

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

**SECRETOMA DE MEIOS CONDICIONADOS POR CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO EM
CANINOS E FELINOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES
AMBIENTES DE CULTIVO**

MARÍA LAURA LARA ARIAS

Botucatu, São Paulo
Maio, 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

**SECRETOMA DE MEIOS CONDICIONADOS POR CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO EM
CANINOS E FELINOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES
AMBIENTES DE CULTIVO**

MARÍA LAURA LARA ARIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para o Exame Geral de Defesa do curso de Mestrado em Biotecnologia Animal, área de Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Botucatu, São Paulo
Maio, 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Arias, María Laura.

Secretoma de meios condicionados por células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em caninos e felinos produzidos em diferentes ambientes de cultivo / María Laura Arias. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Proteômica. 2. Matriz extracelular. 3. Células-tronco hematopoéticas.

Palavras-chave: MSC; Matriz extracelular; Meio condicionado; Proteômica; Secretoma.

Título: SECRETOMA DE MEIOS CONDICIONADOS POR CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO EM CANINOS E FELINOS
PRODUZIDOS EM DIFERENTES AMBIENTES DE CULTIVO

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP –
Botucatu

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP -
Botucatu

Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Membro

Departamento de Doenças Tropicais – CEVAP – UNESP, Botucatu.

Data de defesa: 24 de maio de 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Profa. Dra. Fernanda Landim, por me receber a olhos fechados, por estar disposta desde o início a trabalhar em projetos que não só eram relacionados aos feitos em seu laboratório, mas que também envolviam meus desejos e sonhos em pesquisa, fazendo de tudo fosse muito mais agradável. Agradeço-lhe por me guiar, me apoiar, por suportar meus desesperos e por confiar em minhas capacidades. Agradeço à Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza, por ser minha segunda orientadora, por sua disposição e por disponibilizar o laboratório REPAS para realizar distintas etapas do projeto de pesquisa, por sua paciência e por ter a dedicação de me ensinar um pouco de seu conhecimento. Sem sua ajuda, este projeto não poderia ter sido realizado. Agradeço à Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves, por ter sido a primeira que abriu as portas para eu estudar na UNESP, agradeço por me dar a oportunidade de crescer profissionalmente nesta instituição, e por estar sempre do meu lado nessa jornada. Quero agradecer à Dra. Bruna de Vita por me ensinar o que é ser apaixonada pelo seu trabalho e que, apesar das frustrações envolvidas na pesquisa, no final a satisfação vale a pena. Agradeço-lhe por me acolher, por ser minha mentora, por viajar em ideias de projetos de pesquisa comigo, por compartilhar tantos momentos e pela amizade criada. A estas 4 mulheres, agradeço-lhes por ser meu exemplo como mulheres e como profissionais, corajosas e lutadoras.

Agradeço aos membros da banca, por estar a disposição, me ajudar na correção do trabalho e acrescentar melhorias ao mesmo.

Agradeço a toda a equipe envolvida, Rubia Schmith, Viviane Codognoto, Camila Freitas Dell'Aqua, Laiza Camargo, Isadora Arruda, Natalia Nakazato, Lais Cintra, y Julia Coneglian, e a todo o Laboratório LANÇA pela ajuda na realização deste projeto, essa conquista também é de todos vocês, pois sem sua ajuda isto não teria sido possível.

Agradeço à Profa. Dra. Eunice Oba pela disposição de seu laboratório, e à Dra. Elenize Pereira e ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), pela disposição do equipamento e pela ajuda no processamento das amostras.

Agradeço ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) pelo apoio e disposição dos equipamentos, instalações, serviços e recursos de informação para a elaboração e análise das amostras por espectrometria de massas.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, por fazer possível meu sonho de estudar no Brasil, por me ensinar sobre o mundo da pesquisa pelo qual hoje sou apaixonada, e por me dar todas as ferramentas para fazer com que esse mestrado fosse bem sucedido.

Aos meus amigos Marcos, Lais, Lais 2, Luciane, Luana, Ana Lu, Carol, Luiz, Suzane, Vivi, Pablo, Eduardo, Laiza, Alice, Jaque, por ter sido meu apoio ao longo desta etapa, por todos os momentos vividos, por ser minha família longe de casa.

Agradeço ao Brasil, por me receber com as portas abertas desde o momento em que cheguei a este país, por me deixar conhecer sua cultura, sua música, suas riquezas naturais, seu povo maravilhoso, e por me fazer sentir parte dele.

