clivagem de fibronectina e laminina leva ao descolamento celular e apoptose. Também cliva fibrina, trombospondina e fator von Willebrand. Seu papel na remodelação tecidual e na invasão tumoral pode ser modulado pelo CSPG4.
2. **Proteína alfa-2-macroglobulina-like 1:** exibe atividade inibitória contra a quimotripsina, papaína, termolisina, subtilisina A e, em menor escala, a elastase, mas não a tripsina. Pode desempenhar um papel importante durante a descamação pela inibição de proteases extracelulares.
3. **Stonin-2:** é uma proteína envolvida na reciclagem de vesículas sinápticas. Pode facilitar a remoção de vesículas revestidas com clatrina.
4. **Isoforma de proteínas que interagem com o homólogo 2-mutante X1:** é um ativador de GTPase.
5. **Alfa fetoproteína:** conecta cobre, níquel e ácidos graxos.
6. **Potássio ativado por cálcio de pequena condutância pela isoforma de proteína de canal 2 X2:** forma um canal de potássio independente de voltagem ativado pelo cálcio

intracelular. A ativação segue-se da hiperpolarização da membrana. Ela regula a excitabilidade neuronal, contribuindo para o componente lento da hiperpolarização sináptica. O canal está bloqueado por apamina.

7. **Vitronectina:** é fonte de ligação polissacarídica e tem atividade do receptor scavenger.
8. **Fetulina B:** é um inibidor de protease necessário para a fertilização do ovo. Necessário para prevenir o endurecimento prematuro da zona pelúcida antes da fertilização, provavelmente pela inibição da atividade de protease da ASTL, uma protease que medeia a clivagem da ZP2 e desencadeia o endurecimento da zona pelúcida.
9. **Calsinténina 2:** atua na ligação ao íon de cálcio, adesão de células homofílicas através de moléculas de adesão da membrana plasmática, na regulação positiva da montagem de sinapses e na regulação positiva da transmissão sináptica.
10. **Serpina A3-2:** tem atividade inibidora da endopeptidase do tipo serina e trabalha na regulação negativa da atividade da endopeptidase.
11. **Antitrombina III (AT-III):** é um inibidor de protease de serina mais importante no plasma que regula a cascata de coagulação do sangue. A AT-III inibe a trombina, matriptase-3/TMPRSS7, bem como os fatores IXa, Xa e XIa. Sua atividade inibitória é grandemente aumentada na presença de heparina.
12. **Receptor olfativo:** atua na atividade do receptor acoplado à proteína G e na atividade do receptor olfativo (dados coletados no <https://www.uniprot.org/>).

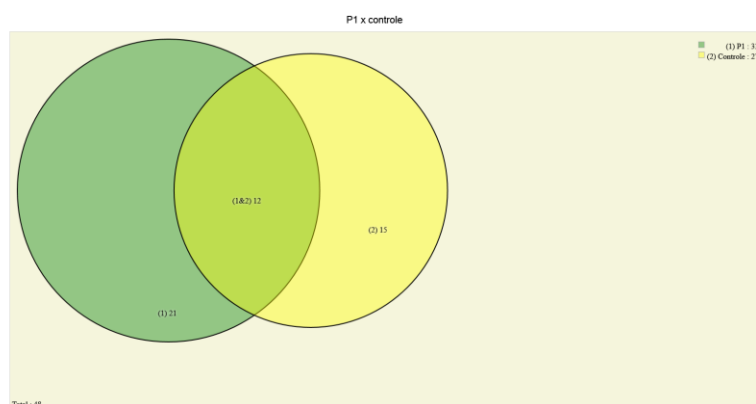


Figura 3 – Diagrama representativo das proteínas semelhantes e diferentes da Passagem 1 x Controle

4.4.2 – Funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da primeira passagem quando comparado com MC controle

No meio de cultivo das CTMAs de primeira passagem foram identificadas exclusivamente as seguintes proteínas com as respectivas funções:

1. **Integrina alfa-V isoforma X2:** é responsável pela adesão celular e via de sinalização mediada por integrinas.
2. **Proteína semelhante a isoforma X1:** atua na fonte de ligação Rho GTPase, ligação de actina, organização do citoesqueleto de actina e regulação da forma celular.

3. Proteína do domínio central de dissulfureto WAP 1: atua na atividade inibidora da endopeptidase do tipo serina, regulação negativa do crescimento celular, regulação negativa da proliferação de células epiteliais, regulação negativa da resposta inflamatória, regulação negativa da cicatrização de feridas e regulação do crescimento celular.

4. Proteína de indicador de zinco interagindo com Cip1: atua regulando a localização subcelular do CIP/WAF1, na ligação de ácidos nucleicos e de íons de zinco.

As transferinas são proteínas transportadoras de ligação ao ferro que podem ligar dois íons Fe^{3+} em associação com a ligação de um ânion, geralmente bicarbonato. É responsável pelo transporte de ferro dos locais de absorção e degradação do heme para os de armazenamento e utilização. A transferrina sérica também pode ter um papel adicional na estimulação da proliferação celular.

5. Proteína contendo repetição WD 20: é um regulador de complexos deubiquitinantes. Ativa a atividade de desubiquitinação de complexos contendo USP12. Âncora na base da alça de contato com a ubiquitina da USP12 e modula remotamente o centro catalítico da enzima.

