

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS CANINAS CULTIVADAS
COM DESFERROXAMINE (DFO) E INTERFERON GAMMA,
MIMETIZANDO CONDIÇÕES DE HIPÓXIA E INFLAMAÇÃO**

PABLO EDUARDO OCAMPO ORTIZ

Botucatu, SP

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS CANINAS CULTIVADAS
COM DESFERROXAMINE (DFO) E INTERFERON GAMMA,
MIMETIZANDO CONDIÇÕES DE HIPÓXIA E INFLAMAÇÃO**

PABLO EDUARDO OCAMPO ORTIZ

**Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia
Animal para obtenção do título de
Doutor**

**Orientador: Prof^a. Titular. Fernanda
da Cruz Landim e Alvarenga**

**Botucatu, SP
2021**

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

Ortiz, Pablo Eduardo Ocampo.

Células tronco mesenquimais caninas cultivadas com desferroxamine (DFO) e interferon gamma, mimetizando condições de hipóxia e inflamação / Pablo Eduardo Ocampo Ortiz. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga
Capes: 50504002

1. Cão - Doenças. 2. Células-tronco. 3. Expressão gênica. 4. Imunomodulação. 5. Inflamação.

Palavras-chave: Expressão genica; Imunomodulação; Inflamação.

Nome do autor: Pablo Eduardo Ocampo Ortiz

TÍTULO: CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS CANINAS CULTIVADAS COM DESFERROXAMINE (DFO) E INTERFERON GAMMA (IFN-GAMMA), MIMETIZANDO CONDIÇÕES DE HIPÓXIA E INFLAMAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Titular Fernanda da Cruz Landim
Presidente e orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. DRARV
FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. DRARV
FMVZ – UNESP - BOTUCATU

Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. DRARV
FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Dr. Leandro Maia
Membro
Autônomo

Dra. Fabiana Fernandes Bressan
Membro
FZEA-USP

Data da defesa: 01 de julho de 2021.

*Dedico este triunfo a minha mãe, sem ela não seria quem sou
Minha família, apoio incondicional
Minha esposa e filho, meu todo*

AGRADECIMENTOS

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Células tronco mesenquimais ou células estromais mesenquimais	5
2.2. Mecanismos de ação das MSCs	6
2.3. Hipóxia.....	8
2.4. HIF-1	9
2.5. Indução da hipóxia <i>in vitro</i>	11
2.6. Hipóxia e MSC	12
2.7. Inflamação.....	13
2.8. MSC e a modulação imune	14
3. HIPOTESE.....	17
4. OBJETIVO.....	17
5. REFERENCIAS	18
CAPÍTULO 2	37
ARTIGO CIENTÍFICO	38
Abstract	38
1. Introdução	41
2. Material e Métodos.....	42
3. Resultados	48
4. Discussão.....	53
5. Conclusão	60
6. Referencias	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental mostrando a distribuição dos grupos.....	43
Figura 2. Curva de crescimento de células-tronco mesenquimais após 48, 96 e 144 horas em diferentes condições de cultivo celular. Dados representam médias de células colhidas de 3 animais.....	48
Figura 3. Porcentagem de células vivas, em apoptose ou necrose após o cultivo de células tronco mesenquimais em diferentes condições.....	48
Figura 4. Expressão de genes pró-apoptóticos (A, B e C) relacionados com sobrevivência celular (D, E e F), imunomodulação (G, H, I e J), proliferação e diferenciação (K), angiogênese (L e M), reguladores do ciclo celular (N e O) e regulador celular de resposta adaptativa a hipoxia (P) nas células tronco mesenquimais caninas derivadas de tecido adiposo cultivadas por 48 horas em diferentes condições. Barras representam valores da média relativa normalizados com o gene de referência <i>GAPDH</i> e erro padrão da média ($\top$ e $\perp$). Médias denotadas por uma letra diferente indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ($P < 0.05$).....	49-51

LISTA DE ABREVIATURAS

Bcl2	Linfoma de células B antiapoptótico 2
Casp3	Caspase 3
Casp8	Caspase 8
Casp9	Caspase 9
cAT-MSCs	Células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo canino
Cyclin D1	Ciclina D1
Cyclin D2	Ciclina D2
DFO	Desferroxiamine
DKC1	Disquerina 1
DNMT1	ADN-metiltransferase 1
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EPO	Eritropoyetina
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico 2
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HDAC1	histona deacetilase 1
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
Hif1 α	Fator induzível por hipoxia 1 alpha
HRE	Elemento responsivo a hipóxia atuando em <i>CIS</i>
IDO	Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IFN- γ	Interferon gamma
iNOS	Oxido nítrico sintase
MM	Meio de manutenção
MMP2	Metaloproteinase de matriz 2
MSCs	Células tronco mesenquimais
NO	Oxido nítrico
P53	Supressor tumoral 53
RT- qPCR	Análise Quantitativa PCR em Tempo Real
PGE-2	Prostaglandina E2
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular

TERT	Telomerase transcriptase inversa
TNF- α	Fator de necrose tumoral alpha

OCAMPO, P.E. Células tronco mesenquimais caninas cultivadas com desferroxamine (dfo) e interferon γ , mimetizando condições de hipóxia e inflamação Botucatu, 2021. 82 p. Tese (PhD). Biotecnologia Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As células tronco mesenquimais (MSC) tem se destacado como candidatas ao uso em terapias regenerativas. Porém, foi demonstrado que nem todas as condições clínicas podem ser favorecidas pela presença das MSCs, já que suas propriedades são influenciadas pelas condições do microambiente onde serão aplicadas, que normalmente estão acompanhadas da presença de fatores inflamatórios e isquêmicos. Devido a isto, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos *in vitro* da adição de DFO e/ou ao IFN- γ no meio de cultivo de células tronco mesenquimais (MSCs do inglês *Mesenchymal Stem Cells*) de tecido adiposo canino (cAT-MSCs). Foram utilizadas MSCs originadas de 6 cadelas e pertencentes a um banco celular em terceira passagem. As amostras foram divididas em 4 grupos, controle (MSCs em condições normais de cultivo em meio de manutenção), grupo DFO (50 μ mol de DFO no meio de manutenção), grupo IFN- γ (50 ng/mL de IFN- γ no meio de manutenção) e grupo IFN- γ /DFO (50 μ mol de DFO e 50 ng/mL IFN- γ no meio de manutenção). O teste de proliferação foi feito por 144 horas de cultivo e, viabilidade, apoptose e expressão gênica foram avaliadas após 48 horas de cultivo. Na expressão genica foram analisados transcritos relacionados com apoptose (*BCL2*, *CASP8* e *CASP9*), sobrevivência celular (*DKC1*, *HDAC1* e *DNMT1*), imunomodulação (*HGF*, *IDO*, *PGE2* e *IL-6*), proliferação e diferenciação (*FGF2*), angiogênese (*MMP2* e *VEGFA*), reguladores do ciclo celular (*Cyclin-D1* e *TP53*) e regulador celular de resposta adaptativa a hipóxia (*HIF1- α*). As cAT-MSCs mostraram durante e ao final do cultivo morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico. No entanto, os grupos tratados apresentaram maior distanciamento entre as células aderidas. Após 144 horas de cultivo, todos os grupos tiveram comportamento similar quanto a curva de proliferação celular, com diminuição da concentração nas primeiras 48 horas, seguido por uma fase de manutenção e finalizando com um ligeiro crescimento. A expressão gênica revelou que as cAT-MSCs tratadas com IFN- γ apresentaram

um incremento na expressão do gene pró-apoptótico *Casp9* quando comparado com o grupo IFN- γ /DFO; o gene *FGF2* importante para os processos de proliferação e diferenciação celular foi aumentado no grupo IFN- γ quando comparado aos outros grupos tratados; os genes *DKC1* e *TP53* envolvidos com a sobrevivência celular e supressão tumoral respectivamente, tiveram um incremento no grupo IFN- γ quando comparado com o grupo DFO; a expressão do gene relacionado com os processos de angiogênese, o *VEGFA*, foi maior nos grupos onde o DFO foi usado. Concluímos que condicionar as cAT-MSCs com a citocina pro-inflamatória IFN- γ estimulou um aumento na sobrevivência, proliferação celular e angiogênese mediada por *MMP2*. Já a mimetização de hipóxia, levou a uma diminuição da expressão de genes relacionados a estas propriedades associadas a um estímulo para a angiogênese dependente de *VEGF*. Apesar disso, os genes relacionados a imunomodulação não foram influenciados pelas condições de cultivo. Os resultados obtidos indicam que as propriedades de indução da regeneração tecidual foram mais afetadas pelas condições de cultivo, em comparação às propriedades imunomoduladas das cAT-MSC.

Palavras-chave: imunomodulação, inflamação, expressão genica.

OCAMPO, P.E. Canine mesenchymal stem cells cultured with deferoxamine (dfo) and interferon γ , mimicking conditions of hypoxia and inflammation Botucatu, 2021. 82 p. Thesis (PhD). Animal biotechnology – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. São Paulo State University.

SUMMARY

Mesenchymal stem cells (MSC) have been highlighted as candidates for use in regenerative therapies. However, it has been shown that not all clinical conditions can be favored by the presence of MSCs, as their properties are influenced by the conditions of the microenvironment where it will be applied, conditions that are usually accompanied by the presence of inflammatory and ischemic factors. So, this study aimed to evaluate the *in vitro* effects of the addition of DFO and/or IFN- γ in the culture medium of mesenchymal stem cells (MSCs Mesenchymal Stem Cells) from canine adipose tissue (cAT-MSCs). MSCs from 6 bitches and belonging to a cell bank in the third passage were used. Samples were divided in 4 groups: Control (MSCs under standard culture conditions in maintenance medium); DFO group (50 μ M of DFO in maintenance medium), IFN- γ Group (50 ng/mL of IFN- γ in maintenance medium) and IFN- γ /DFO group (50 μ M of DFO and 50 ng/mL IFN- γ in maintenance medium). Proliferation test was performed for 144 hours of culture and viability, apoptosis and gene expression were evaluated after 48 hours of culture. In gene expression, transcripts related to apoptosis (*BCL2*, *CASP8* and *CASP9*), cell survival (*DKC1*, *HDAC1* and *DNMT1*), immunomodulation (*HGF*, *IDO*, *PGE2* and *IL-6*), proliferation and differentiation (*FGF2*), angiogenesis (*MMP2* and *VEGFA*), cell cycle regulators (Cyclin-D1 and *TP53*) and cellular regulator of adaptive response to hypoxia (HIF1- γ) were analyzed. The cAT-MSCs showed fibroblastoid morphology and plastic adherence during and at the end of the culture. However, the treated groups showed greater distance between adhered cells. After 144 hours of culture, all groups had a similar behavior regarding the cell proliferation curve, with a decrease in concentration in the first 48 hours, followed by a maintenance phase and ending with a slight growth. Gene expression revealed that cAT-MSCs treated with IFN- γ showed an increase in the expression of the pro-apoptotic *Casp9* gene when compared to the IFN- γ /DFO group; the *FGF2* gene important for cell proliferation and differentiation processes was increased in the IFN- γ

group when compared to the other treated groups; the *DKC1* and *TP53* genes involved with cell survival and tumor suppression respectively, had an increase in the IFN- γ group when compared to the DFO group; the expression of the gene related to the angiogenesis processes, *VEGFA*, was higher in the groups where DFO was used. We conclude that conditioning cAT-MSCs with the pro-inflammatory cytokine IFN- γ stimulated an increase in survival, cell proliferation and *MMP2*-mediated angiogenesis. The mimicry of hypoxia, on the other hand, led to a decrease in the expression of genes related to these properties associated with a stimulus for *VEGF*-dependent angiogenesis. Despite this, genes related to immunomodulation were not influenced by culture conditions. The results obtained indicate that tissue regeneration induction properties were more affected by culture conditions, compared to the immunomodulated properties of cAT-MSC.

Key words: immunomodulation, inflammation, gene expression.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As células tronco mesenquimais (MSC) tem se destacado como candidatas ao uso em terapias regenerativas por serem células com duas principais características, sendo a segunda atualmente a mais importante, 1) se diferenciar em várias linhagens celulares e portanto, serem usadas na engenharia de tecidos (DA SILVA MEIRELLES, 2009; DA SILVA MEIRELLES 2006; ZAGO, 2004), e 2) atividade parácrina, secretando moléculas bioativas que propiciam um ambiente adequado para a reparação tecidual (CAPLAN, 2007; MONTEIRO E NETO; DEL CARLO, 2010).

A principal fonte de MSCs não hematopoiéticas estudada foi a medula óssea (MO) (NARDI E DA SILVA MEIRELLES, 2008), cujas MSCs tem um potencial terapêutico e de diferenciação diminuído em doadores de idade avançada (MUELLER E GLOWACKI, 2001). Para contrabalancear esta limitação outras fontes alternativas de MSCs começaram a ser pesquisadas, entre elas, o tecido adiposo (BAJADA et al., 2008; MINGUELL; et al., 2001) e tecidos de origem fetal (BAJADA et al., 2008; CREMONESI; et al., 2011; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; LOVATI et al., 2011; MIKI et al., 2005; TSAI et al., 2004), sendo as de origem adiposo as mais utilizadas na atualidade.

Indistintamente da origem, inúmeros trabalhos em animais e humanos confirmam os benefícios terapêuticos das MSCs (BAJADA et al., 2008; ORLIC et al., 2001; TABBARA et al., 2002). MASON e MANZOTTI relatam o tratamento de 675.000 pacientes com diversas doenças entre os anos 80 até o ano 2010 (MASON E MANZOTTI, 2010). De fato, hoje a terapia com CTMs é bem estabelecida em medicina veterinária no Brasil e estas células tem sido utilizadas no tratamento de diversos tipos de doenças. Porém, a evolução da terapia celular com MSCs tem demonstrado que nem todas as condições clínicas ou experimentais podem ser favorecidas pela presença das células (SEIFERT et al., 2012), já que as propriedades das MSCs são influenciadas pelo status clínico do organismo e/ou tecido alvo onde serão aplicadas, bem como pelo microambiente onde estas são cultivadas quando expandidas *in vitro* (CERON et al., 2016).

Durante a lesão tecidual a capacidade regenerativa depende da proximidade e sinergismo entre as células do sistema imune e das MSCs

residentes (do próprio tecido), mantendo a homeostase do microambiente e sugerindo uma regulação recíproca entre ambas (AURORA; OLSON, 2014; BERNARDO; FIBBE, 2013). De fato, hoje é bem evidente que as MSCs possuem funções imunomoduladoras relacionadas ao ambiente de lesão no qual as células se encontram e que quando entram em contato com o local lesionado, atuam modificando o microambiente através da secreção de moléculas bioativas que modulam a reação inflamatória e a reparação tecidual (AURORA; OLSON, 2014).

As condições patológicas normalmente são acompanhadas da presença de fatores inflamatórios e isquêmicos com carência ou ausência de oxigênio e de nutrientes (BURAVKOVA et al., 2014), condições que impactam diretamente na sobrevivência e propriedades das MSCs. Alguns artigos afirmam que em condições com baixa tensão de oxigênio e suprimento nutricional as MSCs podem sofrer apoptose e autofagia (BURAVKOVA et al., 2014; ZHANG et al., 2009; ZHU et al., 2006), já outros demonstram viabilidade aumentada, melhor capacidade proliferativa, migratória, de diferenciação e de produção parácrina em condições de hipóxia (CRISOSTOMO et al., 2008; ROSOVÁ et al., 2008; SICCO et al., 2017).

Embora o pré condicionamento de MSCs em condições de hipóxia seja uma metodologia conhecida, o cultivo em hipóxia é geralmente caro e difícil de padronizar, sendo que mesmo pequenas mudanças no ambiente de cultivo podem levar a variações nos resultados experimentais (FUJISAWA et al., 2018). Desta forma, o uso de agentes que mimetizam os efeitos da hipóxia como o desferroxamine (DFO), um agente quelante de íons, tem sido investigado (FUJISAWA et al., 2018).

A desferroxiamina é um sideroforo hexadentado secretado pelo *Streptomyces pilosus*. Em cultivo de células tronco, o uso da DFO é utilizado para mimetizar uma condição de hipóxia nas células interferindo com a hidroxilação do *HIF-1*, o qual é um regulador chave da resposta celular as mudanças na concentração de oxigênio, uma vez que é uma proteína instável que se degrada em normóxia devido a hidroxilação. Em condições de hipóxia ou na presença de DFO, sua degradação não acontece, havendo seu acúmulo e translocação para o núcleo das células.

Diversos artigos têm demonstrado que o condicionamento das MSC em condições de baixa oxigenação antes do transplante faz com que estas produzam uma maior quantidade de moléculas necessárias para a redução das lesões isquêmicas, combatendo os agentes oxigênio reativos e estimulando a secreção de fatores pró angiogênicos e antiapoptóticos (CARRIERE et al, 2009; CHACKO et al., 2010; LIU et al., 2013).

Trabalhos tem reportado resultados benéficos no tratamento de lesões teciduais acompanhadas de isquemia como infarto do miocárdio, falha renal, lesão medular, doença discal, defeito periodontal e feridas cutâneas (AL-KHALDI et al., 2003; HU et al., 2008; IWASE et al., 2005; JUN et al., 2014; KIM et al., 2015, 2016; KINNAIRD et al., 2004; LEE et al., 2017; MOON et al., 2006; NAKAGAMI et al., 2005; PITTENGER E MARTIN, 2004; TSUMANUMA et al., 2016). Ainda assim, poucos são os estudos realizados em situações controladas sob condições de hipóxia e inflamação em animais domésticos e particularmente em cães.

A baixa imunogenicidade das MSCs e suas funções na modulação do sistema imune fazem destas células candidatas promissórias para uso em terapia celular. As MSCs têm a capacidade de promover ou restringir a inflamação quando o sistema está imunossuprimido ou superativado, respetivamente. Estas funções são controladas em grande parte pela atividade parácrina, produzindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e vesículas extracelulares (GOMZIKOVA et al., 2019) que trabalham de uma maneira sinérgica com mecanismos dependentes de contato celular.

O IFN- γ é produzido pelos linfócitos T, algumas células T CD8+, e células NK. De forma geral, sua atividade biológica pode ser dividida em três: defesa do hospedeiro regulando a expressão de proteínas do MHC I e II da maioria de células imunes, com a exceção de inibir a expressão de MHC II nas células B; é o principal ativador de macrófagos e é a principal citocina responsável pela indução de mecanismos mediados por células NO específicas. Resumidamente as MSCs são ativadas pelo IFN- γ e passam a modular direta ou indiretamente as respostas das células T. Fatores que diminuem a ativação, melhoram a sinalização negativa e modificam as células T para um fenótipo anti-inflamatório,

além disso também interatuam com células apresentadoras de antígeno incrementando ou induzindo o aparecimento de células reguladoras.