Às minhas amigas incondicionais Sofia, Michelle e Giovanna, que apesar do tempo e da distância, estão sempre do meu lado para me apoiar, aconselhar e ouvir, e para fazer com que cada momento perto de vocês seja único.

Quero agradecer aos meus pais, Rodrigo Lara e Silvia Arias, por me deixarem voar, por desde criança me fazer acreditar que, com esforço, disciplina e dedicação podemos conseguir o que nos propomos, em todos os aspectos da vida. Agradeço por ser meu exemplo, como pais, como pessoas, como casal, como profissionais, vocês são meu orgulho. Obrigada por todo seu apoio financeiro para meu crescimento profissional, por confiar em mim e por me deixar ir atrás dos meus sonhos, mesmo que isso signifique estar longe. Essa conquista é de e para vocês, é mais uma conquista da nossa pequena família. Agradeço aos meus primos, tios e avós por encher meu coração de amor, orgulho, alegria e por acreditarem em mim.

Agradeço a Deus, Nossa Senhora dos Anjos e Nossa Senhora Aparecida, pela minha vida, por me orientar neste trajeto, por colocar nele as pessoas certas, por me deixar ter esta experiência e aprendizado, e por nunca me desamparar. Este trabalho é feito para a glória de Deus, ele que faz de mim simplesmente um instrumento.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra me apoiaram e estiveram envolvidos no desenvolvimento deste trabalho, minha mais sincera gratidão.

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician, he is also a child place before natural phenomenon, which impress him like a fairy tale.”

— Marie Curie

SUMARIO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
CÉLULAS-TRONCO	4
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO.....	6
MECANISMOS DE AÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	7
SECRETOMA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS COMO NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA	8
COMPONENTES DO SECRETOMA	9
MODIFICAÇÕES DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	12
MECANISMOS DE AÇÃO DO SECRETOMAS.....	13
PRODUÇÃO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	16
VANTAGENS DO USO DO MEIO CONDICIONADO SOBRE AS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	18
REFERÊNCIAS	20
HIPOTESE.....	32
OBJETIVOS.....	32
CAPÍTULO 2	33
ARTIGO 1	34
ABSTRACT.....	34
INTRODUCTION	35
MATERIALS AND METHODS.....	37
RESULTS.....	42
DISCUSSION	46
CONCLUSION	51
REFERENCES	52
SUPPLEMENTAL DATA.....	57
CONSIDERACOES FINAIS.....	65

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ACTG1	Actin gamma 1
AD-MSCs	Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo
AHSG	Alpha 2-HS glycoprotein
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
BGN	Biblycan
DCN	Decorin
DNA	cido Desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
emPAI	Exponentially modified protein abundance index
FBS	Soro fetal bovino
GO	Gene ontology
HBSS	Solução salina balanceada Hanks
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
ILs	Interleucinas
miRNA	Micro RNA
MS	Mass spectrometry
MSCs	Células-tronco mesenquimais
NGF	fator de crescimento nervoso

O₂	Oxigênio
PCA	Principal Component Analysis
PLS-DA	Partial Least Squares - Discriminant Analysis
RNA	Ácido ribonucleico
SPARC	Secreted protein acidic and cysteine rich
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VIP	Variable Importance in Projection

RESUMO

SECRETOMA DE MEIOS CONDICIONADOS POR CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO EM CANINOS E FELINOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES AMBIENTES DE CULTIVO. Botucatu, 2018. Dissertação de mestrado em Biotecnologia Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP.

As células-tronco mesenquimais (MSCs) exercem seus efeitos terapêuticos predominantemente pela sua atividade parácrina. Como o secretoma desempenha um papel direto nas atividades biológicas das MSCs, a análise de seus componentes proteicos é um passo fundamental para identificar os principais responsáveis no controle e regulação dos muitos processos biológicos desenvolvidos por essas células. O secretoma de MSCs pode ser modificado e melhorado de forma *in vitro* para estimular efeitos celulares específicos desejados para aplicações terapêuticas, e uma maneira de modificá-lo é por meio de modificações nas condições de cultura. No presente estudo, objetivou-se descrever o secretoma de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (AD-MSCs) de gatos e cães submetidos a diferentes condições de cultivo, identificamos e comparamos os efeitos exercidos por diferentes modificações de cultivo. Para a produção de meio condicionado, as células foram descongeladas e cultivadas com meio DMEM/F12 com 20% de FBS, suplementado com antibióticos e antimicóticos em uma incubadora com umidade controlada a 37,5 °C, e 5% de CO₂. Após atingir pelo menos 70% de confluência, as garrafas foram lavadas três vezes com solução salina balanceada Hanks (HBSS) e foram cultivadas em quatro condicionamentos distintos. O meio condicionado foi colhido após 4 dias, centrifugado por 10 min/300 g, filtrado em um filtro 0,22 µm e congelado a -80 °C. Foram realizadas a extração e concentração proteica de todas as amostras e depleção de albumina das amostras cultivadas em presença de FBS. A digestão em solução foi realizada para preparar as amostras para a análise por espectrometria de massa. Como resultado, os perfis proteômicos produzidos nas condições de cultura mais estressantes, tiveram uma maior expressão proteica, além de conter a maioria das proteínas determinadas como relevantes. Esse grupo, condicionado pela ausência de FBS e hipóxia 5% O₂, apresentou um perfil proteômico voltado à matriz extracelular (ECM) e à modulação da resposta imune,