6. homólogo de proteína 5 granulado ectópico P: é envolvido em autofagia. Pode desempenhar um papel em um passo tardio de autofagia, como a depuração da carga autofagossomal. Desempenha um papel fundamental na resposta imune inata e adaptativa desencadeada por dinucleotídeos não metilados de citidina-fosfatoguanosina (CpG) de patógenos, e mediada pelo receptor de detecção de nucleotídeos TLR9. É necessário para a translocação de dinucleotídeos CpG de endossomos iniciais para endossomos e lisossomos tardios, onde TLR9 está localizado.

7. semaforina-6C: demonstra atividade de colapso de crescimento em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) *in vitro*. Pode ser um sinal de parada para os neurônios DRG em suas áreas-alvo, e possivelmente também para outros neurônios. Também pode estar envolvido na manutenção e remodelação das conexões neuronais. Atua na atividade quimiotaxia negativa, ligação de neuropilina, ligação ao receptor de semaforina, orientação de axônio, quimiotaxia negativa, regulação negativa da extensão do axônio envolvida na orientação axonal, migração de células da crista neural e na regulação positiva da migração celular.

8. Homólogo de Pumilio 3: inibe a atividade de poli (ADP-ribosil) de PARP1 e a degradação de PARP1 por CASP3 após estresse genotóxico. Liga-se ao RNA de cadeia dupla ou ao DNA sem especificidade de sequência. Envolvido no desenvolvimento do olho e de células germinativas primordiais.

9. Subunidade beta de hemoglobina fetal: é envolvido no transporte de oxigênio do pulmão para os vários tecidos periféricos.

10. Subunidade alfa da hemoglobina: é também envolvido no transporte de oxigênio do pulmão para os vários tecidos periféricos.

11. Proteína ácido UDP-glucurônico/Transportador de UDP-N-acetilgalactosamina: transporta o ácido UDP-glucurônico (UDP-GlcA) e a UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc) do citoplasma para o lúmen do retículo endoplasmático. Desempenha um papel na biossíntese de sulfato de condroitina, que é importante para a formação da matriz extracelular da cartilagem e para o desenvolvimento normal do esqueleto. Atua na atividade transportadora de transmembrana UDP-N-acetilgalactosamina, transmembrana UDP-N-acetilglucosamina, transmembrana do ácido UDP-glucurônico, transmembrana de pirimidina nucleotídeo-açúcar, transporte de carboidratos, processo biossintético de sulfato de condroitina e desenvolvimento do sistema esquelético embrionário.

12. Proteína que é membro da família de domínio de lectina tipo C 9: funciona como um receptor endocítico em um pequeno subconjunto de células mielóides especializadas para a captação e processamento de material de células mortas. Reconhece a forma filamentosa da actina em associação com determinados domínios de ligação à actina das proteínas do citoesqueleto, incluindo a espectrina, exposta quando as membranas celulares estão danificadas, e medeiam a apresentação cruzada de antígenos associados a células mortas de uma maneira dependente de Syk.

13. Proteína potenciadora da expressão do receptor: é necessária para formação de redes de retículo endoplasmático, modelagem e remodelação; conecta os túbulos do retículo ao citoesqueleto. Pode também aumentar a expressão da superfície celular de receptores olfativos. Pode desempenhar um papel na manutenção axonal a longo prazo.

14. Proteína contendo o domínio CART da família NLR 4: é o componente chave dos inflamassomas que indiretamente detecta proteínas específicas de bactérias e fungos patogênicos e responde pela montagem de um complexo inflamassoma que promove a ativação da caspase-1, produção de citocinas e a piroptose de macrófagos. O inflamassoma de NLRC4 é ativado como parte da resposta imune inata a uma variedade de bactérias intracelulares.

15. Proteína associada a HERV-H LTR 2 atua através da interação com TMIGD2, as células T são customizadas no contexto da ativação mediada por TCR. Melhora a proliferação de células T e a produção de citocinas através de uma cascata de sinalização dependente de AKT.

16. Inibidor de tripsina do baço I: é um inibidor da endopeptidase do tipo serina (dados coletados no <https://www.uniprot.org/>).

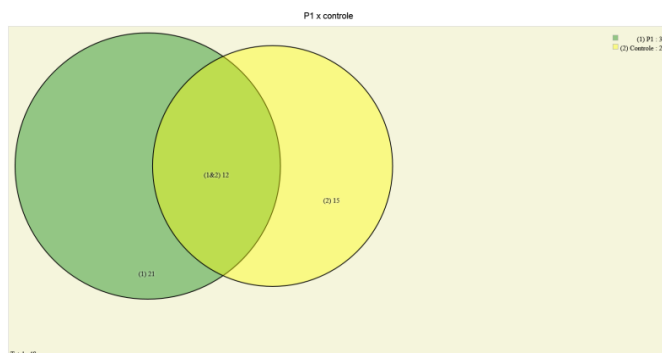


Figura 4 – Diagrama representativo das proteínas semelhantes e diferentes da passagem 1 x controle

4.4.3 – Funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 2ª passagem quando comparado com o MC da 1ª passagem

No meio de cultivo das CTMAs de segunda passagem foram identificadas exclusivamente as seguintes proteínas com as respectivas funções:

1. Proteína de indicador de zinco interagindo com Cip1: atua na regulação da localização subcelular do CIP/WAF1, ligação de ácidos nucleicos e ligação do íon de zinco.

2. Proteína contendo repetição WD: descrita anteriormente nas funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 1ª passagem quando comparado com MC controle.

3. Transportador de ácido UDP-glucurônico/UDP-N-acetilgalactosamina: descrita anteriormente nas funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 1ª passagem quando comparado com MC controle.