Sendo assim, é importante entender o impacto do microambiente nas MSCs visando sua adaptação a condições terapêuticas. Desta forma, a hipótese do presente trabalho é que a utilização do quelante de íons DFO irá influenciar a sobrevivência, proliferação, a expressão genica das cAT-MSCs. Os resultados encontrados serão comparados aos obtidos com células cultivadas na presença de agentes indutores da inflamação (IFN- γ) e sob condições controle.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células tronco mesenquimais ou células estromais mesenquimais

As células tronco mesenquimais (MSCs) (do inglês, *mesenchymal stem cells*) ou células estromais mesenquimais são células de origem adulto não hematopoietico que possuem ampla plasticidade fenotípica e aderência ao plástico (NARDI E DA SILVA MEIRELLES, 2008). A propriedade plástico-aderentes permite que adotem morfologia fibroblastóide e sob condições especiais, diferenciem-se em várias linhagens de células mesenquimais (DOMINICI et al., 2006).

As MSCs Inicialmente foram isoladas de medula óssea (MO), porém devido à sua ampla distribuição no organismo, outras fontes foram identificadas, sendo possível isolar MSCs de diversos tecidos como: tecido adiposo (ZUK et al., 2001), tecido musculoesquelético (BIANCO, et al., 2008), sangue periférico (KUZNETSOV et al., 2001), derme (JIANG et al., 2002) e tecidos fetais como: sangue de cordão umbilical (BIEBACK et al., 2004), líquido amniótico (LOVATI et al., 2011), membrana amniótica (BAJADA et al., 2008; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; MIKI et al., 2005; TSAI et al., 2004), matriz extra vascular do cordão umbilical (BAJADA et al., 2008; CREMONESI, et al., 2011) entre outros.

O desempenho das MSC é mais conhecido *in vitro* quando comparado a condições *in vivo*, sendo suas principais propriedades a autorrenovação e a plasticidade, a capacidade quimiotática e de migração para os locais de lesão e inflamação, a secreção de mediadores parácrinos e fatores tróficos, propriedades imunomoduladoras, propriedade angiogênica e de regulação

durante reações inflamatórias locais (DA SILVA MEIRELLES; NARDI, 2009; MASTRI, et al., 2014).

Sua disponibilidade, facilidade de serem isoladas e purificadas, expansão sem indução espontânea de diferenciação, bem como capacidade de diferenciação em diversos tipos de células especializadas, faz com que estas células tenham um valor inestimável em pesquisa, podendo servir para o estudo e o desenvolvimento do reparo tecidual com o alvo para correção de lesões provocadas por doenças congênitas ou degenerativas (AMORIN et al., 2012; MATIKAINEN; LAINE, 2005). Estas últimas propriedades de diferenciação *in vitro* são as responsáveis pelo nome de células tronco. Porém, com o avanço das pesquisas e aplicações clínicas foi visto que o efeito terapêutico depende principalmente da secreção de fatores imunomoduladores e tróficos e não de sua diferenciação no tecido especializado, sustentando a iniciativa de mudar o nome por “células de sinalização medicinal” (CAPLAN, 2017).

2.2. Mecanismos de ação das MSCs

Logo no início da utilização terapêutica de MSCs no tratamento de doenças, foram observados seus efeitos terapêuticos nas doenças de enxerto versus hospedeiro, bem como na sepse. No entanto, o entendimento de seu complexo mecanismo de ação, que faz com que MSCs tenham efeitos benéficos na terapia regenerativa, ainda está em construção (WAGNER; HENSCHLER, 2012). No início se acreditava que seus efeitos eram causados pela inserção das MSCs no tecido e sua diferenciação em células especializadas no local da lesão. No entanto, hoje é conhecido que menos de 1% das MSCs sobrevivem no hospedeiro por mais de uma semana após a administração (MONTEIRO et al., 2010; CROVACE et al., 2007) sugerindo que seu principal efeito é mediado pela secreção de fatores paracrinos bioativos (McILWRAITH et al., 2011; LOVE et al., 1994; CHENIER, 2007).

No entanto, o *modus operandi* das MSCs ainda não foi completamente elucidado, sendo as principais hipóteses as de que estas células I) compõem o nicho de células progenitoras, II) se diferenciam e reparam tecidos lesados, e III) enxertando-se temporariamente em tecidos lesados e comunicando-se com eles por meio de fatores bioativos visando deter a progressão da lesão e melhorar a

reparação através da formação de ambientes que estimulam a diferenciação e propagação de células endógenas (PROCKOP; REGER, 2013).

Apesar de algumas MSCs poderem se diferenciar em células do tecido lesado (WANG et al., 2014), hoje em dia é bem conhecido que as principais propriedades terapêuticas destas células são atribuídas a atividade parácrina (BAGLIO, et al., 2012). Esta afirmação é sustentada pelo fato de que as MSCs desaparecem rapidamente depois de sua administração, secretando produtos solúveis encarregados por gerar o efeito terapêutico imunoregulador (GNECCHI, et al., 2016; MA et al., 2014). Entre os produtos secretados pelas MSCs, encontramos fatores solúveis, microvesículas e exossomos (THÉRY, et al., 2009) que são liberadas no espaço extracelular. Desta forma as MSCs transferem para as células vizinhas miRNA, mRNA, proteínas, lipídeos e até mitocôndrias, controlando a função parácrina antiinflamatória e antimicrobiana (BAGLIO, et al., 2012; JACKSON et al., 2016; RANI et al., 2015).

As MSCs têm a capacidade de modular o efeito anti-inflamatório mediante várias vias, influenciadas pelos diferentes microambientes nas diferentes afecções. Segundo (PROCKOP; YOUN OH, 2012), estas células são consideradas os guardiões da inflamação, e apresentam diferentes modos de ação; I) São ativadas para expressar o antagonista do receptor para interleucina 1 (IL -1) (ORTIZ et al., 2007); II) São ativadas pelo microambiente lesado para secretar o fator de necrose tumoral induzível pela proteína 6 (TSG-6), modulando a cascata de citocinas pró-inflamatórias (LIN et al., 2013; OH et al., 2010); III) São ativadas para secretar prostaglandina E2 (PGE2) um dos principais mediadores da inflamação (BOUFFI et al., 2010; CHEN et al., 2010; HARTING et al., 2018).

Existem ainda outras sugestões de mecanismos de ação anti-inflamatório das MSCs, incluindo ativação para expressar a proteína antireativa de espécies de oxigênio, a stanniocalcin-1 (PROCKOP; YOUN OH, 2012), fator de crescimento transformante- β 1 (*TGF β 1*), fator de crescimento de hepatócito (*HGF*) (DI NICOLA et al., 2002), indoleamina 2,3-dioxigenasa (*IDO*) (MEISEL et al., 2004) e óxido nítrico (*NO*) (BOUFFI et al., 2010; SATO et al., 2007). Com tudo, pode se resumir que as MSCs regulam o sistema imune inato e adaptativo por meio do contato célula-célula suprimindo células T, madurando células

dendríticas, reduzindo a ativação e proliferação de células B, inibindo proliferação e citotoxicidade de células NK e promovendo a geração de células T reguladoras (GAO et al., 2016).

Devido à grande quantidade de artigos científicos que relata o efeito parácrino das MSCs, Caplan propôs a alteração do nome *mesenchymal stem cells* para *medicinal signaling cells* o qual reflete com maior precisão o fato de que as células se concentram em locais lesados para secretar fatores solúveis que trabalham em prol da regeneração e imunorregulação, inferindo que essas células produzem *in vitro* drogas medicinais (CAPLAN, 2017).

2.3. Hipóxia

Desde o surgimento do primeiro organismo capaz de liberar oxigênio (O₂) na atmosfera, (cerca de 4 bilhões de anos atrás) a concentração deste gás aumentou drasticamente tornando-se um fator indispensável a vida. No começo o O₂ era tóxico para seres vivos, porém, com o passar dos anos mecanismos adaptativos de detoxificação foram surgindo. Um exemplo disso, são os eucariotas, cuja fisiologia se tornou oxigênio-dependente, porém com concentrações de oxigênio metabolismo-dependente (IVANOVIC, 2009). No corpo humano, as concentrações de O₂ são tecido-dependente variando de um estado de hipóxia até anóxia, quando comparadas com as encontradas na atmosfera. No parênquima pulmonar e na circulação (JOHNSON et al., 2005; WILD et al., 2005), assim como em órgãos com parênquima bem irrigado como fígado, rins e coração (DAVILA et al., 2004; MIK et al., 2004; ROY et al., 2003; WELCH et al., 2001) as concentrações de oxigênio oscilam entre 4% e 14%. Em tecidos menos irrigados e com consequente tensão de O₂ relativamente mais baixa, como o cérebro, esta concentração varia entre 0,5% a 7% (HEMPHILL et al., 2005), no olho 1% a 5% (YU; CRINGLE, 2005), e na medula óssea de 0% a 4% devido a heterogeneidade celular (CHOW et al., 2001; SPENCER et al., 2014).

Desta forma fica evidente que, a normóxia *in situ* é na verdade uma “hipóxia fisiológica” (BURAVKOVA et al., 2014; GUZY E SCHUMACKER, 2006; IVANOVIC, 2009) na qual, os requisitos de O₂ são dependentes das necessidades energéticas de cada célula, tecido e organismo (LENIHAN E

TAYLOR, 2013). Já a hipóxia tecidual surge quando as demandas de O₂ não suprem as necessidades fisiológicas de cada órgão tornando-se indesejada e, dependendo da severidade podendo causar debilidade muscular, hipertensão, depressão mental, coma e até a morte celular (PRABHAKAR, 2001). A hipóxia tecidual pode ser classificada como aguda ou crônica. As mudanças agudas (segundos a minutos) acontecem como resultado de alterações de proteínas preexistentes ou outras macromoléculas através de reações redox, fosforilação, defosforilação, entre outras, enquanto mudanças crônicas (minutos a horas) ocorre como resultado de alterações genéticas (SEMENZA, 1999, 2000).

Essa hipóxia tecidual é diferente da hipóxia fisiológica, que ocorre quando existe um processo inflamatório que leva a uma isquemia ou a uma lesão por reperfusão, na qual se expressam mediadores inflamatórios regulados por hipóxia. A reperfusão é mediada pelo acúmulo de hipoxantina e xantina oxidase durante os episódios de isquemia. Em presença de oxigênio a hipoxantina é metabolizada em xantina. No entanto esta metabolização está impedida em condições isquêmicas. Quando a reperfusão e tensão de oxigênio é retomada, a xantina oxidase converte a hipoxantina acumulada em xantina com a geração de grandes quantidades de íons superóxido, H₂O₂ e outros radicais livres. Estes iniciam a peroxidação lipídica da membrana e a subsequente liberação de agentes quimiotáticos, que participam na migração, adesão e ativação de neutrófilos, os quais são chave no processo inflamatório e tem sido implicado no resultante dano tecidual (AIRLEY, et al., 2000). A síndrome da doença crítica é um processo estressante fisiológico complexo disparado por diversas patologias onde a disfunção ou morte do órgão acontecem por uma falha bioenergética gerada por um suprimento de oxigênio celular inadequado (MCKENNA et al., 2020).

2.4. HIF-1

A homeostase de oxigênio é um princípio organizacional importante para a compreensão da evolução, biologia e medicina (SEMENZA 2014) e é indispensável para sobrevivência do organismo, mesmo em condições de anemia ou em altas altitudes, uma vez que a produção de eritropoetina (*EPO*) é rapidamente ativada no rim (WEIDEMANN E JOHNSON 2008). A *EPO* estimula

a produção de células vermelhas e, por conseguinte, determina a concentração de oxigênio no sangue. A indução da transcrição de EPO requer que o gene tenha um elemento responsivo a hipóxia atuando em *CIS* (*HRE*) na região do extremo 3' do gene. O *HIF-1* (*hypoxia inducible factors*) se liga ao *HRE* em condições de hipóxia e é acumulado no núcleo (SADEK E SEMENZA, 2019) enquanto em condições com alto O₂ o *HIF-1* é degradado. Quando existe hipóxia ele se acumula servindo como fator de transcrição para vários componentes que podem ser deletérios aos tecidos (D'IGNAZIO, et al., 2016; ELTZSCHIG E CARMELIET, 2011; TAYLOR E COLGAN, 2017).

Os organismos são capazes de responder com mudanças adaptativas na expressão genica a variações nas concentrações de oxigênio. Existem vários sistemas fisiológicos complexos no corpo dos mamíferos que garantem o fornecimento de oxigênio às células. O regulador transcripcional *HIF-1* é um mediador essencial da homeostase deste elemento (SEMENZA G. 2000). O *HIF-1* foi descoberto pela identificação de um elemento de resposta à hipóxia, uma região de 50 pares de bases na porção 3' do gene eritropoietina humana (*EPO*) e foi visto por ligar-se a quatro ou mais fatores nucleares diferentes, pelo menos dois dos quais são induzidos por anemia no fígado e nos rins (GOLBERG 1988; SEMENZA, et al., 1991; SEMENZA E WANG, 1992).

O *HIF-1* é um heterodímero composto por subunidades α e β que são estabilizadas por enzimas dependentes de oxigênio e ferro chamadas enzimas de domínio HIF-prolil hidrolase (*PHD*). A subunidade α é a responsável pela atividade biológica do *HIF-1*, participando na expressão de mRNA, proteínas, localização nuclear e trans-ativação, enquanto a subunidade β é expressada constitutivamente (SEMENZA G., 2001). Em normóxia, PHDs hidroxilam 2 resíduos prolil da subunidade α , unindo-se à proteína de supressão tumoral von Hippel-Lindau (*VHL*) com subsequente ubiquitinação e degradação por proteossomas. Por outro lado, em condições de hipóxia dependente de oxigênio ou em presença de quelantes de ferro, os PHDs são suprimidos e a subunidade *HIF- α* é translocada ao núcleo para se unir à subunidade *HIF-1 β* e formar o complexo fator de transcrição heterodimérico *HIF- α :HIF-1 β* que se localizara nos elementos responsivos à hipóxia (*HREs*) de seus genes alvo, resultando na sua regulação transcripcional positiva (VITO, et al., 2020; SADEK;

SEMENZA, 2019; SEMENZA, 2000). Segundo Sadek e Semenza (2019) existem atualmente mais de 4000 genes alvos diretamente regulados pelo HIF cuja regulação também se dá pela hidroxilação, ubiquitinação e degradação dependente de oxigênio.

2.5. Indução da hipóxia *in vitro*

Existem no mercado incubadoras com capacidade para controlar a concentração de oxigênio fornecida às células. Porém o custo destas as vezes impossibilita sua aquisição. Por outro lado, existem protocolos onde se introduzem garrafas de cultivo dentro de sacolas plásticas fechadas contendo uma concentração baixa de oxigênio para mimetizar a hipóxia, conseguindo acomodar níveis variáveis de oxigênio em cada uma das sacolas, ainda assim são pouco úteis em pesquisas com repetições experimentais de cultivos individuais (BAKMIWEWA, 2015).

Tentando compensar esta desvantagem, vem se utilizando substâncias químicas com o fim de induzir hipóxia sem a necessidade de diminuir o oxigênio na incubadora de cultivo os quais são chamados de agentes miméticos de hipóxia. Estas substâncias são classificadas como quelantes de ferro, concorrentes pelo ferro e análogos de oxoglutarato 2 (DAVIS, 2019). Dentre elas temos a dimetiloxalil glicina, desferroxiamina, L-mimosina (MULLER E JANJIC, 2018), e o cloreto de cobalto (ZENG, 2011).

2.5.1. Desferroxiamina

A desferroxiamina é um sideroforo hexadentado secretado pelo *Streptomyces pilosus* amplamente utilizado como tratamento de intoxicações crônicas por ferro como a beta-talassemia. Se caracteriza por ter uma alta afinidade pelo ferro e muito baixa pelos outros íons metais presentes nos fluidos biológicos, impedindo a produção de ROS e por consequente a diminuição de estresse oxidativo nas células sobrecarregadas com ferro, aliviando assim os sintomas causados pela intoxicação (AOUAD, 2002; LIU E HIDER 2002; KALINOWSKI E RICHARDSON, 2005).

No que diz respeito ao seu uso no cultivo celular, propriedades anticancerígenas têm sido demonstradas. Inibição de células tronco

cancerígenas, melhoria da resistência à quimioterapia, sinergismo com medicamentos quimioterápicos mediante a promoção da apoptose, entre outros, são alguns dos benefícios na oncologia experimental (LI, 2019; WANG, 2019).

Em cultivo de células tronco, o uso da DFO é utilizado para mimetizar uma condição de hipóxia nas células interferindo com a hidroxilação do *HIF-1*. O fator induzido pela hipóxia (*HIF-1*) é um regulador chave da resposta celular as mudanças na concentração de oxigênio, uma vez que é uma proteína instável que se degradada em normóxia devido a hidroxilação. Em condições de hipóxia ou na presença de DFO, sua degradação não acontece, havendo seu acúmulo e translocação para o núcleo das células. O DFO captura ions importantes para a hidroxilação do *HIF-1*, impedindo assim a sua degradação e mimetizando os efeitos causados pela hipóxia (JAAKKOLA et al., 2001). Independentemente de ser causado por hipóxia ou pela presença do DFO, o *HIF-1* acumulado, após sua translocação para o núcleo, atua como promotor da expressão de diversos genes envolvidos na sobrevivência celular, apoptose, angiogênese e neurogênese (LIU et al., 2016).

O uso do DFO foi pouco explorado no cultivo de MSCs, mas um estudo demonstrou que BMSCs aplicadas junto com DFO reforçam o efeito *homing* de migração em direção à área de hipóxia em feridas cutâneas, aceleram a diferenciação das células tronco e melhora a neovascularização do tecido isquêmico (ZHENG, 2019).

2.6. Hipóxia e MSC

O uso das MSCs tem atraído a atenção como uma ferramenta promissora na medicina regenerativa e terapia celular, porém sua aplicação é limitada devido à perda de viabilidade celular induzida pelo microambiente, quase sempre hostil, durante o transplante (BURAVKOVA et al., 2014). Dentre os diversos fatores que influenciam as condições do microambiente de injúria, é conhecido que a hipóxia afeta o potencial de auto renovação e diferenciação de MSCs (ROSOVÁ et al., 2008). Por um lado, acredita-se que a morte das MSC após transferência, e por consequente a falha da terapia é causada por condições isquêmicas no foco de lesão (ZHU et al., 2006). Por outro lado, sabe-se que os depósitos endógenos

de MSC no organismo apresentam uma pressão parcial de O₂ relativamente baixa, demonstrando a resistência das MSCs a condições de hipóxia (BURAVKOVA et al., 2014), a qual promove um aumento de sua capacidade de renovação e diferenciação (GRAYSON et al., 2007; LENNON, et al., 2001).