demonstrando a capacidade das MSCs em modular o ambiente de acordo com as circunstâncias apresentadas e tornando-o mais adequado para a proliferação e função celular. Levando em conta que o uso do secretoma como terapia livre de células abre uma nova possibilidade terapêutica para diferentes doenças, é essencial continuar investigando as diferentes modificações de cultivo que podem ser feitas na produção do meio condicionado para direcionar sua utilização a diferentes alvos terapêuticos e diagnósticos.

Palavras chave: MSC, secretoma, meio condicionado, proteômica, matriz extracelular.

ABSTRACT

SECRETOME OF CONDITIONED MEDIUM BY MESENQUIMIAL STEM CELLS DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE IN CANINE AND FELINE SPECIES PRODUCED IN DIFFERENT CULTURE ENVIRONMENTS. Botucatu, 2018. Dissertação de mestrado em Biotecnologia Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP.

It is now known that mesenchymal stem cells (MSCs) exert their therapeutic effects predominantly through their paracrine activity. Since the secretome plays a direct role in the biological activities of MSCs, the analysis of their protein components is a fundamental step in identifying the main responsible for the control and regulation of the many biological processes developed by these cells. The MSCs secretome can be modified and improved *in vitro* to stimulate specific cellular effects desired for therapeutic applications, and one way of modifying it is through modifications in the culture conditions. In the present study, in addition to describing for the first time the secretome of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (AD-MSCs) in feline species, we identified and compared the effects exerted by different culture modifications, such as the use of serum-free medium and hypoxia in the protein production by AD-MSCs in canines and felines. For the conditioned media production, the cells were thawed and cultured with DMEM/F12 medium with 20% fetal bovine serum (FBS), supplemented with antibiotics and antimycotics in controlled incubator at 37.5 °C with 5% CO₂. After reaching at least 70% confluency, the flasks were washed three times with Hanks balanced salt solution (HBSS) and were grown in four different conditions. Conditioned media were collected after 4 days, centrifuged for 10 min/300 g, filtered on a 0.22 µm filter and frozen at -80 °C. Protein extraction and concentration of all samples and albumin depletion of samples cultured with FBS were performed. Digestion in solution also was performed to prepare the samples for mass spectrometry analysis. The proteomic profiles produced under the most stressful culture conditions had a greater protein range, besides containing within it the majority of proteins determined as relevant. This group, conditioned by serum-free medium and 5% hypoxia, presented an extracellular matrix (ECM) and immunomodulation-oriented profile, demonstrating MSCs ability in modulate

their environment according to the circumstances and making it more suitable for cell maintenance and function. The secretome as free cell therapy opens new therapeutic possibilities, being essential to continue research of different modifications that can be made in the conditioned medium production to direct its use for different therapeutic and diagnostic targets.

Key words: MSCs, secretome, conditioned medium, proteomic, extracellular matrix.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Devido às suas propriedades únicas, as células-tronco representam ferramentas promissoras para aplicações clínicas e medicina regenerativa (KLIMANSKAYA et al., 2008). As células estromais mesenquimais (MSCs) são células estromais indiferenciadas caracterizadas pela sua extensa capacidade proliferativa e potencial de se diferenciar em várias linhagens mesenquimais. Os precursores multipotentes do estroma da medula óssea foram as primeiras células-tronco adultas a serem identificadas (TILL e MCCULLOCH, 1964; FRIEDENSTEIN et al., 1970). Entretanto, o tecido adiposo possui claras vantagens sobre outras fontes de MSCs, devido à facilidade com que o tecido pode ser obtido, bem como a facilidade de isolar as células-tronco a partir dele (CASTEILLA et al., 2005; OEDAYRAJSINGH-VARMA et al., 2006).