4. Proteína que é membro da família de domínio de lectina tipo C 9: descrita anteriormente nas funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 1ª passagem quando comparado com MC controle.

5. Homólogo de Pumilio 3: descrita anteriormente nas funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 1ª passagem quando comparado com MC controle.

6. Proteína 2 contendo domínio espiral rica em serina: é uma proteína de ligação a micro túbulos que pode desempenhar um papel na agregação de micro túbulos.

7. Proteína potenciadora da expressão do receptor: descrita anteriormente nas funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 1ª passagem quando comparado com MC controle.

8. Proteína contendo o domínio CART da família NLR 4: descrita anteriormente nas funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 1ª passagem quando comparado com MC controle

9. Inibidor de tripsina do baço I: descrita anteriormente nas funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 1ª passagem quando comparado com MC controle (dados coletados no <https://www.uniprot.org/>).

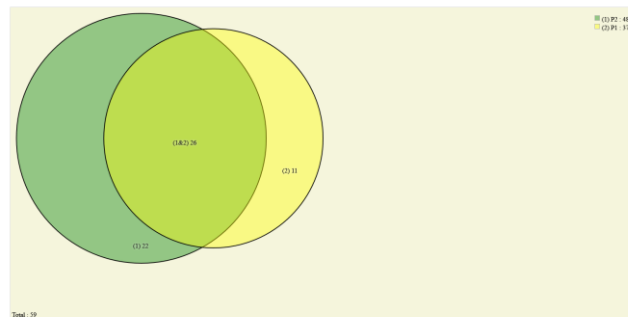


Figura 5 – Diagrama representativo das proteínas semelhantes e diferentes da passagem 2 x 1

4.4.4 – Funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 3ª passagem quando comparada com o MC da 2ª passagem

No meio de cultivo das CTMAs de terceira passagem foram identificadas exclusivamente as seguintes proteínas com as respectivas funções:

1. Serina/proteína de matriz repetitiva de arginina 2: é necessário para conectar o pré-mRNA como componente do spliceosome. Pode substituir funcionalmente para CWC12 em levedura. Também atua na ligação do domínio do indicador de zinco C2H2, na Ligação de RNA, proteína N-terminal, conexão de mRNA e via spliceosome.

2. Proteína tipo Kinesina KIF13B: está envolvido na reorganização do citoesqueleto cortical. Regula a formação de axônios, promovendo a formação de axônios extras. Pode ser funcionalmente importante para o tráfego intracelular de MAGUKs e complexos proteicos associados. Atua também na ligação de ATP, microtúbulos, proteína quinase, atividade ATPase, atividade motora de microtúbulos, ativação de células T, segmentação por proteína, regulação da axonogênese e transdução de sinal.

3. Colagénio alfa-4 (VI) do tipo cadeia isoforma X1: é constituinte estrutural da matriz extracelular.

4. Miosina-14: desempenha um papel na citocinese, no formato celular e em funções especializadas, como secreção e cobertura. Atua na ligação de ATP, filamentos de actina, calmodulina, atividade ATPase, atividade de ATPase dependente de actina, atividade motora do microfilamento, movimento baseado em filamentos de actina, organização da estrutura de actomiosina B, morfogênese mitocondrial, potencial de ação neuronal, regulação da forma celular, percepção sensorial do som, contração do músculo

esquelético, desenvolvimento de tecido muscular esquelético e comportamento de vocalização.

5. Cinesina-proteína semelhante a KIF1B isoforma X1: atua na ligação de ATP e atividade motora.

6. Proteína vacuolar associada a proteína 18 homólogo: desempenha um papel no tráfego de proteínas mediadas por vesículas em compartimentos lisossomais, incluindo o transporte da membrana endocítica e vias autofágicas. Acredita-se que atue como um componente central dos supostos complexos de ancoragem endossômica HOPS e CORVET que são propostos a estar envolvidos na conversão do endossoma Rab5-a-Rab7 provavelmente implicando na complexidade de MON1A/B, via SNAREs e SNARE de ligação para mediar eventos de ancoragem e ligação durante a fusão de membrana mediada por SNARE. Propõe-se que o complexo HOPS seja recrutado para o Rab7 na membrana endossômica tardia e para regular o tráfego final endocítico, fagocítico e autofágico para os lisossomos. O complexo CORVET é proposto para funcionar como um efetor de Rab5 para mediar a fusão do endossoma inicial, provavelmente em subpopulações de endossomos específicos. Necessário para a fusão de endossomos e autofagossomos com lisossomos. Envolvido no desenvolvimento de dendrito de células Pukinje. Atua também na autofagia, organização do endossomo, transporte de proteínas intracelulares, organização de lisossomos, regulamentação da montagem do complexo SNARE, regulação da exocitose das vesículas sinápticas, organização de vacúolos, acoplamento vesicular envolvido na exocitose e entrada viral na célula hospedeira.

7. Homólogo de proteína 81 de transporte intraflagelar: é um componente do complexo de transporte intraflagelar (IFT) B: juntamente com o IFT74, forma um módulo de ligação à tubulina que medeia especificamente o transporte de tubulina no cílio. Liga a tubulina através da sua região do tipo CH (homologia com calponina). Necessário para a ciliogênese e para a regulação adequada da sinalização SHH.