Em condições com tempo de exposição *in vitro* a hipóxia entre 0 e 72 horas e concentrações de O₂ entre 0,5 e 5%, um aumento no número de células apoptóticas aparece entre 3 e 24 horas de exposição (CHACKO et al., 2010; PETERSON et al., 2011; ZHU et al., 2006). No entanto, nestas condições, geralmente a hipóxia é combinada com a privação de soro, o que dificulta comparações diretas (NIE et al., 2011; ZHANG et al., 2009). Apesar do aumento da morte celular e da inibição da proliferação de MSCs submetidas a hipóxia *in vitro* por curtos períodos, a sua atividade de migração, tanto na cicatrização de feridas como em testes com câmara de Boyden foi aumentada após 6 a 20 horas de incubação em condições de baixo O₂ (BUSLETTA et al., 2011; LEE et al., 2010).

Vários trabalhos têm descrito as vantagens ou desvantagens do cultivo de MSC em condições de hipóxia, no entanto ainda não existe um consenso sobre estes efeitos visando sua aplicação futura em protocolos de terapia celular. O cultivo de MSCs em condições de hipóxia tem sido utilizado para pré-condicionar células antes do transplante terapêutico em casos de doenças hepáticas (YU et al, 2013), neurológicas (WEI et al., 2012), ósseas (FAN et al., 2015) e vários tipos de doenças isquêmicas (LUO et al., 2019). No entanto, a manutenção de um ambiente estável de hipóxia necessita de equipamento especializado e tem custo elevado para a manutenção da atmosfera adequada. Além disso, a exposição não constante a condição de hipóxia durante o cultivo leva a variações no metabolismo celular que dificultam a interpretação dos resultados obtidos (FUJISAWA et al., 2018).

2.7. Inflamação

A imunidade inata se refere a capacidade do organismo de concentrar rapidamente células e moléculas de defesa no local de invasão para se proteger de danos e invasão microbiana. Este processo ativa células como neutrófilos e macrófagos e direciona seu caminho no fluxo sanguíneo para o local de invasão.

Quando a imunidade adaptativa é ativada, outras moléculas como anticorpos e componentes do complemento são produzidos, auxiliando como protetores. Do mesmo modo que os neutrófilos, estes componentes estão restritos ao fluxo sanguíneo, ingressando unicamente nos tecidos quando houver inflamação tecidual (TIZARD, 2017).

As células do sistema imune secretam uma quantidade de proteínas cuja função é regular a resposta imune mediante comunicação intercelular para garantir uma reação sincronizada das células dos diferentes tecidos. Diferentemente dos hormônios, as citocinas afetam uma ampla variedade de células e órgãos, uma só célula normalmente secreta mais de uma citocina de uma vez, e muitas citocinas diferentes podem gerar a mesma resposta. Com toda esta complexidade, o conceito de rede de citocinas foi criado para explicar a forma em que o sistema imune é regulado. Dentre as principais citocinas estão as interleucinas 1 até 18 (*IL 1-18*), interferon α , β , e γ , (*IFN α , β , e γ*) o fator de necrose tumoral α e β (*TNF α e β*) fatores estimuladores de colônias-granulócito (*G-CSF*), macrófago (*M-CSF*) e granulócito-macrófago (*GM-CSF*), fator de crescimento fibroblástico ácido e básico (*aFGF* e *bFGF* respectivamente), entre outros. Normalmente estas proteínas são sintetizadas em minutos e são liberadas pelo efeito específico de estímulos locais exercendo seu efeito unindo-se a receptores altamente específicos na superfície das células onde irão atuar (TSANEV E IVANOV, 2001; TIZARD, 2017).

2.8. MSC e a modulação imune

Sua baixa imunogenicidade e suas funções na modulação do sistema imune fazem das MSCs candidatas promissórias para uso em terapia celular. As MSCs têm a capacidade de promover ou restringir a inflamação quando o sistema está imunossuprimido ou superativado, respectivamente (JIANG E XU, 2019). Estas funções são controladas em grande parte pela atividade parácrina, produzindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e vesículas extracelulares (GOMZIKOVA et al., 2019) que trabalham de uma maneira sinérgica com mecanismos dependentes de contato celular. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na imunomodulação mediada por MSCs continuam sendo um desafio sendo, portanto, pouco claros, já que as diferentes

fontes de obtenção e as variações nos protocolos de cultivo fazem que as MSCs tenham variações na expressão de marcadores de superfície, perfis de secreção de citocinas e expressão genica (WEISS; DAHLKE 2019).

Mesmo assim existem padrões e caminhos que parecem ser consistentes e foram repetidamente demonstrados. É bem sabido que as MSCs sentem os sinais de perigo por meio de receptores tipo TROL (*TLRs*) os quais reconhecem a célula lesada ou o patógeno e estimulam tanto as células imunes como as MSCs, para que, estas últimas, liberem os fatores anti-inflamatórios. Porém, dependendo do tipo de *TLRs* ativado pode ocorrer a indução de um fenótipo pro ou anti-inflamatório nas MSCs. O *TLR3* induz o fenótipo anti-inflamatório (fenótipo MSC2) com secreção de *IL-6*, *IL-8* ou *TGF-β*, e *TLR4* o fenótipo pro-inflamatório (fenótipo MSC1) com uma alta produção de *IL-10*, *iNOS* (rato), indoleamine 2,3-dioxigenase (*IDO*) (humano), e prostaglandina E (*PGE2*) (AYALA-CUELLAR et al., 2019). Acredita-se que a *iNOS* nos ratos e a *IDO* nos humanos, secretada pelas células T secretoras sob influência de citocinas pro-inflamatórias, são a chave entre os efeitos imunomoduladores das MSCs e seu respectivo fenótipo (JIANG E XU 2019). Além de disso, o microambiente, também pode influenciar e mudar o fenótipo das MSCs (WANG et al., 2014).

Adicionalmente, existem citocinas pro-inflamatórias capazes de ativar a função imunossupressora das MSCs, entre eles estão a *IL-1β*, *TNF-α* e o *IFN-γ*. A ação imunossupressora das MSCs se dá pela regulação das células dentriticas, natural killers, macrófagos, células B e T (*CD4+* e *CD8+*), polarizando os monócitos/macrófagos em direção a um fenótipo tipo 2 e por conseguinte a inibição da diferenciação para tipo 1 (WEISS E DAHLKE 2019). Dentre eles, o *IFN-γ* é considerado crítico para que as MSCs cumpram essa função (JIANG E XU 2019).

2.8.1. Interferon γ

Único interferon tipo II e chamado assim pela sua atividade antiviral, interferindo na síntese proteica e de RNA dos vírus. No entanto, sua atividade antiviral é mínima e secundaria quando comparada com os outros interferons, sendo a molécula destacada pela atividade imunomoduladora. O *IFN-γ* é produzido pelos linfócitos T, algumas células T *CD8+*, e células NK. De forma

geral, sua atividade biológica pode ser dividida em três: defesa do hospedeiro regulando a expressão de proteínas do MHC I e II da maioria de células imunes, com a exceção de inibir a expressão de MHC II nas células B; é o principal ativador de macrófagos e é a principal citocina responsável pela indução de mecanismos mediados por células NO específicas.

Existe certeza de que a resposta inflamatória é mediada em grande parte pelo IFN- γ , devido ao seu sinergismo com o TNF. Diversos estudos afirmam que o IFN- γ tem muito a ver no desenvolvimento e severidade de autoimunidade sistêmica, principalmente no lúpus eritematoso. O IFN- γ atua de diferentes maneiras e por diferentes mecanismos no desenvolvimento de várias respostas autoimunes, e sua natureza multifacetária na imunidade adaptativa evidencia possíveis alvos terapêuticos com benefícios promissores. No entanto seu papel neste processo ainda está sujeito a investigação (FARRAR E SCHREIBER, 1993; POLLAR et al., 2013).

2.8.2. Interferon γ e MSCs

As MSCs têm ganhado um lugar importante como ferramenta para a terapia celular devido ao seu amplo controle do sistema imune. Diversas afeções vêm sendo tratadas com MSCs, entre elas a diabetes, artrite reumática, doença de Crohn, Lúpus eritematoso sistêmico e enfermidade de implante vs hospedeiro, porém com resultados heterogêneos e com a necessidade de aplicar uma quantidade muito alta de células para atingir um resultado terapêutico (SILVA-CARVALHO et al., 2019). Uma alternativa para suprir estas desvantagens é o uso de IFN γ para incrementar o potencial imunossupressor das MSCs e resolver os conflitos halogênicos produzidos pelos transplantes de órgãos (KIM et al., 2018). Resumidamente as MSCs ativadas com IFN- γ poderiam modular direta ou indiretamente as respostas das células T mediante a indução de fatores inibidores de MSCs. Fatores que diminuem a ativação, melhoram a sinalização negativa e modificam as células T para um fenótipo anti-inflamatório, além disso também interatuam com células apresentadoras de antígeno e incrementam ou induzem células reguladoras. No entanto estudos *in vivo* mostram opiniões contraditórias sobre o seu uso, alegando um aumento da

imunogenicidade com o uso do IFN- γ e afetando assim negativamente a sobrevivência do implante (SIVANATHAN et al., 2014).

Frente ao exposto, a hipótese do presente experimento é de que MSC caninas expostas ao DFO irão apresentar capacidade imunomodulatória e produção de proteínas relacionadas a resistência ao estresse oxidativo semelhante ao de células estimuladas com agentes promotores de inflamação. Sendo assim, o presente experimento visa estudar os efeitos do cultivo de MSC obtidas de tecido adiposo canino em presença de DFO avaliando seu potencial de proliferação, índice de apoptose e secretoma, bem como o padrão de expressão de genes associados ao estresse oxidativo, morte celular, angiogênese e imunomodulação.

3. HIPOTESE

Hipotetizamos que a adição da desferroxamina (DFO) e do IFN- γ , durante a cultura, será capaz de mimetizar as condições de hipóxia e inflamação observada nos tecidos lesados, criando um ambiente de modulação da função das MSCs. Este ambiente de modulação *in vitro* irá influenciar a sobrevivência, proliferação e a expressão de transcritos produzidos por MSCs favorecendo a adaptação destas as condições terapêuticas.

4. OBJETIVO

O objetivo geral é estudar a resposta das MSCs obtidas de tecido adiposo canino ao ambiente de cultivo com desferroxamina (DFO), como mimético de hipóxia, e na presença do agente pró-inflamatório IFN- γ , bem como a associação dos dois, por 48 horas, avaliando sua influência na sobrevivência, proliferação e a expressão genica de MSCs caninas.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a taxa de proliferação e índice de apoptose mediante curva de crescimento e análise por citometria de fluxo de MSCs de tecido adiposo canino submetido às diferentes condições de cultivo.
- Avaliar a expressão dos genes CASP8, CASP9, HDAC1, DKC1,

DNMT1, HGF, PGE2, IDO, FGF2, VEGFA, MMP2, IL-6, BCL2, TP53, Cyclin-D1 e GADPH pelas MSCs submetidas às diferentes condições de cultivo, focando nas mudanças de modulação da resposta imune, angiogênese, resistência ao estresse oxidativo e atividade anti-apoptótica.

Agradecimento. - À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

5. REFERENCIAS¹

AIRLEY, R.E.; MONAGHAN, J.E.; STRATFORD, I.J. Hypoxia and disease: opportunities for novel diagnostic and therapeutic prodrug strategies. **Pharmaceutical journal**, v.264, n.7094, p.666-673. 2000.

AL-KHALDI, A.; ELIOPOULOS, N.; MARTINEAU, D.; LEJEUNE, L.; LACHAPELLE, K.; GALIPEAU, J. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. **Gene Therapy**, v.10, p.621–629, 2003.

AMORIN, B.; VALIM, V.S.; LEMOS, N.E.; MORAES JÚNIOR, L.; SILVA, A.M.P.; SILVA, M.A.L. Immunological Properties and Clinical Applications. **Revista HCPA**, v.32, n.1, p.71–81, 2012.

AOUAD, F.; FLORENCE, A.; ZHANG, Y.; COLLINS, F.; HENRY, C.; WARD, R. J.; CRICHTON, R.R. Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. **Inorganica Chimica Acta**, v.339, p.470-480. 2002.

AURORA, A.B.; OLSON, E.N. Immune modulation of stem cells and regeneration. **Cell Stem Cell**, v.15, p.14–25, 2014.

AYALA-CUELLAR, A.P.; KANG, J.H.; JEUNG, E.B.; CHOI, K.C. Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation. **Biomolecules & therapeutics**, 27(1), 25, 2019.

¹ Referencias organizadas de acordo com as normas vigentes da ABNT.

BAGLIO, S.R.; PEGTEL, D.M.; BALDINI, N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. **Frontiers in Physiology**, v.3, p.359, 2012.

BAJADA, S.; MAZAKOVA, I.; RICHARDSON, J.B.; ASHAMMAKHI, N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v.2, p.169–183, 2008.

BAKMIWEWA, S.M.; HENG, B.; GUILLEMIN, G.J.; BALL, H.J.; HUNT, N.H. An effective, low-cost method for achieving and maintaining hypoxia during cell culture studies. **Biotechniques**, v.59, n.4, p.223-229, 2015.

BERNARDO, M.E.; FIBBE, W.E. Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. **Cell Stem Cell**, v.13, p.392–402, 2013.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, v.2, p.313–319, 2008.

BIEBACK, K.; KERN, S.; KLÜTER, H.; EICHLER, H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem cells**, v.22, p.625–634, 2004.

BOUFFI, C.; BONY, C.; COURTIES, G.; JORGENSEN, C.; NOEL, D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. **PLoS ONE**, v.5, n.12, p.e14247, 2010.

BURAVKOVA, L.B.; ANDREEVA, E.R.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? **Mitochondrion**, v.19, p.105–112, 2014.

BUSLETTA, C.; NOVO, E.; VALFRÈ DI BONZO, L.; POVERO, D.; PATERNOSTRO, C.; IEVOLELLA, M.; PAROLA, M. Dissection of the biphasic

nature of hypoxia-induced motogenic action in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.29, p.952–963, 2011.

CAPLAN, A.I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. **Journal of cellular physiology**, v.213, n.2, p.341–347, 2007.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells: time to change the name! **Stem cells translational medicine**, v.6, n.6, p.1445-1451. 2017.

CARRIÈRE, A.; EBRAHIMIAN, T.G.; DEHEZ, S.; AUGÉ, N.; JOFFRE, C.; ANDRÉ, M.; CASTEILLA, L. Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.29, n.7, p.1093-1099, 2009.

CERON, W.; LOZADA-REQUENA, I.; VENTOCILLA, K.; JARA, S.; PINTO, M.; CABELLO, M.; AGUILAR, J.L. Células tronco mesenquimales: definiciones, cultivo y aplicaciones potenciales. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v.33, n.4, p.758–771, 2016.

CHACKO, S.M.; AHMED, S.; SELVENDIRAN, K.; KUPPUSAMY, M.L.; KHAN, M.; KUPPUSAMY, P. Hypoxic preconditioning induces the expression of prosurvival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.299, p.C1562–C1570, 2010.

CHAYTOR, J.L.; TOKAREW, J.M.; WU, L.K.; LECLÈRE, M.; TAM, R.Y.; CAPICCOTTI, C.J.; BEN, R.N. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. **Glycobiology**, v.22, n.1, p.123–133, 2012.

CHEN, K.; WANG, D.; DU, W.T.; HAN, Z.B.; REN, H.; CHI, Y.; HAN, Z.C. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive

activities through a PGE2-dependent mechanism. **Clinical Immunology**, v.135, p.448–458, 2010.

CHENIER, T.S. The normal male reproductive system. In.: SAMPER, C.; PYCOCK, F.; MCKINNON, O. **Current therapy in equine reproduction**. Saunders Elsevier, 2007.

CHOW, D.C.; WENNING, L.A.; MILLER, W.M.; PAPOUTSAKIS, E.T. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. **Biophysical Journal**, v.81, p.675–684, 2001.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: Progress and perspectives. **Theriogenology**, v.75, n.8, p.1400–1415, 2011.

CRISOSTOMO, P.R.; WANG, Y.; MARKEL, T.A.; WANG, M.; LAHM, T.; MELDRUM, D. R. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF- κ B- but not JNK-dependent mechanism. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.294, n.3, p.C675–C682, 2008.

CROVACE, A.; LACITIGNOLA, L.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. **Veterinary research communications**, v.31, p.281-283, 2007.

D'IGNAZIO, L.; BANDARRA, D.; ROCHA, S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. **FEBS Journal**, v.283, n.3, p.413–424, 2016.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v.119, n.11, p.2204-2213. 2006.

DA SILVA MEIRELLES, L.; NARDI, N. B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v.14, p.4281–4298, 2009.

DAVILA, J.C.; CEZAR, G.G.; THIEDE, M.; STROM, S.; MIKI, T.; TROSKO, J. Use and application of stem cells in toxicology. **Toxicological Sciences**, v.79, n.2, p.214–223, 2004.

DAVIS, C.K.; JAIN, S.A.; BAE, O.N.; MAJID, A.; RAJANIKANT, G.K. Hypoxia mimetic agents for ischemic stroke. **Frontiers in cell and developmental biology**, v.6, p.175. 2019.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P. D.; MATTEUCCI, P.; GIANNI, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v.99, n.10, p.3838–3843, 2002.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315–317, 2006.

ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and Inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v.364, n.7, p.656–665, 2011.

FAN, L.; ZHANG, C.; YU, Z.; SHI, Z.; DANG, X.; WANG, K. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and osteogenesis in rabbit femoral head osteonecrosis. **Bone**, v. 81, p. 544-553, 2015.

FARRAR, M.A.; SCHREIBER, R.D. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. **Annual review of immunology**, v.11, n.1, p.571-611. 1993.

FUJISAWA, K.; TAKAMI, T.; OKADA, S.; HARA, K.; MATSUMOTO, T.; YAMAMOTO, N.; SAKAIDA, I. Analysis of metabolomic changes in mesenchymal stem cells on treatment with desferrioxamine as a hypoxia mimetic compared with hypoxic conditions. **Stem Cell**, v.36, n.8, p.1226-1236, 2018.

GAO, F. CHIU, S.M.; MOTAN, D.A.L.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; JI, H.L.; LIAN, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell Death and Disease**, v.7, n.1, p.e2062, 2016.