Inicialmente os efeitos terapêuticos das MSCs transplantadas foram relacionados com a migração das células para os locais da lesão, integração no tecido danificado e diferenciação em células especializadas. No entanto, foi observado que apenas uma pequena proporção de células, realmente se insere e sobrevive no tecido danificado do hospedeiro. Isto tornou evidente que as MSCs transplantadas não necessariamente têm que estar próximas ao tecido danificado para exercer seus efeitos regenerativos, já que esses efeitos podem ser exercidos por sinais tróficos secretados (LAI et al., 2012). Como o secretoma desempenha um papel direto nas atividades biológicas das MSCs, a análise de seus componentes proteicos é fundamental para identificar os principais responsáveis pelo controle e regulação dos diversos processos biológicos desenvolvidos por essas células. O secretoma de MSCs suporta de forma autócrina e parácrina processos regenerativos no tecido danificado, induzindo a angiogênese, protegendo as células da morte celular e modulando o sistema imunológico (SKALNIKOVA, 2013).

Por sua curta vida dentro do corpo, a aplicação de MSCs não permite a produção de proteínas dentro do organismo como na aplicação direta do meio condicionado produzido *in vitro* em condições controladas. Utilizando o meio condicionado de forma clínica, outras vantagens sobre o uso das MSCs são conhecidas, como a ausência de incompatibilidade imunológica, tumorigenicidade, formação de êmbolos e transmissão de infecções, além de

permitir a sua utilização com uma dosagem precisa, de uma maneira análoga a agentes farmacêuticos convencionais (EIRO et al., 2014; BERMUDEZ et al., 2015; BERMUDEZ et al., 2016). Além disso, o produto biológico produzido *in vitro* pelas MSCs pode ser modificado e melhorado para estimular secreções celulares específicas desejadas para aplicações terapêuticas. Uma maneira de modificá-lo é por modificações nas condições de cultivo. Uma variedade de estímulos e condições de cultivo celulares tem sido estudadas, incluindo cultura de células sob condições hipóxicas ou privação de soro, estímulos pró-inflamatórios, crescimento tridimensional, e engenharia de micropartículas (VIZOSO et al., 2017; SKALNIKOVA, 2013).

O perfil parácrino do meio condicionado por MSCs em pacientes veterinários e seu uso clínico tem sido pouco estudado (HARMAN et al., 2017) e, no nosso conhecimento, apenas um estudo tem caracterizado o secretoma de AD-MSCs caninas sob condições padrões de cultivo (VILLATORO et al., 2019). Uns dos objetivos deste estudo foi determinar o secretoma das AD-MSCs caninas e felinas quando mantidas sob diferentes condições de cultivo como a ausência de soro fetal e 5% hipoxia, e discutir os achados considerando suas aplicações terapêuticas. As variações secretômicas e o papel das proteínas segregadas em cada um dos diferentes condicionamentos de cultivo, ajudarão a definir novas estratégias diagnósticas e terapêuticas valiosas para tratar uma ampla gama de doenças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Células-tronco

As MSCs foram oficialmente nomeadas há mais de 25 anos (CAPLAN, 1991) para representar uma classe de células da medula óssea e periósteo humanas e mamíferas (NAKAHARA et al., 1990) que poderiam ser isoladas e expandidas em cultura mantendo sua capacidade *in vitro* de ser induzidas a formar uma variedade de fenótipos e tecidos mesodérmicos (CAPLAN, 2017).

As células-tronco podem ser definidas como células com capacidade de proliferação e autorrenovação, além da capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas (PEREIRA, 2008). Quando as células-tronco se dividem, possuem a capacidade de gerar mais células-tronco, uma propriedade conhecida como autorrenovação, e a capacidade de produzir progênieis mais diferenciadas (MORRISON e KIMBLE, 2006).