8. Proteína AMBP: atua na inibe a tripsina, plasmina e a elastase granulocítica lisossomal. Inibe a cristalização do oxalato de cálcio. Pode se difundir em fluido folicular após um estímulo ovulatório para atuar como um ligante estrutural que garante a expansão normal do cumulus, através da estabilização da matriz extracelular do cúmulo, apoiando assim o processo de ovulação. Atua também na ligação de IgA, heme, proteína-cromóforo, atividade de homodimerização de proteínas e atividade inibidora da endopeptidase do tipo serina.

9. Complemento do componente C4: atua na atividade de endopeptidase do tipo serina e no complemento de ativação da via clássica.

10. Fator de complemento B: atua na atividade de endopeptidase do tipo serina e no complemento de ativação.

11. Fibulina-1: é incorporada em fibras de matriz contendo fibronectina. Pode desempenhar um papel na adesão e migração celular ao longo das fibras proteicas

dentro da matriz extracelular. Pode ser importante para certos processos de desenvolvimento e contribuir para a organização supramolecular da arquitetura da matriz extracelular, em particular para as membranas basais. Atua também na ligação ao íon do cálcio, fibrinogênio, fibronectina, proteína idêntica, proteína C-termina, atividade ativadora da peptidase e é constituinte estrutural da matriz extracelular.

12. Caderinas: são proteínas de adesão celular dependentes de cálcio. Elas preferencialmente interagem com eles mesmos de uma maneira homofílica na conexão de células, assim, contribuem para a classificação de tipos de células heterogêneas. Atua também na ligação caderina, íon de cálcio, proteínas do citoesqueleto, atividade de homodimerização de proteínas, organização de junção de aderentes, adesão célula-célula dependente de cálcio via moléculas de adesão celular da membrana plasmática, adesão celular, morfogênese celular, processo de ciclo de cabelo, queratinização, regulação negativa do tempo de catagen, regulação negativa da produção de fator de crescimento transformador beta 2, regulação positiva da via de sinalização canônica Wnt, expressão gênica, via de sinalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina, proliferação de queratinócitos, processo biossintético da melanina, transporte de melanossomas, atividade da monooxigenase monofenol, ciclo capilar pela via de sinalização canônica Wnt, homeostase da retina, percepção visual e cicatrização de feridas.

13. Proteína contendo o domínio CART da família NLR 4: descrita anteriormente nas funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 1ª passagem quando comparado com MC controle.

14. Beta-2-glicoproteína 1: é vinculado a vários tipos de substâncias carregadas negativamente, como heparina, fosfolipídios e sulfato de dextrano. Pode impedir a ativação da cascata de coagulação sanguínea intrínseca pela ligação aos fosfolipídios na superfície das células danificadas. Atua na ligação de heparina, proteína idêntica, lipídica, e fosfolipídios, atividade ativadora da lipoproteína lipase, coagulação sanguínea pela via intrínseca, regulação negativa da angiogênese, coagulação sanguínea, migração de células endoteliais, proliferação de células endoteliais, fibrinólise, processo apoptótico de células mielóides e células musculares lisas, ativação de plasminogênio, degranulação de plaquetas, regulação positiva da coagulação sanguínea e lipoproteína lipase, regulação da fibrinólise, processo metabólico de triglicérides e transporte de triglicerídeos.

15. Lactase-florizina hidrolase: divide a lactose no intestino delgado. Atua na atividade glicosilceramidase e da lactase e no processo metabólico de carboidratos.

16. Inibidor de tripsina do baço I: proteína contendo o domínio CART da família NLR 4 foi descrita anteriormente nas funções das proteínas exclusivas localizadas no MC da 1ª passagem quando comparado com MC controle.

17. proteína do domínio do sítio de ligação à fosfo-anfetina: atua na ligação de fosfopantetheine.

18. Hidrolase de terminal carboxila de ubiquitina 34: pode remover a ubiquitina conjugada da AXIN1 e AXIN2, atuando assim como um regulador da via de sinalização Wnt. Atua como um ativador da via de sinalização Wnt a jusante do complexo de destruição da beta-catenina, pela deubiquitinação e estabilização de AXIN1 e AXIN2, levando a promover o acúmulo nuclear de AXIN1 e AXIN2 regulando positivamente a transcrição mediada por beta-catenina (CTNBB). Reconhece e hidrolisa a ligação peptídica na Gly C-terminal da ubiquitina. Ela é envolvida no processamento de precursores de poli-ubiquitina, bem como de proteínas ubiquitinadas. Atua também na atividade de endopeptidase do tipo cisteína, protease específica da ubiquitina dependente de tiol e na atividade de hidrolase de ubiquitinil dependente de tiol. Participa na regulação positiva da via de sinalização canônica Wnt. Opera no processo de desubiquitinação ligada à proteína K48 e desubiquitinação proteica. Atua também na regulação da estabilidade proteica.

19. E3 SUMO-proteína ligase PIAS3: funciona como uma pequena ligase do tipo E3, estabilizando a interação entre o UBE2I e o substrato. Desempenha um papel crucial como uma co-regulação transcricional em várias vias celulares, incluindo a via STAT e a via de sinalização do hormônio esteróide. Envolvido na regulação da sinalização de STAT3 a via de inibição da ligação do DNA de STAT3 e supressão do crescimento celular. Melhora a sumoilação do MTA1 e pode participar na sua sumoilação seletiva parológica. A sumoilação CCAR2 promove sua interação com SIRT1, diminui a sumoilação de ZFH3 impedindo a colocalização de ZFH3 com SUMO1 no núcleo. Ela também atua na ligação do fator de transcrição RNA polimerase II, enzimática, proteína C-terminal, proteína N-terminal e na íon de zinco. Atua na atividade da ligase SUMO, transferase, regulador do canal de potássio e corregulador de transcrição. Age na regulação negativa da diferenciação de osteoclastos, sumoilação de proteínas e íon de zinco, e na regulação positiva da expressão gênica, potencial de membrana, sumoilação de proteínas e transcrição pela RNA polimerase II. Também atua na resposta ao hormônio e na transcrição pela RNA polimerase II.