GNECCHI, M.; MALPASSO, G.; CIUFFREDA, M. C. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. In: GNECCHI, M. (Ed.). **Mesenchymal Stem Cells. Methods and protocols**. p. 123–146. 2016.

GOMZIKOVA, M.O.; JAMES, V.; RIZVANOV, A.A. Therapeutic application of mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles for immunomodulation. **Frontiers in immunology**, v.10, p.2663, 2019

GRAYSON, W.L.; ZHAO, F.; BUNNELL, B.; MA, T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.358, n. 3, p. 948–953, 2007.

GUZY, R. D.; SCHUMACKER, P. T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. **Experimental Physiology**, v.91, n.5, p.807–819, 2006.

HARTING, M.T.; SRIVASTAVA, A.K.; ZHAORIGETU, S.; BAIR, H.; PRABHAKARA, K. S.; TOLEDANO FURMAN, N.E.; OLSON, S.D. Inflammation-Stimulated Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Inflammation. **Stem Cells**, v.36, n.1, p.79–90, 2018.

HEMPHILL, J.C.; SMITH, W.S.; SONNE, D.C.; MORABITO, D.; MANLEY, G.T.; Relationship between brain tissue oxygen tension and CT perfusion: feasibility

and initial results. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v.26, n.5, p.1095–1100, 2005.

HU, X.; YU, S.P.; FRASER, J.L.; LU, Z.; OGLE, M.E.; WANG, J.A.; WEI, L. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.135, n.4, p.799–808, 2008.

IVANOVIC, Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, n. 2, p. 271–275, 2009.

IWASE, T.; NAGAYA, N.; FUJII, T.; ITOH, T.; MURAKAMI, S.; MATSUMOTO, T.; KITAMURA, S. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. **Cardiovascular Research**, v.66, n.3, p.543–551, 2005.

JAAKKOLA, P.; MOLE, D.R.; TIAN, Y.M.; WILSON, M.I.; GIELBERT, J.; GASKELL, S. J.; RATCLIFFE, P.J. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. **Science**, v.292, n.5516, p.468-472, 2001.

JACKSON, M.V; MORRISON, T.J.; DOHERTY, D.F.; MCAULEY, D.F.; MATTHAY, M.A.; KISSENPENNIG, A.; KRASNODEMBSKAYA, A.D. Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes (TNT) is an Important Mechanism by which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the in vitro and in vivo Models of ARDS. **Stem Cells**, v.34, p.2210–2223, 2016.

JIANG, Y.; VAESSEN, B.; LENVIK, T.; BLACKSTAD, M.; REYES, M.; VERFAILLIE, C.M. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. **Experimental Hematology**, v.30, n.8, p.896–904, 2002.

JOHNSON, P.C.; VANDEGRIFF, K.; TSAI, A.G.; INTAGLIETTA, M. Effect of acute hypoxia on microcirculatory and tissue oxygen levels in rat cremaster muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.98, n.4, p.1177–1184, 2005.

JUN, E.K.; ZHANG, Q.; YOON, B.S.; MOON, J.H.; LEE, G.; PARK, G.; YOU, S. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/AKT pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.1, p.605–628, 2014.

KALINOWSKI, D.S.; RICHARDSON, D.R. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. **Pharmacological reviews**, v.57 n.4, p.547-583. 2005.

KIM, D.S.; JANG, I.K.; LEE, M.W.; KO, Y.J.; LEE, D.H.; LEE, J.W.; YOO, K.H.; Enhanced immunosuppressive properties of human mesenchymal stem cells primed by interferon- γ . **EBioMedicine**, v.28, p.261-273. 2018.

KIM, Y.; JO, S.H.; KIM, W.H.; KWEON, O.K. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. **Stem Cell Research & Therapy**, v.6, n.1, p.229–239, 2015.

KIM, Y.; LEE, S.H.; KIM, W.H.; KWEON, O.K. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. **Journal of Veterinary Science**, v.17, n.1, p.123–126, 2016.

KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M.S.; LEE, C.W.; BARR, S.; FUCHS, S.; EPSTEIN, S.E. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. **Circulation Research**, v.94, n.5, p.678–685, 2004.

KUZNETSOV, S.A.; MANKANI, M.H. GRONTHOS, S.; SATOMURA, K.; BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Circulating skeletal stem cells. **Journal of Cell Biology**, v.153, n.5, p.1133–1139, 2001.

LANGE-CONSIGLIO, A.; CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; PEREGO, R.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: In vitro proliferative and multilineage potential assessment. **Equine Veterinary Journal**, v.45, n.6, p.737–744, 2013.

LEE, S.; RYU, M.O.; SEO, M.S.; PARK, S.B.; AHN, J.O.; HAN, S.M.; YOUN, H.Y. Mesenchymal Stem Cells Contribute to Improvement of Renal Function in a Canine Kidney Injury Model. **In Vivo**, v.31, n.6, p.1115–1124, 2017.

LEE, S.H.; LEE, Y.J.; SONG, C.H.; AHN, Y.K.; HAN, H. J. Role of FAK phosphorylation in hypoxia-induced hMSCS migration: involvement of VEGF as well as MAPKS and eNOS pathways. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.298, n.4, p.C847–C856, 2010.

LENIHAN, C. R.; TAYLOR, C. T. The impact of hypoxia on cell death pathways. **Biochemical Society Transactions**, v.41, n.2, p.657–663, 2013.

LENNON, D. P.; EDMISON, J. M.; CAPLAN, A. I. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. **Journal of cellular physiology**, v.187, n.3, p.345–355, 2001.

LI, B.; ESPÓSITO, B.P.; WANG, S.; ZHANG, J.; XU, M.; ZHANG, S.; LIU, S. Desferrioxamine-cafeine shows improved efficacy in chelating iron and depleting cancer stem cells. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.52, p.232-238. 2019.

LIN, Q.; ZHAO, S.; ZHOU, L.L.; FANG, X.S.; FU, Y.; HUANG, Z.T. Mesenchymal stem cells transplantation suppresses inflammatory responses in global cerebral ischemia: contribution of TNF- α -induced protein 6. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.34, n.6, p.784–792, 2013.

LIU, L.; GAO, J.; YUAN, Y.; CHANG, Q.; LIAO, Y.; LU, F. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. **Cell biology international**, v.37, n.6, p.551-560, 2013.

LIU, G.; PESHAVARIYA, H.M.; HIGUCHI, M.; CHAN, E.C.; DUSTING, G.J.; JIANG, F. Pharmacological priming of adipose-derived stem cells for paracrine VEGF production with deferoxamine. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v.10, n.3, p.E167-E176, 2016.

LIU, Z D.; HIDER, R.C. Design of iron chelators with therapeutic application. **Coordination Chemistry Reviews**, v.232, n.1-2, p.151-171. 2002.

LOVATI, A. B.; CORRADETTI, B., CONSIGLIO, A. L., RECORDATI, C., BONACINA, E., BIZZARO, D., & CREMONESI, F. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. **Veterinary Research Communications**, v.35, n.2, p.103–121, 2011.

LOVE, C.C.; GARCIA, M.C.; RIERA, F.R.; KENNEY, R.M. Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. **Journal of reproduction and fertility**., v.44, n. SUPPL p.99-105, 1991.

LUO, R.; Lu, Y.; Liu, J.; Cheng, J.; Chen, Y. Enhancement of the efficacy of mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.109, p.2022-2034, 2019.

MA, S.; XIE, N.; LI, W.; YUAN, B.; SHI, Y.; WANG, Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death and Differentiation**, v.21, n.2, p.216–225, 2014.

MASON, C.; MANZOTTI, E. Regenerative medicine cell therapies: Numbers of units manufactured and patients treated between 1988 and 2010. **Regenerative Medicine**, v.5, n.3, p. 07–313, 2010.

MASTRI, M.; LIN, H.; LEE, T. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. **World Journal of Stem Cells**, v.6, n.2, p.82–93, 2014.

MATIKAINEN, T.; LAINE, J. Placenta - An alternative source of stem cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, n. SUPPL., p.544–549, 2005.

MCILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D.; RODKEY, W.G.; KISIDAY, J.D.; WERP, N.M.; KAWCAK, C.E.; STEADMAN, J.R. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. Arthroscopy: **The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v.27, n.11, p.1552-1561, 2011.

MCKENNA, H.T.; MURRAY, A.J.; MARTIN, D.S. Human adaptation to hypoxia in critical illness. **Journal of Applied Physiology**, v.129, n.4, p.656-663. 2020.

MEISEL, R.; ZIBERT, A.; LARYEA, M.; GÖBEL, U.; DÄUBENER, W.; DILLOO, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Immunobiology**, v.103, n.12, p.4619–4621, 2004.

MIK, E.G.; VAN LEEUWEN, T.G.; RAAT, N.J.; INCE, C. Quantitative determination of localized tissue oxygen concentration in vivo by two-photon excitation phosphorescence lifetime measurements. **Journal of Applied Physiology**, v.97, n.5, p.1962–1969, 2004.

MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D.B.; STROM, S.C. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. **Stem Cells**, v.23, n.10, p.1549–1559, 2005.

MINGUELL, J.J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal Stem Cells. **Experimental biology and medicine**, v.226, n.6, p.507–520, 2001.

MONTEIRO, B.S.; NETO, N.M.A.; DEL CARLO, R.J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v.40, n.1, 2010.

MOON, M.H.; KIM, S.Y.; KIM, Y.J.; KIM, S.J.; LEE, J.B.; BAE, Y.C.; JUNG, J.S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.17, n.5–6, p.279–290, 2006.

MUELLER, S. M.; GLOWACKI, J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. **Journal of cellular biochemistry**, v.82, n.4, p.583–90, 2001.

MÜLLER, A.S.; JANJIĆ, K.; OBEROI, G.; PENSCH, M.; KURZMANN, C.; MORITZ, A.; AGIS, H. Deferoxamine but not dimethyloxalylglycine, L-mimosine, or cobalt dichloride can interfere with the MTT assay. **BioMed research international**, 2018.

NAKAGAMI, H.; MAEDA, K.; MORISHITA, R.; IGUCHI, S.; NISHIKAWA, T.; TAKAMI, Y.; KANEDA, Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.25, n.12, p.2542–2547, 2005.

NARDI, B.N.; DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. In: **Stem Cell**. p. 249–282. 2008.

NIE, Y.; HAN, B.M.; LIU, X.B.; YANG, J.J.; WANG, F.; CONG, X.F.; CHEN, X. Identification of micrnas involved in hypoxia- and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. **International Journal of Biological Sciences**, v.7, n.6, p.762–768, 2011.

OH, J.Y.; RODDY, G.W.; CHOI, H.; LEE, R.H.; YLÖSTALO, J.H. ROSA, R.H.; PROCKOP, D.J. Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n.39, p.16875–16880, 2010.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; JAKONIUK, I.; ANDERSON, S.M. LI, B.; ANVERSA, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v.410, n.6829, p.701–705, 2001.

ORTIZ, L.A.; DUTREIL, M.; FATTMAN, C.; PANDEY, A.C.; TORRES, G.; GO, K.; PHINNEY, D.G. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.26, p.11002–11007, 2007.

PETERSON, K.M.; ALY, A.; LERMAN, A.; LERMAN, L.O.; RODRIGUEZ-PORCEL, M. Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: Role of oxidative stress. **Life Sciences**, v.88, n.1–2, p.65–73, 2011.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**, v.95, n.1, p.9–20, 2004.

POLLARD, K.M.; CAUVI, D.M.; TOOMEY, C.B.; MORRIS, K.V.; KONO, D.H. Interferon- γ and systemic autoimmunity. **Discovery medicine**, v.16, n.87, p.123. 2013.

PRABHAKAR, N.R. Physiological and Genomic Consequences of Intermittent Hypoxia Invited Review: Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. **Journal of Applied Physiology**, v.90, n.5, p.1986–1994, 2001.

PROCKOP, D. J.; REGER, R. L. MSCs: Changing Hypotheses, Paradigms, and Controversies on Mechanisms of Action in Repairing Tissues. In: **Stem Cell Biology and Regenerative Medicine**. New York: Humana Press, p.17–42. 2013.

PROCKOP, D.J.; YOUNG, J. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. **Molecular Therapy**, v.20, n.1, p.14–20, 2012.

RANI, S.; RYAN, A.E.; GRIFFIN, M.D.; RITTER, T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. **Molecular Therapy**, v.23, n.5, p.812–823, 2015.

ROSOVÁ, I.; DAO, M.; CAPOCCIA, B.; LINK, D.; NOLTA, J.A. Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v.26, n.8, p.2173–2182, 2008.

ROY, S.; KHANNA, S.; WALLACE, W.A.; LAPPALAINEN, J.; RINK, C.; CARDOUNEL, A.J.; SEN, C.K. Characterization of Perceived Hyperoxia in Isolated Primary Cardiac Fibroblasts and in the Reoxygenated Heart. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.47, p.47129–47135, 2003.

SADEK, HESHAM A.; SEMENZA, GREGG L. Editorial overview: Hypoxia. **Current Opinion in Physiology**, v.7, p.iii-v. 2019.

SATO, K.; OZAKI, K.; OH, I.; MEGURO, A.; HATANAKA, K.; NAGAI, T.; OZAWA, K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. **Blood**, v.109, n.1, p.228–235, 2007.

SEIFERT, M.; STOLK, M.; POLENZ, D.; VOLK, H.D. Detrimental effects of rat mesenchymal stromal cell pre-treatment in a model of acute kidney rejection. **Frontiers in Immunology**, v.3, p.202, 2012.

SEMENZA, G.L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v.9, p.47-71. 2014.

SEMENZA, G.L.; NEJFELT, M.K.; CHI, S.M.; ANTONARAKIS, S.E. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3'to the human erythropoietin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, n.13, p.5680-5684. 1991.

SEMENZA, G.L.; WANG, G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. **Molecular and cellular biology**, v.12, n.12, p.5447-5454. 1992.

SEMENZA, G.L. Perspectives on oxygen sensing. **Cell**, v.98, n.3, p.281-284. 1999.

SEMENZA, G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. **Journal of applied physiology**, v.88, n.4, p.1474-1480. 2000.

SEMENZA, G.L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. **Current opinion in cell biology**, v.13, n.2, p.167-171. 2001.

SICCO, C.; LO REVERBERI, D.; BALBI, C.; ULIVI, V.; PRINCIPI, E.; PASCUCCHI, L.; TASSO, R. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization. **Stem Cells Translational Medicine**, v.6, p.1018–1028, 2017.

SILVA-CARVALHO, A.É.; SOUSA, M.R.R.; ALENCAR-SILVA, T.; CARVALHO, J.L.; SALDANHA-ARAUJO, F. Mesenchymal stem cells immunomodulation: The road to IFN- γ licensing and the path ahead. **Cytokine & growth factor reviews**, v.47, p.32-42. 2019.

SIVANATHAN, K.N.; GRONTHOS, S.; ROJAS-CANALES, D.; THIERRY, B.; COATES, P.T. Interferon- γ modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.10, n.3, p.351-375. 2014.

SPENCER, J.A.; FERRARO, F.; ROUSSAKIS, E.; KLEIN, A.; WU, J.; RUNNELS, J.M.; LIN, C.P. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. **Nature**, v.508, n.7495, p.269–273, 2014.

TABBARA, I.A.; ZIMMERMAN, K.; MORGAN, C.; NAHLEH, Z. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Archives of internal medicine**, v.162, n.14, p.1558–1566, 2002.

TAYLOR, C.T.; COLGAN, S.P. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. **Nature Reviews Immunology**, v.17, n.12, p.774–785, 2017.

TIZARD, I.R. **Veterinary Immunology-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2017.

THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature reviews immunology**, v.9, n.8, p.581, 2009.

TSAI, M.S.; LEE, J.L.; CHANG, Y.J.; HWANG, S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. **Human Reproduction**, v.19, n.6, p.1450–1456, 2004.

TSANEV, R.G.; IVANOV, I. Immune interferon: properties and clinical applications. **CRC Press**, 2001.

TSUMANUMA, Y.; IWATA, T.; KINOSHITA, A.; WASHIO, K.; YOSHIDA, T.; YAMADA, A.; IZUMI, Y. Allogeneic Transplantation of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets in Canine Critical-Size Supra-Alveolar Periodontal Defect Model. **BioResearch Open Access**, v.5, n.1, p.22–36, 2016.

VITO, A.; EL-SAYES, N.; MOSSMAN, K. Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. **Cells**, 2020, v.9, n.4, p.992.

WAGNER, B.; HENSCHLER, R. Fate of Intravenously Injected Mesenchymal Stem Cells and Significance for Clinical Application. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v.130, p.19–37, 2012.

WANG, L.; LI, X.; MU, Y.; LU, C.; TANG, S.; LU, K.; WEI, W. The iron chelator desferrioxamine synergizes with chemotherapy for cancer treatment. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.56, p.131-138. 2019.

WANG, Y.; CHEN, X.; CAO, W.; SHI, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications. **Nature Immunology**, v.15, n.11, p.1009–1016, 2014.

WEI, L.; FRASER, J.L.; LU, Z.Y.; HU, X.; YU, S.P. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. **Neurobiology of disease**, v.46, n.3, p.635-645. 2012.

WEIDEMANN, A.; JOHNSON, R.S. Biology of HIF-1 α . **Cell Death & Differentiation**, v.15, n.4, p.621-627. 2008.

WEISS, A.R.R.; DAHLKE, M.H. Immunomodulation by mesenchymal stem cells (MSCs): mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. **Frontiers in immunology**, v.10, p.1191, 2019.

WELCH, W.J.; BAUMGÄRTL, H.; LÜBBERS, D.; WILCOX, C.S. Nephron pO₂ and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. **Kidney international**, v.59, n.1, p.230–237, 2001.

WILD, J.M.; FICHELE, S.; WOODHOUSE, N.; PALEY, M.N.; KASUBOSKI, L.; VAN BEEK, E.J. 3D volume-localized pO₂ measurement in the human lung with ³He MRI. **Magnetic Resonance in Medicine**, v.53, n.5, p.1055–1064, 2005.

YU, D.; Cringle, S.J. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. **Experimental eye research**, v. 80, n. 6, p. 745-751, 2005.

YU, J.; Yin, S.; Zhang, W.; Gao, F.; Liu, Y.; Chen, Z.; Zheng, S. Hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells promote liver regeneration in a rat massive hepatectomy model. **Stem cell research & therapy**, v.4, n.4, p.83, 2013.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. PESQUISAS COM CÉLULAS-TRONCO: ASPECTOS CIENTÍFICOS, ÉTICOS E SOCIAIS **Seminário. Seminário Instituto Fernando Henrique Cardoso**, 2004.