20. Membro da subfamília DnaJ, membro C 21: pode atuar como um co-acompanhante para HSP70. Pode desempenhar um papel na biogênese do RNA ribossômico (rRNA), possivelmente na maturação da subunidade 60S. Liga o precursor 45S rRNA. Atua na ligação de RNA e de íon de zinco e no dobramento de proteínas.

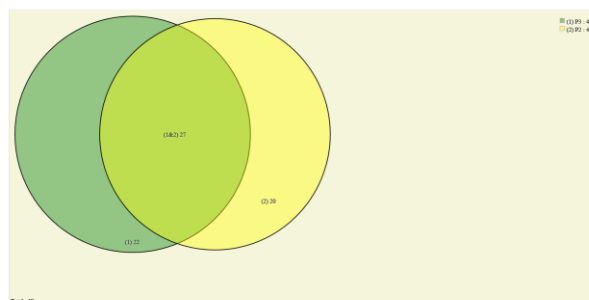


Figura 6 – Diagrama representativo das proteínas semelhantes e diferentes da passagem 3 x 2

5 - Discussão

Estudar o secretoma celular em sua origem, em vez de analisar os fluidos corporais, é mais confiável na definição de biomarcadores específicos e sensíveis, e pode trazer uma visão sobre o papel das proteínas secretadas localmente sob a condição biológica estudada (Derksen C, Brown R; 2012).

De fato, proteínas candidatas relevantes que são secretadas por um dado tecido pode nunca atingir fluidos corporais circulantes, como plasma e urina. Por exemplo, uma proteína secretada pelas células do cérebro tem que atravessar a barreira cérebro-sangue para entrar no plasma. Mesmo se isso ocorrer, a proteína candidata será extremamente diluída e difícil de detectar através da análise direta do fluido corporal. Assim, o estudo do secretoma celular poderia ser usado como fase de descoberta para definir candidatos de proteína confiáveis, que pode ser rastreado de volta em fluidos corporais acessíveis usando um mais sensível método tal como ELISA (Derksen C, Brown R; 2012).

Em geral, verificou-se que o secretoma celular é uma fonte valiosa para a descoberta de alvos terapêuticos e biomarcadores, não apenas no campo do cancro, mas também em várias outras doenças, incluindo distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas, doenças pulmonares e doenças cardiovasculares. Com o crescente número de estudos e catálogos de secretômicos, a criação de um domínio público para um banco de dados para consulta de biomarcadores potenciais com base no tecido e na doença estudados seria altamente valiosa (Derksen C, Brown R; 2012).

Existe atualmente uma iniciativa para depositar os dados da espectrometria de massa bruta e a lista correspondente de proteínas identificadas em domínios públicos como PRIDE (Proteomics Identifications database (PRIDE)) e ProteomeXchange (The ProteomeXchange Consortium) para estudos relacionados a proteômica. Tais iniciativas podem facilitar a comparação de dados entre laboratórios, já que os detalhes mais importantes relacionados aos espectros de massa bruta também são depositados. Além disso, com instrumentação de espectrometria de massa aprimorada e precisão de massa, bancos de dados de consulta do secretoma podem ser aproveitados para extrair o (s) candidato (s) de proteína mais significativo e permitir comparações entre diferentes estudos como para dados microarray mRNA (Derksen C, Brown R; 2012).

Finalmente, é importante ressaltar que a caracterização do secretoma é uma técnica de proteômica nova e emergente e já está contribuindo para uma série de áreas públicas úteis, incluindo a indústria de alimentos, setores biomédico, farmacêutico,

agrícola e biomédico bem como a indústria de biocombustíveis (Derksen C, Brown R; 2012).

Uma grande variedade de citocinas, fatores de crescimento, hormônios, proteínas extracelulares e enzimas tem sido encontradas usando a proteômica de acordo com Chen e colaboradores corroborando com o nosso trabalho que também encontrou esses fatores acumulados no meio de cultura.

Pesquisadores em 2016 compararam os secretomas de diferentes tipos celulares em distração osteogênica de ratos. Demonstrou que o secretoma das células fetais foram as melhores para formar o osso e produziram menor imunogênese que os subprodutos das CTMs e as CTMs adultas. Apesar das células fetais serem complexas e de difícil manipulação, o seu secretoma é de fácil acesso, tem um bom custo benefício e possui vários fatores trópicos que ajudam na reparação óssea (Xu et al., 2016). No nosso trabalho encontramos a proteína ácido UDP-glucurônico/Transportador de UDP-N-acetilgalactosamina em que atua no desenvolvimento do sistema esquelético essa proteína juntamente com outros processos podem ter desencadeado essa melhor formação óssea (Xu et al., 2016).

Li e colaboradores em 2018 disseram que o processo inflamatório é um modulador da perda óssea e que o meio condicionado oriundo das células tronco adipogênicas foram capazes de diminuir a expressão de genes TNF- α , IL-1 e IL-6 inibindo assim a perda óssea por via dos lipopolissacarídeos. No presente trabalho apresentamos proteínas que auxiliam no processo inflamatório como plasmina e proteína do domínio central de dissulfureto WAP 1, podendo sendo estas com auxílio de outros fatores o fator de inibição de perda óssea.

Presentes no meio de cultivo estão alguns fatores quimiotáticos inflamatórios, como o IL-8 que recruta células inflamatórias e células endoteliais, MCP-1 e RANTES que atrai macrófagos e monócitos. Embora o recrutamento de células inflamatórias possa ser associado a diversas patologias, esta etapa é fundamental para a remoção de patógenos e detritos fundamentais para a boa cicatrização da ferida. Assim a presença destes fatores é fundamental para uma formação óssea sadia e o recrutamento de células endoteliais e inflamatórias (Hwang et al., 2017). Nas análises proteômicas deste estudo encontramos proteínas quimiotáticas e proteínas de cicatrização, estas são: proteína do domínio central de dissulfureto WAP 1, semaforina-6C, proteína contendo o domínio CART da família NLR 4 corroborando com os trabalhos de Hwang e colaboradores em 2017.

Destruição articular autoimune, causada por a inflamação persistente, torna a artrite reumatoide um possível alvo clínico para a cartilagem e reparo ósseo usando CTMs (Ansboro et al., 2017). De fato, resultados anteriores, usando um modelo de artrite induzida por adjuvante de camundongo mostraram que CTMs autólogas de medula óssea, injetadas nas articulações foram capazes de reduzir o inchaço das articulações e a destruição da cartilagem, diminuindo a níveis de TNF- α . Estas células mostraram

integrar-se na sinóvia (Kehoe et al., 2014). Mais recentemente, o meio condicionado das mesmas CTMs derivadas da medula óssea foi usado para tratamento (com níveis aumentados de IL-10) reduzindo significativamente os sinais histopatológicos de artrite induzida por adjuvante, danos na cartilagem e suprimindo as respostas imunes, reduzindo a clivagem de agrecan, melhorando a função Treg e ajustando a relação Treg: Th17. As proteína plasmina, dissulfureto WAP 1, proteína homólogo de proteína 5 granulado ectópico P e proteína ácido UDP-glucurônico/Transportador de UDP-N-acetilgalactosamina, encontrada no presente estudo atuam na inflamação; regulação negativa da resposta inflamatória e regulação negativa da cicatrização de feridas; é envolvida em autofagia e desempenha um papel fundamental na resposta imune inata e adaptativa; desempenha um papel na biossíntese de sulfato de condroitina que é importante para a formação da matriz extracelular da cartilagem e para o desenvolvimento normal do esqueleto, respectivamente. Essas proteínas encontradas corroboram com o estudo de Kehoe e colaboradores em 2014, podendo sendo estas as proteínas que ajudaram na melhoria dos sinais histopatológicos de artrite induzida por adjuvante, danos na cartilagem e suprimindo as respostas imunes, reduzindo a clivagem de agrecan, melhorando a função Treg e ajustando a relação Treg: Th17.

O uso do meio de cultivo possui várias vantagens em relação a célula, simplificação da preparação, aplicação flexível, evita problemas imunogênicos, tumorgênicos e infecciosos (Pawitan, 2014). A grande maioria dos estudos com MC mostraram efeitos benéficos. Os secretomas promovem efeitos quimiotáticos, pró-angiogênico e protetor, sendo assim, tem sido usado na regeneração neuronal, reparação de pele, osso e vasos sanguíneos (Boomsma RA; Geenen, 2012). A proteína semaforina-6C demonstra atividade de colapso de crescimento em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) *in vitro*, também pode estar envolvido na manutenção e remodelação das conexões neuronais. Atua também na atividade da quimiotaxia negativa, orientação de axônio, regulação negativa da extensão do axônio envolvida na orientação axonal, migração de células da crista neural entre outros. A proteína potenciadora da expressão do receptor desempenha um papel na manutenção axonal a longo prazo. A proteína tipo Kinesina KIF13B regula a formação de axônios, promovendo a formação de axônios extras, regulação da axonogênese etc. A proteína miosina-14 atua no potencial de ação neuronal. A proteína vacuolar associada a proteína 18 homólogo é envolvido no desenvolvimento de dendrito de células Pukinje que é encontrada no cerebelo. A beta-2-glicoproteína 1 atua na regulação negativa da angiogênese, coagulação sanguínea, fibrinólise, processo apoptótico de células mielóides, degranulação de plaquetas, regulação positiva da coagulação sanguínea, regulação da fibrinólise, entre outros. A proteína E3 SUMO-proteína ligase PIAS3 atua na regulação negativa da diferenciação de osteoclastos. A proteína do domínio central de dissulfureto WAP 1 atua na regulação negativa da cicatrização de feridas, assim de acordo com todas essas proteínas encontradas neste estudo, relacionadas com efeitos

quimiotáticos, pró-angiogênico e protetor e diretamente pertinentes com regeneração neuronal, reparação da pele, osso e vasos sanguíneos corroboram-se os estudos de Pawitan e colaboradores em 2014, Boomsma e Geenen em 2012.

No presente estudo observamos várias proteínas que auxiliam em várias patologias no MC, essas proteínas aparecem até no MC do controle que não obtinham células, isso pode ter ocorrido devido ao meio ter fatores que mantem as células com a homeostase equilibrada. As diversas proteínas foram encontradas em diversos estudos anteriores e utilizadas em experimentações humanas e animais demonstraram resultados satisfatórios. Sendo assim mais estudos devem ser realizados para implementação desse MC de fácil acesso na medicina translacional.