ZHANG, W.; SU, X.; GAO, Y.; SUN, B.; YU, Y.; WANG, X.; ZHANG, F. Berberine protects mesenchymal stem cells against hypoxia-induced apoptosis in vitro. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.32, n.8, p.1335–1342, 2009.

ZHENG, S.; DU, Z.; HUANG, X.; ZHUANG, J.; LIN, G.; YANG, Y.; ZAN, T. Experimental study on the effect of desferrioxamine on targeted homing and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi= Zhongguo xiufu chongjian waikē zazhi= Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, v.33, n.1, p.85-92, 2019.

ZHU, W.; CHEN, J.; CONG, X.; HU, S.; CHEN, X. **Stem Cells**, v.24, n.2, p.416–425, 2006.

ZUK, P.A.; ZHU, M.I.N.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v.7, n.2, p.211–228, 2001.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo redigido segundo as normas da Regenerative Therapy

<https://www.journals.elsevier.com/regenerative-therapy>

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS CANINAS CULTIVADAS COM DESFERROXAMINE (DFO) E INTERFERON GAMMA, MIMETIZANDO CONDIÇÕES DE HIPÓXIA E INFLAMAÇÃO

Canine mesenchymal stem cells cultivated with desferrioxamine (DFO) and interferon gamma, mimetizing hypoxia and inflammation conditions

Pablo Eduardo Ocampo Ortiz¹, Viviana Helena Vallejo Aristizabal¹, Joshua Benjamín Andrés Polanco Stuart¹, Thaisy Tino Dellaqua², Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga¹

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu, 18618-681 SP, Brasil.

² Departamento de Fisiologia - IBB - UNESP - Botucatu, 18618-689 SP, Brasil.

Corresponding author: Fernanda da Cruz Landim - Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n. Bairro: Unesp Campus de Botucatu - Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária- FMVZ - UNESP - Botucatu, SP, Brasil. Tel: +5514997611964. E-mail: fernanda.landim@unesp.br

Abstract

Introduction: The immunomodulatory properties of exogenous mesenchymal stem cells (MSCs) have been the target of research in immune-mediated diseases and organ transplants. However, the altered microenvironment (hypoxia, inflammation, increased reactive oxygen species) in these conditions decrease MSCs capabilities and survival post-transplantation. The purpose of this study was to assess the viability, proliferation, and gene expression of canine adipose tissue-derived MSCs (cAT-MSCs) cultured in hypoxia (deferrioxamine

[DFO]) or inflammation (interferon γ [IFN- γ] conditions and both. **Methods:** Since hypoxia and inflammation coexist in the settings of injury and Graft-Versus-Host Disease, we sought to explore how the gene expression of MSCs changes when cells were exposed to 48 h of desferrioxamine (DFO), interferon gamma (IFN- γ), or both cues together. For this, transcripts related to apoptosis, cell survival, immunomodulation, proliferation and differentiation, angiogenesis, cell cycle regulators and cellular regulator of adaptive response to hypoxia were analyzed. Additionally, cell proliferation (144 hours of cultivation) and viability analyzes were performed **Results:** In all groups, the cultured cAT-MSCs showed fibroblastoid morphology and adherence to plastic at 24 hours, but the treated groups present a greater distance between the adhered cells. At 144 hours of cultivation, all groups had a similar behavior in the cell proliferation curve with decreased concentration in the first 48 hours, followed by a maintenance phase and a slight growth at the ending. All treatment groups exhibited a higher cell concentration than the control group at 144 hours. The gene expression revealed increased expression of pro-apoptotic gene Casp9 in group IFN γ than IFN γ + DFO group; the *FGF2* gene related with the cell proliferation and differentiation was increased in the IFN γ group in contrast to other treated groups; The *DKC1* and *PT53* genes related to cell survival and tumor suppression, respectively, had an increased expression in IFN γ group than the DFO group; and the *VEGFA* expression, gene involved in the angiogenesis, was higher in the groups where DFO was used. **Conclusion:** Although genes associated with the increase in survival and cell proliferation were stimulated by IFN- γ , immunomodulatory genes were not affected by the culture conditions tested. The mimicry of hypoxia, on the other hand, led to a decrease in the expression of genes related to these factors associated with a stimulus for angiogenesis. These results indicate that regenerative properties of cAT-MSC were more affected by the culture conditions used in this experiment.

Highlights:

- Cell preconditioning with pro-inflammatory agents increased genes associated with their survival and proliferation capacities.
- Hypoxic environment decreases the expression of genes related to

survival and proliferation and increases an angiogenesis-stimulating transcript.

- Immunomodulatory genes were not influenced by hypoxic and inflammatory conditions

Keywords: immunomodulation, inflammation, gene expression.

List of abbreviations:

Bcl2	B cell lymphoma 2
Casp3	Caspase 3
Casp8	Caspase 8
Casp9	Caspase 9
cAT-MSCs	canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells
DFO	Desferrioxamine
DKC1	Dyskerin 1
DNMT1	DNA methyltransferase 1
EGF	Epidermal growth factor
FGF-2	Fibroblastic growth factor 2
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
hBM-MSCs	Human bone marrow mesenchymal stem cells
HDAC1	Histone deacetylase 1
HGF	Hepatocyte growth factor
Hif1 α	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
IDO	Indoleamine 2, 3-dioxygenase
IL-10	Interleukin 10
IL-6	Interleukin 6
IFN γ	Interferon gamma
iNOS	inducible nitric oxide synthase
ISCT	International Society for Cellular Therapy
MM	Maintenance medium
MMP2	matrix metalloproteinase 2
MSCs	Mesenchymal stem cells
NK	Natural killer

RT- qPCR	quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction
PGE-2	Prostaglandin E2
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TP53	Tumor protein 53

1. Introdução

As MSCs tem sido alvo de investigação devido as suas propriedades biológicas, como proliferação, multipotencialidade, tropismo, imunossupressão, e *homing* e/ou migração [1–5]. Até 2020, 1.138 testes clínicos, utilizando MSCs, foram registrados na *clinicaltrials.gov* [6], com resultados que as posicionam como uma alternativa para o tratamento de diferentes condições clínicas em animais e humanos [7–10]. Porém, nem todas as condições clínicas ou experimentais são favorecidas pela aplicação de MSCs [11] devido à influência do microambiente de cultivo *in vitro* e o *status* clínico do organismo no qual serão aplicadas [12].

As MSCs possuem função imunomoduladora no microambiente da lesão, modificando-o via fatores bioativos que modulam a reação inflamatória e a reparação tecidual [13]. No entanto, as condições clínicas quase sempre estão acompanhadas de uma reação inflamatória e isquêmica [14] e impactam diretamente na sobrevivência e funções biológicas das MSCs. Estudos afirmam que MSCs em condições de hipóxia e baixo suprimento nutricional, podem sofrer apoptose e autofagia [14–16], resultando no insucesso do tratamento. Por outro lado, outros estudos reportam viabilidade aumentada, maior capacidade proliferativa, migratória, de diferenciação celular e de liberação parácrina [17–19].

Algumas alternativas têm sido mencionadas para aumentar a produção de moléculas necessárias para a recuperação de lesões isquêmicas, como o condicionamento das MSCs em ambientes de baixa oxigenação antes do transplante, o que inibe espécies reativas de oxigênio e estimula a secreção de fatores pró-angiogênicos e antiapoptóticos [20–22]. O tratamento das células, durante o cultivo, com citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ também foi citado como uma maneira de prevenir a rejeição após transplante [19,23–25].

Embora o pré-condicionamento de MSCs em condições de hipóxia seja uma metodologia conhecida, o cultivo nestas condições é de custo elevado e difícil de ser padronizado, já que mínimas alterações no ambiente de cultivo podem modificar os resultados experimentais. Desta forma, o uso de agentes que mimetizam os efeitos da hipóxia e inflamação como a desferroxamina (DFO), um agente quelante de íons, e o IFN- γ , respetivamente, tem sido sugerido como alternativa para garantir estabilidade de condições no ambiente de cultivo [26,27].

Apesar de diversos estudos demonstrarem o efeito do IFN- γ sobre a capacidade imunomoduladora das MSCs e reportarem resultados benéficos com o condicionamento por hipóxia para o tratamento de lesões teciduais acompanhadas de isquemia como infarto do miocárdio, falha renal, lesão medular, doença discal, defeito periodontal e feridas cutâneas [23,24,27–38] poucos são os estudos realizados em situações controladas sob condições de hipóxia e inflamação em animais domésticos e particularmente em cães.

Com tudo, a finalidade deste trabalho é melhor compreender as habilidades imunossupressoras e regenerativas das MSCs obtidas de tecido adiposo canino ao ambiente de cultivo com desferroxamina (DFO) e na presença de IFN- γ , associados ou não, mediante testes de proliferação celular, viabilidade e expressão genica.

Sendo assim, é importante entender o impacto das diferentes condições *in vitro* no microambiente das MSCs visando sua adaptação a estas condições *in vivo*. Desta forma, a hipótese do presente trabalho é que a utilização do quelante de íons DFO como mimético de hipóxia, associado ou não ao IFN- γ , irá influenciar a sobrevivência, proliferação e a expressão genica de MSCs caninas. Os resultados encontrados serão comparados aos obtidos com células cultivadas na presença de agentes inflamatórios sozinhos (IFN- γ) e sob condições controle.

2. Material e Métodos

2.1. Reagentes e protocolos

Todos os reagentes utilizados no estudo foram de alto grau de pureza e adquiridos da empresa Thermofisher. Casos contrários foram citados. Os protocolos citados no estudo foram elaborados pelo Laboratório de Terapia Celular e Reprodução Avançada (LANÇA, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da UNESP, Botucatu, Brasil).

2.2. Aspectos éticos

O estudo foi conduzido pelos princípios éticos na experimentação animal, de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da UNESP, Botucatu, Brasil, sob o protocolo 0026/2020.

2.3. Obtenção e caracterização das MSCs

Foram utilizadas amostras de tecido adiposo obtidas de 6 cadelas híginas de raça não definida, com menos de 3 anos de idade e histórico médico sem doenças previas, submetidas a ovariectomia eletiva. Como critério de inclusão no estudo, as cadelas apresentaram PCR negativo para Adenovirus canino tipo I, *Babesia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Leptospira spp.*, *Toxoplasma gondii*, vírus da Cinomose e *Mycoplasma spp.* As MSCs foram mantidas em nitrogênio líquido à -196°C no banco celular do Laboratório de Terapia Celular e Reprodução Avançada (LANÇA, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da UNESP, Botucatu, Brasil). Todas as amostras foram previamente caracterizadas de acordo com as normas da Sociedade Internacional de Terapia Celular, apresentando aderência ao plástico durante o cultivo, morfologia fibroblastoide, marcação positiva para os marcadores de membrana CD44 (abD Serotec, USA) e CD90 (Becton Dickinson and Company, USA), e negativa para o marcador de membrana CD34 (abD Serotec, USA) e baixa marcação (< 5%) do marcador MHCII (abD Serotec, USA).

As amostras foram descongeladas de acordo com Chaytor [39]. As células foram rapidamente descongeladas a 37 °C sob leve agitação, até permanecer uma pequena porção de gelo. Então, as amostras foram transferidas para tubos de centrifugas previamente preparados com 3 mL de meio de manutenção

(DMEM/F12 (code no. 31600034/21700018) acrescido de 20% de soro fetal bovino (code no. 12657029), 1% de Pen-Strep (code no. 15140122) e 1% de Fungizone (code no. 15290026)) a 37 °C, e mantidos na mesma temperatura por 3 minutos. A seguir, foram adicionados mais 9 mL de meio de manutenção, totalizando 12 mL (meio de manutenção e células descongeladas). As células foram centrifugadas a 580 g/10 minutos e avaliados quanto a viabilidade com o Trypan Blue (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, MO, USA).

As células (25.000 células viáveis/cm²) foram depositadas em garrafas de cultivo para o recultivo e mantidas em DMEM/F12 acrescido de 20% de soro fetal bovino, 1% de Pen-Strep e 1% de Fungizone e incubadas a 37.5 °C, com 5% CO₂ em ar e 100% de humidade por 24 horas para garantir a aderência às garrafas. Em seguida o meio foi descartado e as garrafas foram lavadas (3x) com PBS (code no. 70011044). A seguir, os meios e condições de cultivo foram modificados de acordo com os grupos experimentais em um delineamento inteiramente casualizado.

2.4. Cultivo das MSCs e grupos

A condição de hipóxia e inflamação foram mimetizadas com a utilização de DFO (code no. D9533, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e do IFN- γ (code no. I3275, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) respectivamente, no meio de cultivo DMEM/F12 (code no. 31600034/21700018,) sem a adição de soro fetal bovino, vermelho fenol e HEPES, para evitar interferências nas posteriores análises. Apenas garrafas contendo $\geq 80\%$ de confluência celular foram submetidas às diferentes condições de cultivo *in vitro*. No grupo controle as células foram mantidas em DMEM/F-12 contendo 1% de Pen-Strep e 1% de Fungizone (meio base). O grupo DFO foi composto por células mantidas em meio base acrescido de 50 μ mol de DFO. No grupo IFN- γ as células foram mantidas no meio base contendo 50 ng/ml IFN- γ . No grupo IFN- γ + DFO as células foram mantidas no meio base contendo 50 μ mol de DFO e 50 ng/ml IFN- γ . Em todos os grupos, os cultivos foram conduzidos em incubadora a 37,5 °C, com 5% CO₂ em ar e 100% de humidade por 48 horas (Figura 1).

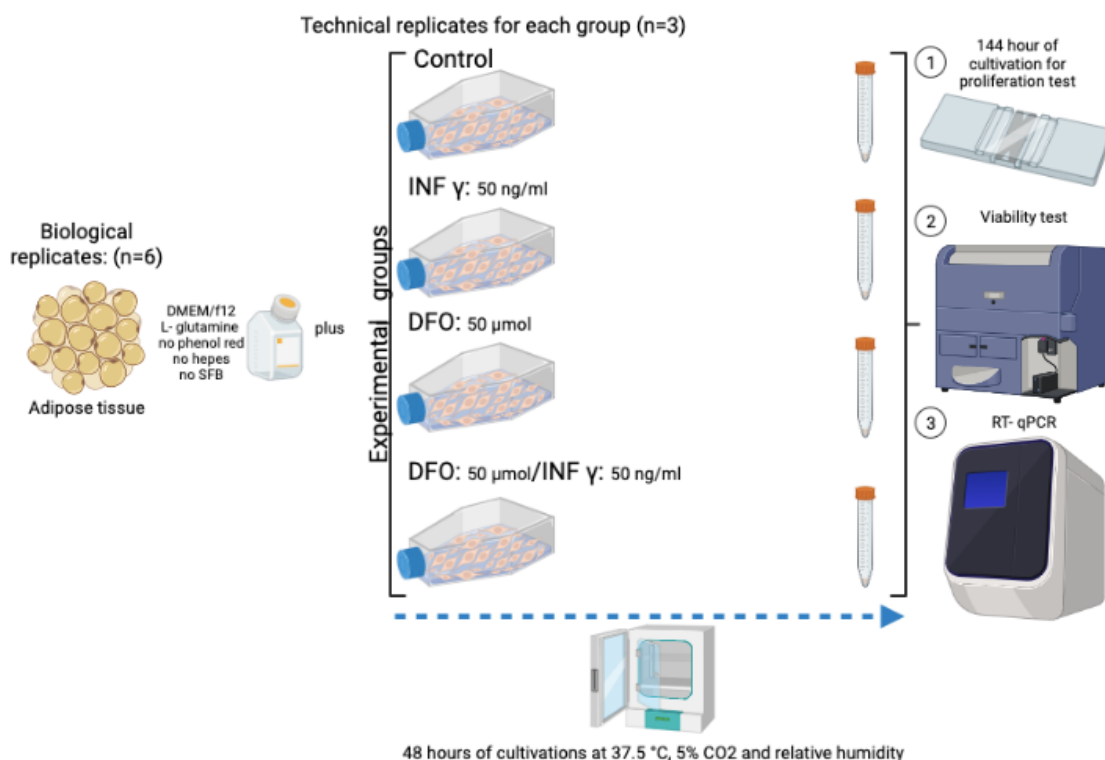


Figura 1. Desenho experimental mostrando a distribuição dos grupos.

2.5. Teste de proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada nas amostras obtidas de 6 animais. Para cada animal um total de 1×10^4 células/poço foram cultivadas em 4 placas de 6 poços por 144 horas. As 4 placas de cada animal representavam os 4 grupos experimentais cultivados sob as condições mencionadas anteriormente. A cada 48 horas de cultivo foi realizada triplicatização, contagem e determinação da viabilidade celular de um poço/grupo usando a coloração de exclusão *Trypan blue* (code no. T8154, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) em câmara de Neubauer. Os dados obtidos foram inseridos numa curva de crescimento em um software de análises de dados.

2.6. Teste de viabilidade com anexina V

A viabilidade celular foi realizada pelo método que avalia a ligação da anexina V (eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) aos fosfolipídeos, que em células em apoptose migram para região externa da membrana plasmática. O iodeto de propídeo foi associado a anexina V a fim de identificar as células em necrose. Para a análise, foram

utilizadas amostras colhidas de 6 animais. Após 48 horas de cultivo nas diferentes condições experimentais (Figura 1) e a remoção do meio condicionado pelas MSCs, as garrafas de cultivo foram lavadas com PBS e tratadas com enzima de dissociação TrypLE (code no. 12563029, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) por 10 minutos a 37 °C. Após este período, o conteúdo da garrafa foi depositado em um tubo plástico de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultivo acrescido de 20% soro fetal bovino para neutralizar o efeito enzimático. As amostras foram lavadas 3 vezes por centrifugação por 10 minutos a 400 g e preparadas segundo recomendações do fabricante. Resumidamente 1×10^6 células/mL foram ressuspensas em uma solução de marcação contendo 5 µL de anexina V e 10 µL de iodeto de propídio. Então, as amostras foram incubadas por 15 minutos a 37 °C e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson® and Company, USA).

Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de população de células vivas, em necrose ou em apoptose. Células vivas não apresentam marcação. Células em apoptose apresentam marcação positiva para anexina V e negativa para iodeto de propídio (apoptose inicial) ou positiva para anexina V e positivas para iodeto de propídio (apoptose tardia). Células em necrose apresentam marcação negativa para anexina V e positiva para iodeto de propídio,

2.7. PCR quantitativa em tempo real (RT- qPCR)

A investigação dos padrões globais de expressão de mRNA das MSCs colhidas após 48 horas de cultivo celular (Figura 1) foi realizada por RT-qPCR, utilizando o sistema Sybr Green™ PCR Master Mix (Applied Biosystems™) no equipamento StepOnePlus™ System (Applied Biosystems™). Resumidamente, as células dos diferentes grupos foram submetidas à extração e purificação do RNA total com TRIzol® (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). As concentrações de RNA total foram mensuradas (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers, Thermo Scientific™). Em seguida, o RNA total foi tratado com DNase (Qiagen®) conforme protocolo do fabricante para eliminação de contaminação com DNA genômico. Posteriormente, a transcrição do RNA em cDNA foi realizada utilizando o kit de transcrição reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems® Thermo Fisher Scientific)

respeitando as etapas de incubação de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante.

A expressão relativa de cada gene alvo foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ e foi corrigida pela eficiência de amplificação das reações utilizando-se a equação descrita por Pfaffl [6]. Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados pelo perfil de amplificação de amostras individualmente pelo software LinRegPCR 11.0. O *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi usado como gene de referência endógeno. A Tabela 1 descreve o painel de genes alvos utilizados para análise de expressão gênica nas cAT-MSCs.

Tabela 1. Genes analisados em cAT-MSCs por RT-qPCR.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos dos genes utilizados para RT-qPCR.

Gene abbreviation	Gene name	Sequence (5'-3')	Biological function of the gene
<i>Bcl-2</i> [40]	B-cell lymphoma 2	F: CCTGTGGATGACTGAGTACC R: GAGACAGCCAGGAGAAATCA	Apoptose
<i>CASP8</i> [40]	Caspase 8	F: ACAAGGGCATCATCTATGGCTCTGA R: CCAGTGAAGTAAGAGGTCAGCTCA	Apoptose
<i>CASP9</i> [40]	Caspase 9	F: TCAGTGACGTCTGTGTTTCAGGAGA R: TTGTTGATGATGAGGCAGTAGCCG	Apoptose
<i>DKC1</i> [41]	Pseudouridine synthase Dyskerin	F: CTGCGGTAAAGAGGCAACTC R: GAATGTAGGTACCGGCCTCA	Cell survival-related gene
<i>HDAC1</i> [41]	Histone deacetylase 1	F: GCTGCACCATGCAAAGAAGT R: TCGCCGTGGTGAATATCAAT	Cell survival-related gene
<i>DNMT1</i> [41]	DNA methyltransferase 1	F: CCCAGACCGCTTCTACTTCC R: ACTTGGCTCGCATGTTTGAG	Cell survival-related gene
<i>HGF</i> [42]	Hepatocyte growth factor	F: GGCTACTGCTCCCAAATTCCA R: CCCACATTGAACATGTTAGTCCAGA	Immunomodulatory gene
<i>IDO</i> [42]	Indoleamine 2,3-dioxygenase	F: GCTGGGTCTGCCTCCTATTC R: GCAGTCTCCACCAGGAAACC	Immunomodulatory gene
<i>PGE2</i> [42]	Prostaglandin E2	F: CTGTCATCACCGGCCAAGT R: CCTGGTCACTCCGGCAATA	Immunomodulatory gene
<i>IL-6</i> [43]	Interleukin-6	F: ATGATCCAATTCAAATAGTCTACC R: AGATGTAGGTTATTTTCTGCCAGTG	Immunomodulatory gene
<i>bFGF</i> [44]	Basic fibroblast growth factor	F: TTCAAGCAGAAGAGAGAGGAG R: TCCGTAACACATTTAGAAGCC	Proliferation and differentiation

<i>MMP2</i> [45]	Matrix metalloproteinase 2	F: ACTTTGATGACGATGAGCTATGGA	Angiogenesis
		R: CCGTCGGCATTCCCATACT	
<i>VEGF</i> [45]	Vascular endothelial growth factor	F: TTGCTGCTCTACCTCCACCAT	Angiogenesis
		R: TGTGCTCTCCTCCTGCCATAG	
<i>Cyclin D1</i> [40]	Cyclin D1	F: TGAACCTACCTGGACCGCT	Cell cycle regulator
		R: CAGGTTCCACTTGAGYTTGT	
<i>P53</i> [40]	Tumor protein 53	F: ATGGGAGGCATGAACCGGCG	Cell cycle regulator
		R: CGGGACAGGCACAAACGCGT	
<i>HIF1-α</i> [46]	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	F: TTACGTTCTTCGATCAGTTGTA	Regulator of response to hypoxia
		R: GAGGAGGTTCTTGCAATTGGAGTC	
<i>GAPDH</i> [45]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: GATGGGCGTGAACCATGAG	Housekeeping gene
		R: TCATGAGGCCCTCCACGAT	

2.8. Análise dos resultados

Todas as análises foram realizadas mediante o software estatístico JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA). Para as diferentes variáveis os testes de Shapiro Wilk ou kolmogorov-smirnov foram implementados para verificar a normalidade y o teste de manchly para verificar esfericidade. A Proliferação celular nos distintos grupos a em 4 tempos diferentes foram analisados pelo teste anova de 2 vias com medidas repetidas, tendo como pos hot o teste sidak. Para a variável viabilidade celular com Anexina foi realizado teste anova de 1 via sem obter diferença estatística. As medias dos efeitos do IFN- γ , IFN- γ /DFO e DFO na abundância relativa de mRNA em cAT-MSCs caninas foram comparadas com o teste de Tukey–Kramer (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados no paramétricos). Os dados são apresentados em medias $\pm$ SEM e diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0.05$. As gráficas foram elaboradas usando o pacote estatístico Graphpad Prism 9.

3. Resultados

3.1. Morfologia celular

As 48 horas de cultivo, as células de todos os grupos mostraram morfologia fibroblastoide e as células estavam aderidas ao plástico.

3.2. Teste de proliferação celular

As cAT-MSCs de todos os grupos apresentaram redução da concentração celular após o início do cultivo até as 96 horas quando houve uma estabilização da concentração até as 144 horas (Figura 2) sem diferença entre os grupos ($p \leq 0.05$).

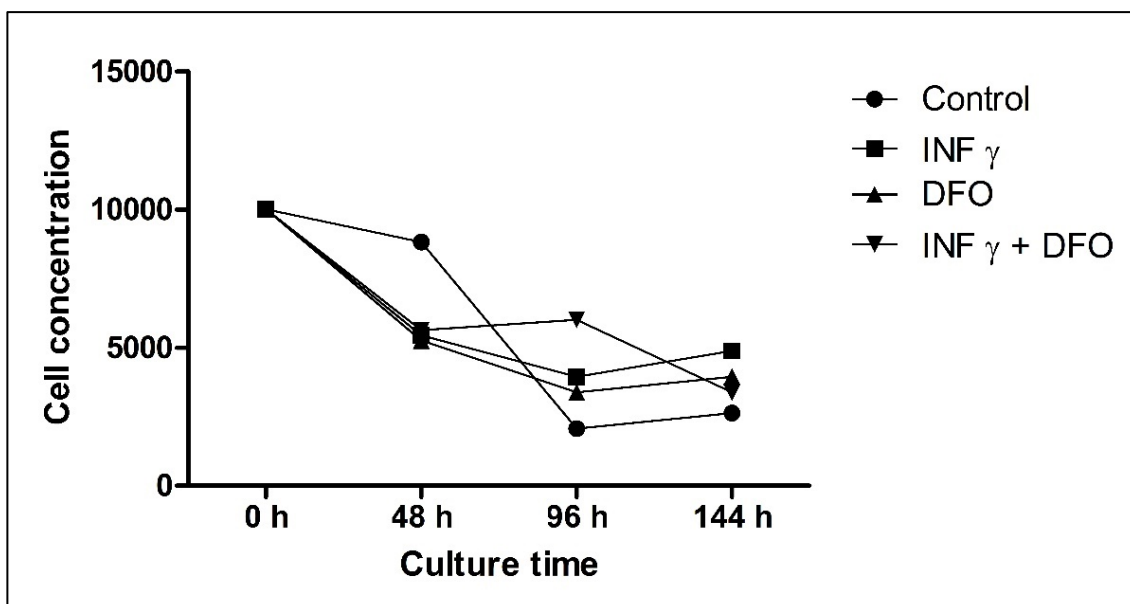


Figura 2. Curva de crescimento de células-tronco mesenquimais após 144 horas em diferentes condições de cultivo celular. Dados representam medias de células colhidas de 6 animais ($p \leq 0.05$).

3.3. Teste de viabilidade com Anexina V

A viabilidade celular (Figura 3) se manteve acima de 90% nos diferentes grupos. Células em apoptose inicial, apoptose tardia e em necrose representaram menos

de 10% das células avaliadas nos diferentes grupos. Não houve diferenças entre os parâmetros avaliados quando comparados entre os grupos experimentais ($p \leq 0.05$).

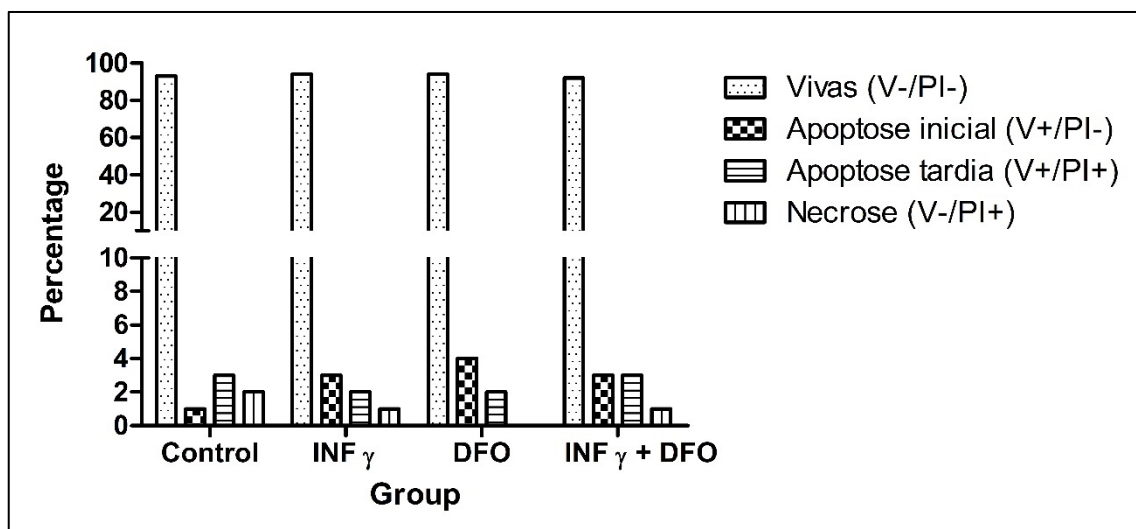
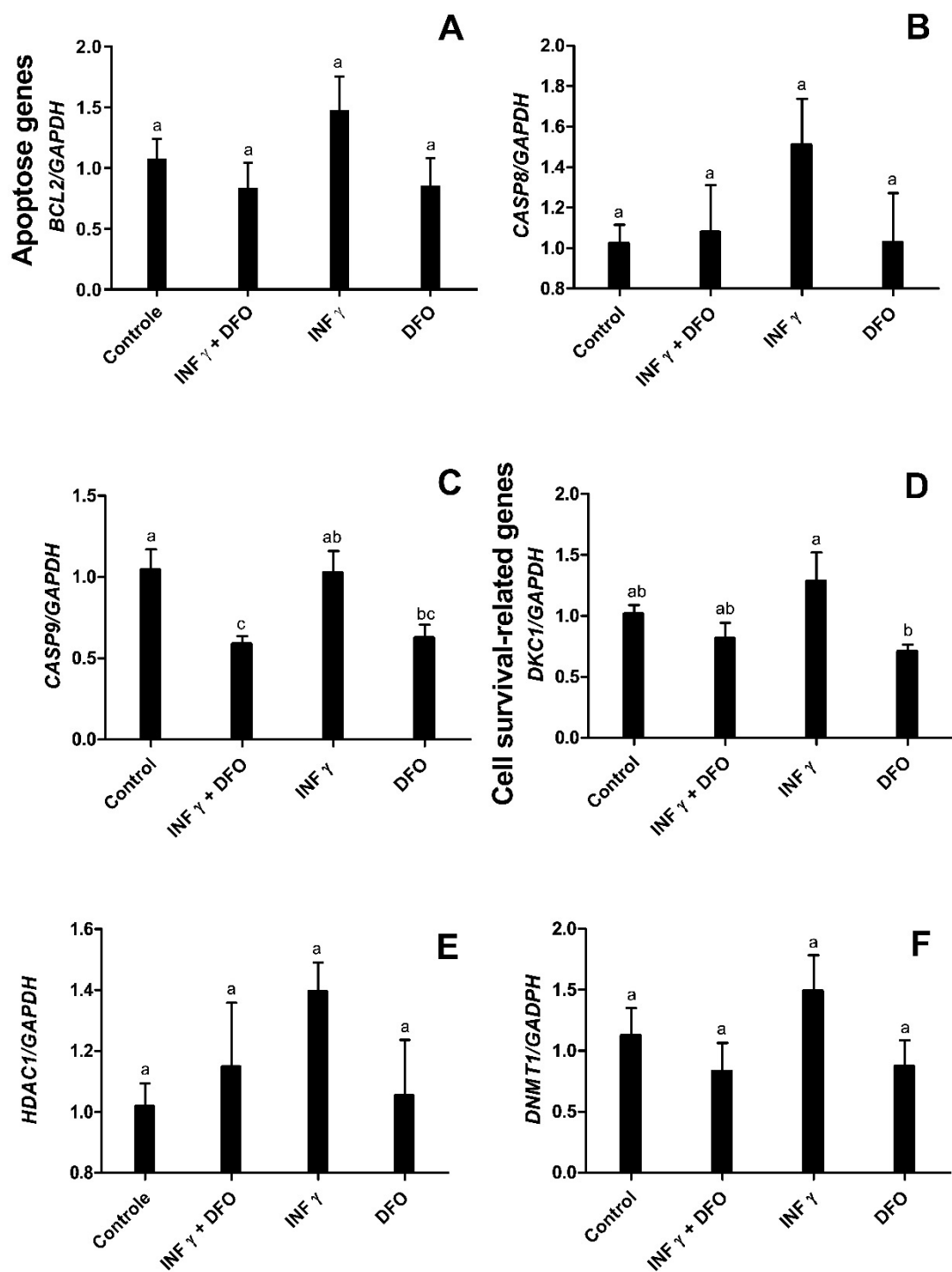
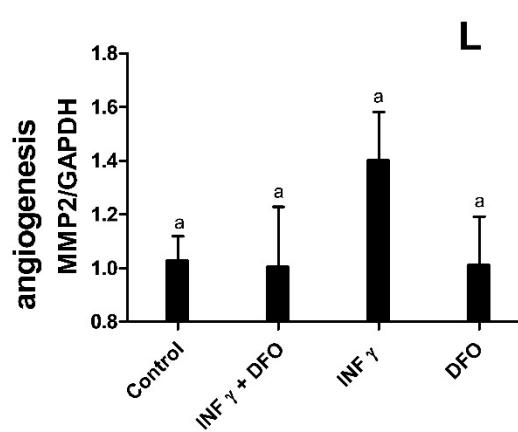
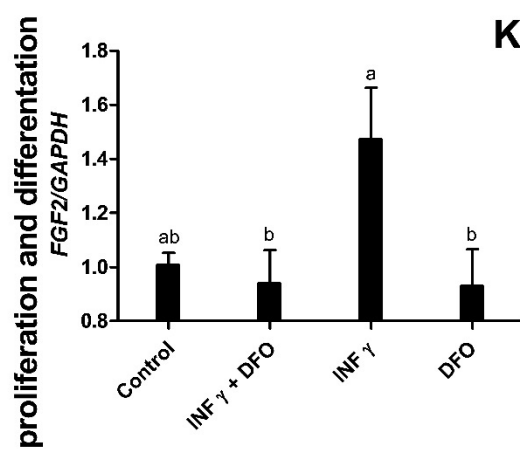
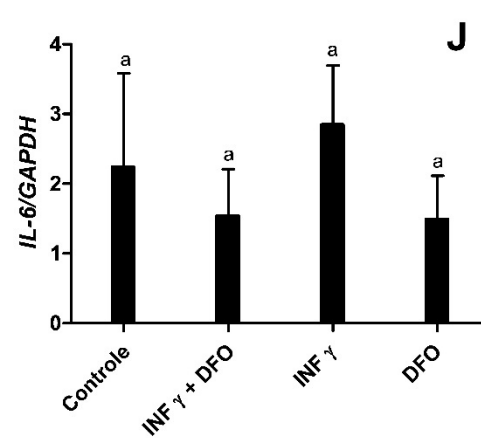
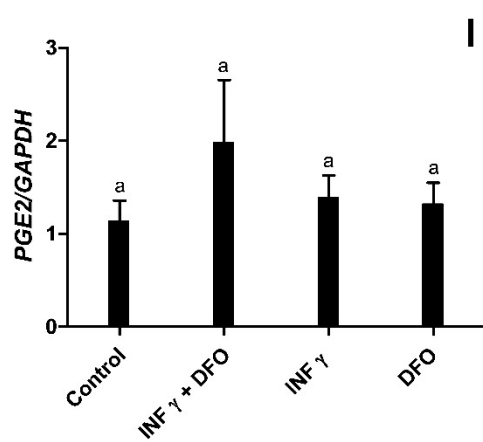
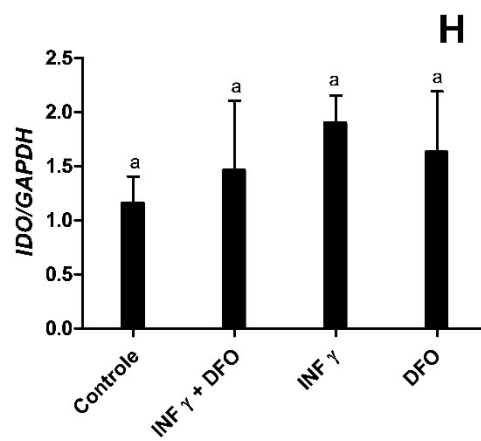
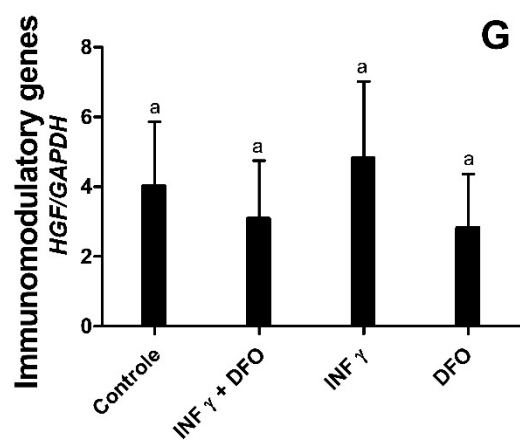


Figura 3. Porcentagem de células vivas, em apoptose ou necrose após o cultivo de células tronco mesenquimais nas diferentes condições experimentais ($p \leq 0.05$).