6 – Conclusão

O perfil proteômico do secretoma de CTMs sofreu um desenvolvimento significativo durante os últimos 5 anos. Para estudo de fatores secretados, as CTMs foram cultivadas *in vitro* e meio condicionado, e analisado utilizando espectrometria de massa. Uma variedade de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, hormônios, proteínas da matriz extracelular e enzimas de remodelamento da matriz foram identificadas utilizando técnicas proteômicas. Além disso, um esforço significativo é aplicado à aplicação clínica de secretoma de CTMs no tratamento de ampla variedade de patologias. O conhecimento da função de proteínas segregadas sob condições fisiológicas e patológicas é fundamental para a futura aplicação terapêutica segura e eficiente de células estaminais mesenquimais, meios condicionados por CTMs derivados de CTMs em medicina regenerativa humana.

7 – Referências

Alvarez-Llamas G, Szalowska E, de Vries MP, Weening D, Karloes L, Hoek A, Wolffenbuttel BHR, Roelofsen H, Vonk RJ. Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol. Cell. Proteomics* 2007; 6: 589–600.

Ansboro S, Roelofs AJ, De Bari C. Mesenchymal stem cells for the management of rheumatoid arthritis: immune modulation, repair or both? *Curr Opin Rheumatol* 2017; 29:201–207.

Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J* 2009; 23: 3494-3505.

Bendall SC, Hughes C, Campbell JL, Stewart MH, Pittock P, Liu S, Bonneil E, Thibault P, Bhatia M, Lajoie GA. An enhanced mass spectrometry approach reveals human embryonic stem cell growth factors in culture. *Mol. Cell. Proteomics* 2009; 8: 421–432.

Boomsma RA, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One* 2012;7:e35685.

Bradford, M.M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976; 72: 248-254.

Brown KJ, Formolo CA, Seol H, Marathi RL, Duguez S, An E, Pillai D, Nazarian J, Rood B R, Hathout Y. Advances in the proteomic investigation of the cell secretome. *Expert Rev. Proteomics*, 2012; 9(3), 337–345.

Canals F, Colome N, Ferrer C, Plaza-Calonge Mdel C, Rodriguez-Manzanique JC. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. *Proteomics* 2006; 6: S28–S35.

Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, et al. PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. *Nature protocols*. 2016; 11(1):102-117. doi:10.1038/nprot. 2015: 133.

Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008; e1886.

Chen X, Cushman SW, Pannell LK, Hess S. Quantitative proteomic analysis of the secretory proteins from rat adipose cells using a 2D liquid chromatography-MS/MS approach. *J. Proteome Res.* 2005; 4: 570–577.

Delcourt, N., Jouin, P., Poncet, J., Demey, E; Mauger E, Bockaert J, Marin P, Galéotti N. Difference in mass analysis using labeled lysines (DIMAL-K): a new, efficient proteomic quantification method applied to the analysis of astrocytic secretomes. *Mol. Cell. Proteomics* 2005; 4: 1085–1094.

Derksen C, Brown R. Spring snow cover extent reductions in the 2008–2012 period exceeding climate model projections. *Geophysical research letters*. 2012;39: Xu19504

Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 2009; 324: 1673–1677.

Dowell JA, Johnson JA, Li L. Identification of astrocyte secreted proteins with a combination of shotgun proteomics and bioinformatics. *J. Proteome Res.* 2009; 8: 4135–4143.

Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 953–971.

Eshghi S, Schaffer DV. Engineering Microenvironments to Control Stem Cell Fate and Function, In: *StemBook*, Harvard Stem Cell Institute, Cambridge 2008.

Gajendran N, Frey JR, Lefkovits I, Kuhn L, Fountoulakis M, Krapfenbauer K, Brenner HR. Proteomic analysis of secreted muscle components: search for factors involved in neuromuscular synapse formation. *Proteomics* 2002; 2: 1601–1615.

Guercio A, Di Bella S, Casella S, Di Marco P, Russo C, Piccione G. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biol Int* 2013; 37: 789-798.

Grivennikov IA. Embryonic stem cells and the problem of directed differentiation. *Biochemistry (Mosc)* 2008; 73: 1438–1452.

Hauck SM, Gloeckner CJ, Harley ME, Schoeffmann S, Boldt K, Ekstrom PAR, Ueffing M. Identification of paracrine neuroprotective candidate proteins by a functional assay-driven proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics* 2008; 7: 1349–1361.

Hwang SJ, Cho TH, Lee B, Kim IS. Bone-healing capacity of conditioned medium derived from three-dimensionally cultivated human mesenchymal stem cells and electrical stimulation on collagen sponge. *J Biomed Mater Res Part A*. 2017;106A:311–20.

Islam A, Urbarova I, Bruun JA, Martinez-Zubiaurre I. Large-scale secretome analyses unveil the superior immunosuppressive phenotype of umbilical cord stromal cells as compared to other adult mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater* 2019; Feb 20;37:153-174.

Jin Z, Feng Y, Liu H. Conditioned media from differentiating craniofacial bone marrow stromal cells influence mineralization and proliferation in periodontal ligament stem cells. *Hum Cell. Springer Japan*; 2016;29(4):162– 75.

Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Hibi H. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head Face Med* 2016;12:5.

Kay AG, Long G, Tyler G, Stefan A, Broadfoot SJ, Piccinini AM, Middleton J, Kehoe O. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Reduces Disease Severity and Immune Responses in Inflammatory Arthritis. *Sci Rep* 2017; 7:18019.