3.4. Real time quantitative reverse transcriptase-PCR

O efeito do IFN- γ e DFO sobre a expressão gênica das MSCs caninas estão representados na Figura 4. A abundância de transcritos para os genes relacionados com apoptose, sobrevivência celular, proliferação e diferenciação, angiogênese, regulação do ciclo celular e regulador de resposta a hipóxia foi maior no grupo IFN- γ ($p \leq 0.05$).





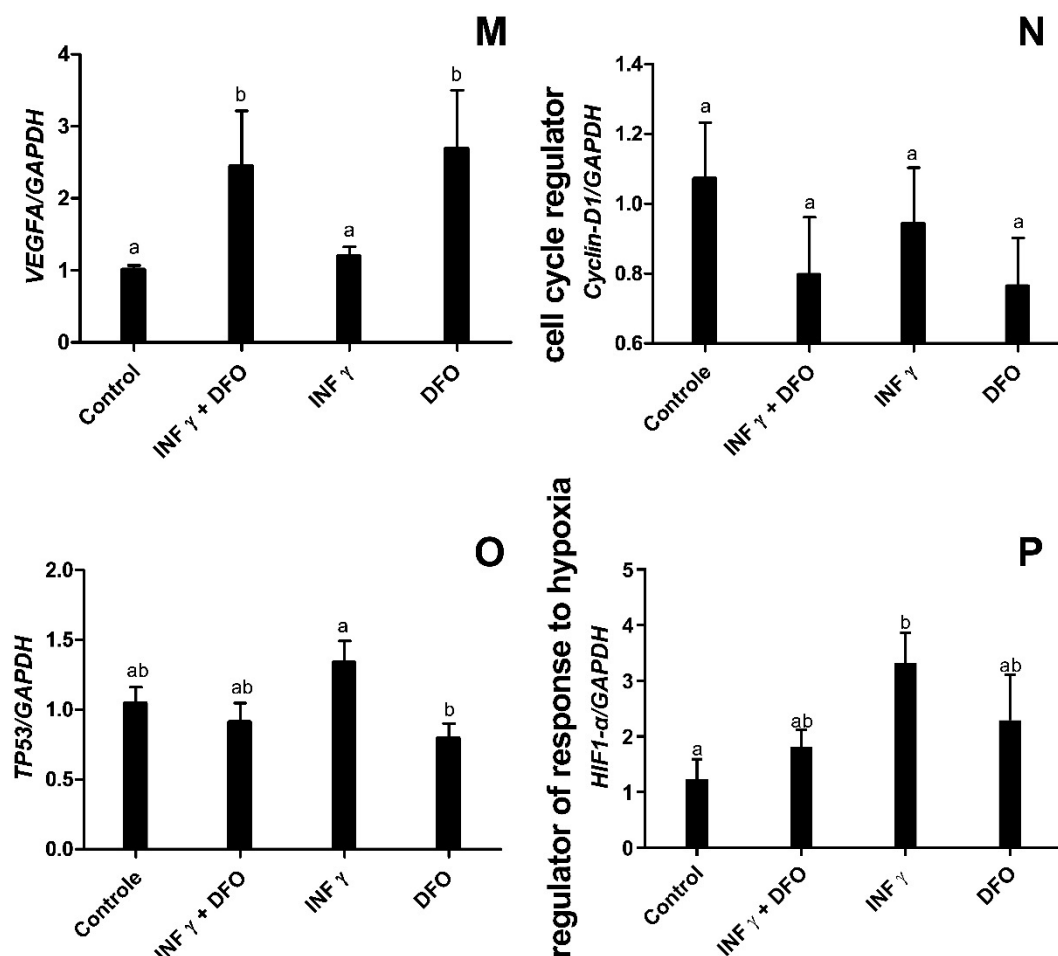


Figura 4. Expressão de genes pró-apoptóticos (A, B e C) relacionados com sobrevivência celular (D, E e F), imunomodulação (G, H, I e J), proliferação e diferenciação (K), angiogênese (L e M), reguladores do ciclo celular (N e O) e regulador celular de resposta adaptativa a hipoxia (P) nas células tronco mesenquimais caninas derivadas de tecido adiposo cultivadas por 48 horas em diferentes condições. Barras representam valores da média relativa normalizados com o gene de referência *GAPDH* e erro padrão da média ($\bar{x}$ e $\pm$). Médias denotadas por uma letra diferente indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ($p < 0.05$).

4. Discussão

Inúmeras estratégias visando garantir a eficiência e sobrevivência de MSCs transplantadas vem sendo investigadas para aumentar seus efeitos terapêuticos

e de seus produtos [25,26,40,47–49]. Estratégias como a indução da hipóxia, tem sido usada no tratamento de algumas doenças [26], entre elas o câncer e o acidente vascular cerebral isquêmico[49,50]. O condicionamento das MSCs com citocinas pro-inflamatórias para melhorar a capacidade imunorreguladora, de diferenciação e angiogênese [51,52] também tem sido implementada. A desferrioxamina e o IFN- γ são substâncias que foram testadas individualmente *in vitro* em MSCs para mimetizar condições de hipóxia e a inflamação, respectivamente [52,53], entretanto o condicionamento de cAT-MSCs com a associação destas substâncias, ainda não foi avaliado.

Na análises de proliferação celular evidenciamos que a concentração celular em todos os grupos diminuiu com o tempo de cultivo até às 96 horas e posteriormente se manteve até o fim do cultivo. Outros trabalhos concordam com esses resultados descrevendo que o uso de IFN- γ teve um efeito negativo na proliferação celular de MSCs [2]. Da mesma forma, o uso de concentrações mais elevadas de DFO (0.1 μ mol) suprimem a proliferação de hBM-MSCs [53].

No presente trabalho sugerimos que o efeito negativo na proliferação celular, observado em todos os grupos, pode estar associado com a ausência de SFB na composição do meio de cultivo utilizado para este teste. A recuperação da proliferação celular observada nos grupos no final da curva, aparentemente está relacionada com a adaptação das células às condições de cultivo mediante seleção de células resistentes a ausência de SFB e sua posterior replicação. Cultivo por um período maior que 6 dias seria necessário para avaliar o comportamento a longo prazo das cAT-MSCs as condições de cultivo (ausência de soro). No entanto cultivos longos não foram realizados em nosso estudo.

Por outro lado, a análise da viabilidade celular, realizada após tratamento por curto prazo (48 horas), com substâncias que mimetizam a hipóxia e o ambiente inflamatório, demonstrou que 90% das células em cultivo se apresentavam viáveis. O índice de células em apoptose e/ou necrose foi baixo em todos os grupos estudados, independente da ausência do SFB e do tratamento utilizado. Este resultado foi confirmado por outro estudo, que também observou mínima proporção de células mortas ou em apoptose após o cultivo em hipóxia ou em condições de inflamação [54].

A análise da expressão gênica das cAT-MSCs demonstrou, de maneira geral um efeito estimulatório do tratamento com IFN- γ em relação às condições com DFO. As cAT-MSC tratadas com DFO apresentaram menor expressão de transcritos envolvidos na apoptose (*Casp9*) em relação ao controle. Já em relação ao grupo estimulado com IFN- γ , o grupo tratado com DFO apresentou menor expressão de genes relacionados a sobrevivência celular (*DKC1*), regulação do ciclo (*p53*) e proliferação celular (*FGF2*). Na verdade, o gene (*VEGF*) relacionado a angiogenese, foi o único que se apresentou mais expresso no grupo tratado com DFO quando comparado ao grupo IFN- γ . O transcrito regulador mestre da resposta celular à hipoxia (*HIF1- α*) esteve aumentado significativamente na condição inflamatória quando comparado ao controle, mas não quando comparado ao IFN- γ .

No nosso estudo, a expressão do transcrito de sinalização pro-apoptotica *Casp9*, esteve diminuído nos grupos tratados com DFO quando comparados com o grupo controle. Resultados similares foram obtidos em outro estudo, onde a expressão de genes pro-apoptoticos estiveram diminuídos em condições de hipóxia em MSCs co-cultivadas com hepatócitos. Isto demonstra um efeito potencializador do condicionamento com hipóxia sobre as capacidades tróficas e anti-apoptoticas de MSCs [55].

A expressão do gene envolvido com sobrevivência celular *DKC1* foi aumentada pelo tratamento com IFN- γ e diminuída pela hipóxia induzida pela DFO, enquanto os genes *DNMT1* e *HDAC1* não se alteraram. Segundo a GeneCards [29] a expressão do gene *DKC1* está relacionada com adesão célula – célula e célula – substrato, e em MSCs foi relacionado com a anti-senecencia mediante a uma melhor migração e proteção celular [56] em cAT-MSCs de doadores jovens [41]. Já o *HDAC1* tem um papel importante na regulação transcripcional, progressão do ciclo celular e eventos de desenvolvimento. Os genes *DNMT1* e *HDAC1* estão envolvidos na manutenção de atividades de metilação do DNA e na acetilação/deacetilação de histonas, respectivamente. Até o momento, nosso estudo foi o primeiro a descrever estes genes relacionados com a sobrevivência celular em cAT-MSCs.

A expressão do mRNA regulador do ciclo celular *cyclin D1*, não sofreu influência das condições de cultura em hipóxia e inflamação. Por outro lado, a via para produção do *p53*, conhecida como “guardião do genoma” se encontrou aumentada no grupo tratado com IFN- γ em relação ao DFO. Choi et al. [17] submetem hAT-MSCs às condições de hipóxia e normóxia e também observaram diminuição dos transcritos de *p53* nas células em condições de hipóxia. O *p53* é induzido em resposta ao estresse genotóxico e oncogênico e funciona como ponto de controle no câncer induzindo respostas proliferativas e antiapoptóticas [57]. Acreditamos que a diminuição no *p53* nos grupos tratados com DFO é causada pela ausência de dano ao DNA indicado pelo baixo índice de apoptose, diminuindo assim a necessidade de eliminação de células com genoma defeituoso.

A via do *p53* também é reguladora do ciclo e sobrevivência celular, concordando com a menor expressão do *Casp9* evidenciada em nosso estudo. Maior expressão de *p53* induzido pela hipóxia (1,5% - 0,02%) já foi descrito em várias linhagens celulares, porém associado a acidose/privação de nutrientes. Por outro lado, nos cultivos tratados com 100 μ M DFO, a expressão de *p53* foi maior independentemente do perfil de expressão da proteína *HIF1- α* , que é o regulador celular mais importante nos processos adaptativos a condições de hipóxia. Tal fato indica relação entre a via *p53* ativada por hipóxia e a via de resposta transcricional da hipóxia central, a *HIF- α* [58], sugerindo que mudanças na *p53* não são consequências obrigatórias do condicionamento com hipóxia.

Estudo conduzido em MSCs de ratos de 3 meses de idade demonstraram que o transcrito *p53* esteve aumentado em células submetidas a condições de hipóxia. No entanto, em células de animais mais velhos, a expressão de *p53* foi menor quando comparado com o grupo normóxia e com as células de animais jovens [26]. Tal achado pode justificar a diminuição da *p53* no nosso estudo, no qual a idade das doadoras esteve ao redor de 3 anos. Acreditamos que concentrações maiores que 50 μ mol são necessárias para estimular estresse oxidativo significativo e a síntese do supressor tumoral *p53*, uma vez que nos estudos onde o transcrito esteve aumentado, foram utilizadas quantidades maiores que 100 μ mol de DFO.

O transcrito *HIF1- α* reconhecido por sua presença nos diferentes mecanismos moleculares de resposta a alterações dos níveis de oxigênio [59] e como regulador de milhares de genes para equilibrar o suprimento e demanda de oxigênio [60]. O HIF induz a expressão de genes que controlam eventos cruciais como angiogênese, sobrevivência celular e metabolismo da glicose [59]. Nas condições do presente experimento, o *HIF1- α* esteve aumentado no grupo IFN- γ em relação ao grupo controle. Já foi demonstrado o envolvimento deste gene em processos inflamatórios em MSCs, funcionando como via de ativação da angiogênese [51,61]. Da mesma forma, Meiser [62] demonstraram que a aquisição do fenótipo pro-inflamatório por macrófagos estimulados por LPS é mediada pela estabilização do *HIF1- α* e pela modificação do consumo de glicose nestas células. Segundo nossos resultados podemos relacionar o *HIF1- α* a processos de sobrevivência celular, proliferação e diferenciação, os quais também se encontravam mais expressos no grupo IFN- γ . Isto difere da literatura, onde a expressão do *HIF1- α* tem sido vinculada com propriedades angiogênicas geradas em condições de hipóxia, [63]. A falta de diferença entre o controle e o grupo DFO poderia ser explicado pelo trabalho de Oses [64] onde a quantidade de *HIF1- α* aumentou diretamente com o aumento da quantidade de DFO, permanecendo iguais a expressão de transcritos dos outros genes avaliados nas diferentes concentrações (150 e 400 μ M). De maneira geral pode-se concluir que o *HIF1- α* participa tanto das diferentes vias que controlam as alterações geradas pelas flutuações nos níveis de oxigênio como em mecanismos que controlam a inflamação [65] de cAT-MSCs.

Os genes responsáveis pela imunomodulação nas cAT-MSCs foram avaliados pela expressão dos transcritos *HGF*, *IL-6*, *PGE2* e *IDO*, e não foram observadas variações significativas entre os grupos. A presença de fatores bioativos na imunomodulação pelas MSCs está bem documentada, no entanto sua relação e função durante este processo não está completamente elucidada. Aparentemente a *IDO* regula a expressão genica associada à inflamação, funcionando como fator de sinalização ou mediante a geração de intermediários bioativos através da via de metabolização do triptofano em kinurenina [66]. Um aumento na expressão de *IDO* foi observado por Rhijn [27], quando AT-MSCs foram tratadas com a associação de IFN- γ e TNF- α em condições de normóxia

e hipóxia quando comparado com o grupo controle. Igualmente outros estudos mostraram aumento na *IDO* utilizando 20 ng/mL de IFN- γ [67], 200 ng/mL IFN- γ [42][de Oliveira Pinheiro 60] e 5 ng/mL de IFN- γ associado ao TNF- α [14]. De Oliveira [42] obteve resultados similares aos nossos para os transcritos *HGF* e *PGE2* sem alterações significativas com a adição de IFN- γ no meio de cultivo.

No entanto, a secreção dos fatores bioativos relacionados a estes genes tem sido repetidamente reportada em MSCs [68]. Aparentemente a atividade imunorreguladora das MSCs é governada por estes e outros transcritos fornecendo proteção contra a citotoxicidade mediada por NK [35]. [69]Tu e colaboradores afirmam que as MSCs inibem a ativação do complemento mediante a produção do fator H e sua regulação é potencializada pela influência do pré-condicionamento com IFN- γ e TNF- α . Este pode ser um dos mecanismos pelo qual as MSCs promovem a atividade imunoduladora. No entanto ainda existe discrepância sobre os genes específicos que controlam as propriedades imunomoduladoras, variando significativamente pelas condições de cultivo, a citocina utilizada para o condicionamento, a adição ou não de SFB e o tipo de cultivo, entre outros [35,70].

Um outro mecanismo foi proposto por Krampera [22] da ISCT (do inglês, International Society for Cell Therapy), onde afirma que o IFN- γ é a principal citocina pro-inflamatória capaz de ativar eficientemente as atividades imunomoduladoras das MSCs, uma vez que entram em contato com a célula imune efetora. A ausência de diferença observada nos genes imunomoduladores em nosso experimento possivelmente está relacionada a eliminação do SFB na composição do meio de cultivo, o que é um fator estressante para as células. [70] Já foi demonstrado que o uso de IFN- γ e TNF- α em MSCs, aumentou a expressão de genes para fatores imunomoduladores em presença de SFB quando comparado a grupos livres de SFB. Segundo os autores, o sucesso da obtenção das propriedades imunomoduladoras por parte das MSCs depende de parâmetros específicos, como a composição do meio e o método de cultivo [70].

O *FGF2*, envolvido com proliferação e diferenciação, teve um comportamento heterogêneo em comparação com outros estudos. O gene *FGF2* foi mais expresso no grupo IFN- γ quando comparado com os demais grupos. Este fator

de crescimento é um potente mitogeno para vários tipos de células e pode promover migração, proliferação e diferenciação de MSCs, além de estimular a produção de outros tipos de fatores de crescimento que funcionam como coadjuvante para a reparação tecidual [44]. Existem vários estudos que reportam um aumento deste gene quando o IFN- γ ou TNF- α foram acrescentados nas culturas de MSCs [2,15]. Por outro lado, a adição de DFO gerou resultados discrepantes na expressão de *FGF2* entre os diferentes estudos. De acordo com Oses [64], a adição de DFO não alterou a expressão deste transcrito, concordando com nossos resultados. Em outro estudo o *FGF2* esteve diminuído com a adição de DFO quando comparado com o controle [4], enquanto um aumento na expressão de *bFGF* foi relatado em condições de hipóxia [17]. De maneira geral, a literatura reporta opiniões diferentes sobre os mecanismos que regulam a proliferação e diferenciação das MSCs, e a grande maioria informa um aumento de distintos fatores de crescimento em resposta a condições estressantes como inflamação, hipóxia e endotoxinas [15,71].

Um dos genes mais estudados, o *VEGF*, implicado amplamente no processo de reparação mediante sua propriedade angiogenica [71] e de diferenciação [72], foi o único aumentado pela aplicação de DFO e inibido pelo IFN- γ . Estudos referem resultados similares, tanto com o uso do DFO ou da hipóxia [17,26,64,71,73,74]. Células endoteliais de veias umbilicais tiveram maior vitalidade e baixa apoptose quando cultivadas com meio condicionado de MSCs tratadas com hipóxia, assim como um incremento significativo de estruturas capilares; todo isto governado por citosinas proangiogenicas, entre elas o *VEGF*, uma vez que anticorpos contra estas citosinas inibiram a formação de capilares [3]. Outros somente observaram regulação deste gene quando usaram dose de DFO de 300 μ mol [4,15]. Além de suas capacidades angiogenicas, foi demonstrado que o *VEGF* esteve aumentado em alguns processos de diferenciação condrogenica de MSCs cultivadas baixo condições de hipóxia [75]. O outro transcrito pro-angiogenico *MMP2* não apresentou diferenças entre os grupos estudados. Alguns trabalhos relacionaram este gene com a habilidade de migração, viabilidade e progressão de células tumorais [45]. No entanto, outros pesquisadores reportam as mesmas propriedades em MSCs sem o aumento do *MMP2* e sim do *VEGF* [76]. Nós achamos que a carência do aumento nas cAT-MSCs de *MMP2* foi causada pelos inibidores de tecido de metaloproteinasas

(TIMPs). Segundo Lozito [77] a exposição das MSCs a fatores estressantes como hipóxia e inflamação promove proteção da matriz mediante a expressão de *TIMPs* e, por conseguinte, aumentada inibição de *MMPs*. Existe muito por esclarecer sobre fatores pro-angiogênicos, se estes funcionam positivamente em condições estressantes, uma vez que tanto em células normais como tumorais estes fatores podem estimular a formação de novos vasos sanguíneos.