Kehoe O, Cartwright A, Askari A, El Haj AJ, Middleton J. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis. *J Transl Med* 2014; 12:157.

Kinnaird T, Srabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004;109: 1543.

Kang BJ, Ryu HH, Park SS, Koyama Y, Kikuchi M, Woo HM, Kim WH, Kweon OK. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J Vet Sci* 2012; 13: 299-310.

Kay J, Calabrese L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2004; 43:iii2-iii9.

Lee KS, Kang HW, Lee HT, Kim HJ, Kim CL, Song JY, Lee KW, Cha SH. Sequential sub-passage decreases the differentiation potential of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci* 2014; 96: 267-275.

Lensch MW, Daheron L, Schlaeger TM. Pluripotent stem cells and their niches. *Stem Cell Reviews* 2006; 2:185–201.

Li YU, Gao XIN, Wang J. Human adipose derived mesenchymal stem cell conditioned media suppresses inflammatory bone loss in a lipopolysaccharide induced murine model. 2018;1839–46.

Lim JW, Bodnar A. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells. *Proteomics* 2002; 2:1187–1203.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L., Darnell J. *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, New York 1999.

Maffioli E, Nonnis S, Angioni R, Santagata F, Calì B, Zanotti L, et al. Proteomic analysis of the secretome of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells primed by pro-inflammatory cytokines. *J Proteomics*. 2017;166:115–26.

Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. *Biochimica et Biophysica Acta Stem cells : Insights into the secretome*. *BBA - Proteins Proteomics*; 2013;1834(11):2380–4.

Maurya P, Meleady P, Dowling P, Clynes M. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. *Anticancer Res*. 2007; 27: 1247–1255.

Miranda JP, Camões SP, Gaspar MM, Rodrigues JS, Carvalheiro M, Bárcia RN, Cruz P, Cruz H, Simões S, Santos JM. The Secretome Derived From 3D-Cultured Umbilical Cord Tissue MSCs Counteracts Manifestations Typifying Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2019 Feb 5;10:18.

Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2009; 10: 148–155.

Osugi M, Katagiri W, Ph D, Yoshimi R, Ph D. Conditioned Media from Mesenchymal Stem Cells Enhanced Bone Regeneration. *TISSUE Eng A*. 2012;18:1479–89

Pavlou MP, Diamandis EP. The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? J. Proteomics 2010, 73, 1896–1906.

Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. Biomed Res Int 2014;2014.

Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. Plast Reconstr Surg 2006; 117: 1462-1470.

Planque C, Kulasingam V, Smith CR, Reckamp K, Goodglick L, Diamandis EP. Identification of five candidate lung cancer biomarkers by proteomics analysis of conditioned media of four lung cancer cell lines. Mol. Cell. Proteomics 2009; 8: 2746–2758.

Proteomics Identifications database (PRIDE). www.ebi.ac.uk/pride

Requicha JF, Viegas CA, Albuquerque CM, Azevedo JM, Reis RL, Gomes ME. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. Stem Cell Rev 2012; 8: 1211-1222.

Salewski RP, Eftekharpour E, Fehlings MG. Are induced pluripotent stem cells the future of cell-based regenerative therapies for spinal cord injury? J. Cell Physiol. 2010; 222: 515–521.

Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. Curr. Stem Cell Res. Ther. 2010; 5: 103–110.

Schofield R. The relationship between the spleen colonyforming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells 1978; 4: 7–25.

Screven R, Kenyon E, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, Bigley EC 3rd, Borjesson DL, Zhu M. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. Vet Immunol Immunopathol 2014; 161: 21-31.

Skalnikova H, Motlik J, Gadher SJ, Kovarova H. Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. *Proteomics* 2011; 11: 691–708.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; 54: 132-141.

The ProteomeXchange Consortium. www.proteomexchange.org.

Tsuchida AI, Beekhuizen M, Rutgers M, van Osch GJ, Bekkers JE, Bot AG, Geurts B, Dhert WJ, Saris DB, Creemers LB. Interleukin-6 is elevated in synovial fluid of patients with focal cartilage defects and stimulates cartilage matrix production in an in vitro regeneration model. *Arthritis Res Ther* 2012; 14:R262.

Van Vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, Teasdale RD, Gleeson PA. Intracellular sorting and transport of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003; 83: 1–45.

Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant* 2010; 19: 279-289.

Voog J, Jones DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell* 2010; 6: 103–115.

Yoon JH, Yea K, Kim J, Choi YS, Park S, Lee H, Lee CS, Suh P-G, Ryu SH. Comparative proteomic analysis of the insulin-induced L6 myotube secretome. *Proteomics* 2009; 9: 51–60.

Xu D, Suenaga N, Edelmann MJ, Fridman R, Muschel RJ, Kessler BM. Novel MMP-9 substrates in cancer cells revealed by a label free quantitative proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics* 2008; 7: 2215–2228.

Xu J, Wang B, Sun Y, Wu T, Liu Y, Zhang J, et al. Human fetal mesenchymal stem cell secretome enhances bone consolidation in distraction osteogenesis. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. *Stem Cell Research & Therapy*; 2016;7:134

Xue H, Lu B, Lai M. The cancer secretome: a reservoir of biomarkers. *J. Transl. Med.* 2008; 6: 52.

Watt FM, Hogan BL. Out of eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287: 1427–1430.

Zeidan-Chulia F, Noda M. "Opening" the mesenchymal stem cell tool box. *Eur. J. Dent.* 2009; 3: 240–249.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-228.