No presente experimento o *HGF*, um fator reconhecido em processos de reparação com função antifibrotica não foi alterado pelo pre-condicionamento com DFO e IFN- γ . No entanto, resultados diferentes foram observados em outro trabalho [71], onde o tratamento com o TNF- α aumentou a expressão de *HGF*. Ren [11] demonstrou que o *HGF* funciona como efector do fator *VEGF* em condições de hipóxia, porém não observou diferença na expressão deste transcrito entre os grupos hipóxia e normóxia. Pela afirmação anterior pode-se concluir que sua secreção pode ser tecido-dependente [78]. Um estudo afirma que o TNF- α produz efeitos similares ao IFN- γ nas MSCs, entre eles, regular a expressão de alguns fatores como o *FGF2* e o *HGF* [71] e a indução da capacidade imunossupressora de células T por parte das MSCs quando usados em conjunto [79].

Inúmeros trabalhos da literatura demonstram que as condições de cultivo afetam as propriedades das cAT-MCSs de diversas formas. No entanto, no presente experimento observamos que a adição de IFN- γ e DFO para mimetizar condições de inflamação e hipóxia, respectivamente, não teve influência sobre a viabilidade celular. Da mesma forma, os genes relacionados às propriedades de imunomodulação não foram afetados pelos tratamentos utilizados. Apesar disso, o estímulo das células com IFN- γ elevou a expressão de genes relacionados a apoptose (*Casp9*), sobrevivência celular (*DKC1*), regulação do ciclo celular (*p53*), proliferação celular (*FGF2*) e regulação de resposta a hipóxia (*HIF1- α*). Por outro lado, como esperado, o uso do DFO estimulou a expressão do (*VEGF*), relacionado à angiogênese, quando comparado ao grupo IFN- γ .

5. Conclusão

Foi demonstrado que o estímulo das cAT-MSC com a citocina pro-inflamatória IFN- γ induziu a um estímulo para aumentar a sobrevivência e proliferação celular. Já a mimetização de hipóxia, levou a uma diminuição da expressão de genes relacionados a estes fatores associada a um estímulo para a angiogenese. Apesar disso, os genes relacionados a imunomodulação não foram influenciados pelas condições de cultivo. Os resultados obtidos indicam que os genes envolvidos nos processos de indução da regeneração tecidual foram mais afetados pelas condições de cultivo, em comparação aos relacionados com propriedades imunomoduladoras das cAT-MSC.

6. Agradecimentos

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

7. Referencias

- [1] Buravkova LB, Andreeva ER, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? *Mitochondrion* 2014;19:105–12. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.07.005>.
- [2] Croitoru-Lamoury J, Lamoury FMJ, Caristo M, Suzuki K, Walker D, Takikawa O, et al. Interferon- γ regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO). *PLoS ONE* 2011;6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014698>.
- [3] Liu L, Gao J, Yuan Y, Chang Q, Liao Y, Lu F. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biology International* 2013;37:551–60. <https://doi.org/10.1002/cbin.10097>.
- [4] Mehrabani M, Najafi M, Kamarul T, Mansouri K, Iranpour M, Nematollahi MH, et al. Deferoxamine preconditioning to restore impaired HIF-1 α -mediated angiogenic mechanisms in adipose-derived stem cells from STZ-induced type 1 diabetic rats. *Cell Proliferation* 2015;48:532–49. <https://doi.org/10.1111/cpr.12209>.

- [5] Seifert M, Stolk M, Polenz D, Volk HD. Detrimental effects of rat mesenchymal stromal cell pre-treatment in a model of acute kidney rejection. *Frontiers in Immunology* 2012;3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00202>.
- [6] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001;29:e45–e45.
- [7] Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, et al. Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Postnatal Neovascularization in a Mouse Model of Hindlimb Ischemia. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2006;739:279–90.
- [8] Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Archives of Medical Research* 2021;52:93–101. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.006>.
- [9] Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2008;2:169–83. <https://doi.org/10.1002/term.83>.
- [10] Lee SJ, Ryu MO, Seo MS, Park SB, Ahn JO, Han SM, et al. Mesenchymal stem cells contribute to improvement of renal function in a canine kidney injury model. *In Vivo* 2017;31:1115–24. <https://doi.org/10.21873/invivo.11177>.
- [11] Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* 2008;2:141–50. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>.
- [12] Carrière A, Ebrahimian TG, Dehez S, Augé N, Joffre C, André M, et al. Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009;29:1093–9. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.188318>.
- [13] Aurora AB, Olson EN. Immune Modulation of Stem Cells and Regeneration. *Stem Cell* 2014;15:14–25. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.009>.

- [14] Barrachina L, Remacha AR, Romero A, Albareda J, Prades M, Gosa J, et al. Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem cells with proinflammatory cytokines: implications in immunomodulation-immunogenicity balance, cell viability, and differentiation potential. 2017;26:15–24. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0209>.
- [15] Strojny C, Boyle M, Bartholomew A. Interferon Gamma – treated Dental Pulp Stem Cells Promote Human Mesenchymal Stem Cell Migration In Vitro. Journal of Endodontics 2015;41:1259–64. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.018>.
- [16] Tsumanuma Y, Iwata T, Kinoshita A, Washio K, Yoshida T, Yamada A, et al. Allogeneic Transplantation of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets in Canine Critical-Size Supra-Alveolar Periodontal Defect Model. BioResearch 2016;5:22–37. <https://doi.org/10.1089/biores.2015.0043>.
- [17] Choi JR, Pingguan-murphy B, Abu W, Wan B, Yong KW. In Situ Normoxia Enhances Survival and Proliferation Rate of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells without Increasing the Risk of Tumourigenesis 2015:1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115034>.
- [18] Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science 1999;284:143–7. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
- [19] Ryan JM, Barry F, Murphy JM. Interferon- γ does not break , but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells 2007:353–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x>.
- [20] Caplan AI. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine 2007:341–7. <https://doi.org/10.1002/JCP>.
- [21] Ceron W, Lozada-Requena I, Ventocilla K, Jara S, Pinto M, Cabello M, et al. Mesenchymal stem cells: Definitions, culture and potential applications. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica 2016;33:758–71. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2016.334.2563>.
- [22] Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells 2006;24:386–98. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0008>.

- [23] Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovascular Research* 2005;66:543–51. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.02.006>.
- [24] Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circulation Research* 2004;94:678–85. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000118601.37875.AC>.
- [25] Park SH, Kim KW, Chun YS, Kim JC. Human mesenchymal stem cells differentiate into keratocyte-like cells in keratocyte-conditioned medium. *Experimental Eye Research* 2012;101:16–26. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.05.009>.
- [26] Efimenko A, Starostina E, Kalinina N, Stolzing A. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *Journal of Translational Medicine* 2011;9:1–13. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-10>.
- [27] Rhijn MR-V, Mensah FKF, Korevaar SS, Leijds MJ, van Osch GJVM, IJzermans JNM, et al. Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology* 2013;4:1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00203>.
- [28] Al-Khalidi A, Eliopoulos N, Martineau D, Lejeune L, Lachapelle K, Galipeau J. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene Therapy* 2003;10:621–9. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301934>.
- [29] GeneCards n.d.
- [30] Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2008;135:799–808. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.07.071>.
- [31] Jin P, Zhao Y, Liu H, Chen J, Ren J, Jin J, et al. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Polarize Bone Marrow Stromal Cells Uniformly to a Th1

- Phenotype. Scientific Reports 2016;6:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep26345>.
- [32] Jun EK, Zhang Q, Yoon BS, Moon JH, Lee G, Park G, et al. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/AKT pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 2014;15:605–28. <https://doi.org/10.3390/ijms15010605>.
- [33] Kim Y, Jo SH, Kim WH, Kweon OK. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. *Stem Cell Research and Therapy* 2015;6. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0236-5>.
- [34] Kim Y, Lee SH, Kim WH, Kweon OK. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. *Journal of Veterinary Science* 2016;17:123–6. <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.1.123>.
- [35] Saparov A, Ogay V, Nurgozhin T, Jumabay M, Chen WCW. Preconditioning of human mesenchymal stem cells to enhance their regulation of the immune response. *Stem Cells International* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3924858>.
- [36] Liu ZD, Hider RC. Design of iron chelators with therapeutic application. *Coordination Chemistry Reviews* 2002;232:151–71.
- [37] Monteiro BS, Neto NMA, del Carlo JR. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural* 2010;40:238–45.
- [38] Noone C, Kihm A, English K, O'Dea S, Mahon BP. IFN- γ stimulated human umbilical-tissue-derived cells potently suppress NK activation and resist NK-mediated cytotoxicity in vitro. *Stem Cells and Development* 2013;22:3003–14. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0028>.
- [39] Chaytor JL, Tokarew JM, Wu LK, Leclre M, Tam RY, Capicciotti CJ, et al. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology* 2012;22:123–33. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr115>.
- [40] Nantavisai S, Rodprasert W, Pathanachai K, Wikran P, Kitcharoenthaworn P, Smithiwong S, et al. Simvastatin enhances proliferation and pluripotent gene expression by canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells

- (cBM-MSCs) in vitro. *Heliyon* 2019;5:e02663. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02663>.
- [41] Lee J, Lee KS, Kim CL, Byeon JS, Gu NY, Cho IS, et al. Effect of donor age on the proliferation and multipotency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Science* 2017;18:141–8. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.2.141>.
- [42] de Oliveira AP, Lara VM, Souza AF, Casals JB, Bressan FF, Neto PF, et al. Characterization and immunomodulation of canine amniotic membrane stem cells. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 2020;13:43–55. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S237686>.
- [43] Song WJ, Li Q, Ryu MO, Ahn JO, Bhang DH, Jung YC, et al. TSG-6 released from intraperitoneally injected canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate inflammatory bowel disease by inducing M2 macrophage switch in mice. *Stem Cell Research and Therapy* 2018;9. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0841-1>.
- [44] Zhang J, Liu Z, Li Y, You Q, Yang J, Jin Y, et al. FGF-2-Induced Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Seeded on a Human Acellular Amniotic Membrane Scaffold Accelerated Tendon-to-Bone Healing in a Rabbit Extra-Articular Model. *Stem Cells International* 2020;2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4701476>.
- [45] Teshima T, Matsumoto H, Koyama H. Soluble factors from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote canine hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion. *PLoS ONE* 2018;13:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191539>.
- [46] Chung DJ, Wong A, Hayashi K, Yellowley CE. Effect of hypoxia on generation of neurospheres from adipose tissue-derived canine mesenchymal stromal cells. *Veterinary Journal* 2014;199:123–30. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.020>.
- [47] Lee J, Henderson K, Massidda MW, Armenta-Ochoa M, Gee Im B, Veith A, et al. Mechanobiological conditioning of mesenchymal stem cells for enhanced vascular regeneration. *Nature Biomedical Engineering* 2021;5:89–102.

- [48] Li Q, Wang Y, Deng Z. Pre-conditioned mesenchymal stem cells: A better way for cell-based therapy. *Stem Cell Research and Therapy* 2013;4:3–5. <https://doi.org/10.1186/scrt213>.
- [49] Zhang Y, Ma L, Su Y, Su L, Lan X, Wu D, et al. Hypoxia conditioning enhances neuroprotective effects of aged human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium against cerebral ischemia in vitro. *Brain Research* 2019;1725:146432. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146432>.
- [50] Airley RE, Monaghan JE, Stratford IJ. Hypoxia and disease: Opportunities for novel diagnostic and therapeutic prodrug strategies. *Pharmaceutical Journal* 2000;264:666–73.
- [51] Yang KQ, Liu Y, Huang QH, Mo N, Zhang QY, Meng QG, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by inflammatory cytokines produce angiogenetic factors and promote prostate cancer growth. *BMC Cancer* 2017;17:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3879-z>.
- [52] Yu Y, Yoo SM, Park HH, Baek SY, Kim YJ, Lee S, et al. Preconditioning with interleukin-1 beta and interferon-gamma enhances the efficacy of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells-based therapy via enhancing prostaglandin E2 secretion and indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dextran sulf. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2019;13:1792–804. <https://doi.org/10.1002/term.2930>.
- [53] Fujisawa K, Takami T, Okada S, Hara K, Matsumoto T, Yamamoto N, et al. Analysis of Metabolomic Changes in Mesenchymal Stem Cells on Treatment with Desferrioxamine as a Hypoxia Mimetic Compared with Hypoxic Conditions. *Stem Cells* 2018;36:1226–36. <https://doi.org/10.1002/stem.2826>.
- [54] Sierra-Parraga JM, Merino A, Eijken M, Leuvenink H, Ploeg R, Møller BK, et al. Reparative effect of mesenchymal stromal cells on endothelial cells after hypoxic and inflammatory injury. *Stem Cell Research and Therapy* 2020;11:1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01869-3>.
- [55] Qin HH, Filippi C, Sun S, Lehec S, Dhawan A, Hughes RD. Hypoxic preconditioning potentiates the trophic effects of mesenchymal stem cells

- on co-cultured human primary hepatocytes. *Stem Cell Research and Therapy* 2015;6:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0218-7>.
- [56] Oh YS, Jeong SG, Cho GW. Anti-senescence effects of DNA methyltransferase inhibitor RG108 in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2015;62:583–90. <https://doi.org/10.1002/bab.1393>.
- [57] Boregowda S v., Krishnappa V, Strivelli J, Haga CL, Booker CN, Phinney DG. Basal p53 expression is indispensable for mesenchymal stem cell integrity. *Cell Death and Differentiation* 2018;25:677–90. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0004-4>.
- [58] Pan Y, Oprysko PR, Asham AM, Koch CJ, Simon MC. P53 Cannot Be Induced By Hypoxia Alone But Responds To the Hypoxic Microenvironment. *Oncogene* 2004;23:4975–83. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207657>.
- [59] Sadek HA, Semenza GL. Editorial overview: Hypoxia. *Current Opinion in Physiology* 2019;7:iii–v. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.02.002>.
- [60] Semenza GL. The genomics and genetics of oxygen homeostasis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2020;21:183–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-111119-073356>.
- [61] Griffioen AW, Bischoff J. Oxygen sensing decoded: a Nobel concept in biology. *Angiogenesis* 2019;22:471–2. <https://doi.org/10.1007/s10456-019-09692-y>.
- [62] Meiser J, Krämer L, Sapcariu SC, Battello N, Ghelfi J, D'Herouel AF, et al. Pro-inflammatory macrophages sustain pyruvate oxidation through pyruvate dehydrogenase for the synthesis of itaconate and to enable cytokine expression. *Journal of Biological Chemistry* 2016;291:3932–46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.676817>.
- [63] Wagegg M, Gaber T, Lohanatha FL, Hahne M, Strehl C, Fangradt M, et al. Hypoxia Promotes Osteogenesis but Suppresses Adipogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in a Hypoxia-Inducible Factor-1 Dependent Manner. *PLoS ONE* 2012;7:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046483>.
- [64] Oses C, Olivares B, Ezquer M, Acosta C, Bosch P, Donoso M, et al. Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with

- deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS ONE* 2017;12:1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178011>.
- [65] Dehne N, Brüne B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Experimental Cell Research* 2009;315:1791–7. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.03.019>.
- [66] Wang G, Cao K, Liu K, Xue Y, Roberts AI, Li F, et al. Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation* 2018;25:1209–23. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0006-2>.
- [67] Du J, Liu A, Zhu R, Zhou C, Su H, Xie G, et al. The different effects of IFN- β and IFN- γ on the tumor-suppressive activity of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells International* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4592701>.
- [68] Silini AR, Magatti M, Cargnoni A, Parolini O. Is immune modulation the mechanism underlying the beneficial effects of amniotic cells and their derivatives in regenerative medicine? *Cell Transplantation* 2017;26:531–9. <https://doi.org/10.3727/096368916X693699>.
- [69] Tu Z, Li Q, Bu H, Lin F. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor h. *Stem Cells and Development* 2010;19:1803–9. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0418>.
- [70] Zimmermann JA, Mcdevitt TC. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy* 2014;16:331–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.09.004>.
- [71] Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF κ B- but not JNK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2008;294:675–82. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00437.2007>.
- [72] Ge Q, Zhang H, Hou J, Wan L, Cheng W, Wang X, et al. VEGF secreted by Mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms. *Molecular*

Medicine Reports 2018;17:1667–75.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8059>.

- [73] Heirani-Tabasi A, Mirahmadi M, Mishan MA, Naderi-Meshkin H, Toosi S, Matin MM, et al. Comparison the effects of hypoxia-mimicking agents on migration-related signaling pathways in mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Banking* 2020;21:643–53. <https://doi.org/10.1007/s10561-020-09851-2>.
- [74] Ratajczak J, Hilkens P, Gervois P, Wolfs E, Jacobs R, Lambrichts I, et al. Angiogenic capacity of periodontal ligament stem cells pretreated with deferoxamine and/or fibroblast growth factor-2. *PLoS ONE* 2016;11:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167807>.
- [75] Hwang OK, Noh YW, Hong JT, Lee JW. Hypoxia Pretreatment Promotes Chondrocyte Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells via Vascular Endothelial Growth Factor. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2020;17:335–50. <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00265-5>.
- [76] Annabi B, Lee Y, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, et al. Hypoxia Promotes Murine Bone-Marrow-Derived Stromal Cell Migration and Tube Formation. *Stem Cells* 2002;21:337–47.
- [77] Lozito TP, Tuan RS. Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs. *Journal of Cellular Physiology* 2011;226:385–96. <https://doi.org/10.1002/jcp.22344>.
- [78] Ishiuchi N, Nakashima A, Doi S, Yoshida K, Maeda S, Kanai R, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats. *Stem Cell Research and Therapy* 2020;11:1–15. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01642-6>.
- [79] de Witte SFH, Franquesa M, Baan CC, Hoogduijn MJ. Toward development of imesenchymal stem cells for immunomodulatory therapy. *Frontiers in Immunology* 2016;6:648. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00648>.