De acordo com a origem tecidual, as células-tronco podem ser classificadas em células-tronco embrionárias e adultas. O primeiro tipo é derivado da massa celular interna do blastocisto, sendo totipotentes ou capazes de se transformar em qualquer tipo celular, e por sua vez em um organismo inteiro (MAIA et al., 2017). O segundo tipo inclui as células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, podendo ser isoladas de tecidos de origem mesodermal, tais como músculo (ZHENG et al., 2007), medula óssea, tecido adiposo (DE UGARTE et al., 2003), sangue periférico (VILLARON et al., 2004), matriz do cordão umbilical (HOYNOWSKI et al., 2007), líquido amniótico (LOVATI et al., 2011), pele (ORCIANI e PRIMIO, 2013) pulmão (HUA et al., 2009), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001) polpa dentária (GRONTHOS et al., 2000), mucosa nasal olfatória (DELORME et al., 2010), tecido do couro cabeludo (SHIH et al., 2005), periósteo (DE BARI et al., 2001), entre outras fontes.

As células-tronco desempenham um papel fundamental na autorrenovação de tecidos adultos ao longo da vida. Alguns tecidos são caracterizados pela contínua perda de células, incluindo o sistema hematopoiético, intestino e pele, sendo as células-tronco adultas

responsáveis pela reposição celular e consequente homeostasia tecidual (HUMPHREYS e BONVENTRE, 2008). Além da reposição de células que sofrem apoptose, as células-tronco adultas podem proporcionar a recuperação de lesões não fisiológicas decorrentes de acidentes ou agentes patogênicos (NARDI, 2007).

O fato das MSCs serem chamadas de células-tronco estava sendo usado para inferir que após realizado o transplante celular, os pacientes receberiam benefícios médicos diretos, porque imaginavam que essas células-tronco iriam se diferenciar em células produtoras de tecido regenerativo (CAPLAN, 2017). No entanto, atualmente é conhecido que apenas uma pequena proporção de MSCs transplantadas realmente se integra e sobrevive nos tecidos do hospedeiro. Assim, o mecanismo predominante pelo qual as MSCs participam do reparo tecidual parece estar relacionado com sua atividade parácrina (BAGLIO et al., 2012).

CAPLAN (2017) sugeriu a modificação da denominação de MSCs para células de sinalização medicinal (Medicinal Signaling Cells), por refletir mais precisamente a ação terapêutica das células pela migração (*homing*) aos locais de lesão e secreção de fatores bioativos (DA SILVA MEIRELLES et al., 2009) com efeitos imunomoduladores e tróficos (CAPLAN e DENNIS, 2006) e ação terapêutica e medicinal (CAPLAN e CORREA, 2011). Na verdade, são as células-tronco residentes específicas do tecido lesionado que constroem o novo tecido, estimuladas pelos fatores bioativos secretados pelas MSCs fornecidas por via exógena (LE BLANC e MOUGIAKAKOS, 2012; CAPLAN, 2015). Esta intrigante hipótese abre novas perspectivas terapêuticas destinadas ao desenvolvimento de estratégias livres de células com base no uso do secretoma de MSCs como uma alternativa segura e potencialmente mais vantajosa que abordagens com terapia celular.

O Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Tecidual da Sociedade Internacional para Terapia Celular estabeleceu em 2006 os critérios mínimos de identificação para MSCs os quais são: células aderentes ao plástico quando mantidas em condições de cultura padrão; expressão de moléculas de superfície CD105, CD73 e CD90 e ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR, e capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006). Embora as MSCs estejam presentes em múltiplos tecidos, sua quantidade total no corpo é escassa. Protocolos de terapia celular geralmente requerem centenas de milhões de MSCs por

tratamento; portanto, a expansão celular *in vitro*, várias semanas antes do implante, é necessária. A idade do paciente e as características clínicas influenciam as condições ideais de cultura para a produção em escala clínica das MSCs (SOTIROPOULOU et al., 2006; DUGGAL e BRINCHMANN, 2011).

Vários estudos revelaram que o tempo de implantação de MSCs é geralmente curto para ter um impacto efetivo (MULLER-EHMSSEN et al., 2002; TOMA et al., 2009; CHIMENTI et al., 2010). De fato, foi relatado que menos de 1% das MSCs sobrevivem por mais de uma semana após a administração sistêmica (PAREKKADAN e MILWID, 2010; EGGENHOFER et al., 2012), sugerindo que os principais efeitos das MSCs são provavelmente mediados por mecanismos parácrinos (MAGUIRE, 2013).

Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

A população total de células isoladas do tecido adiposo é heterogênea e contém uma combinação fisiológica de fibroblastos, células e progenitores endoteliais, pericitos, macrófagos, pré-adipócitos, linfócitos B e T, e células musculares lisas. O total da população de células-tronco é estimado em 1 a 3% do total de células nucleadas (DAHLGREN, 2009b).

As MSCs derivadas de tecido adiposo se encontram nos diferentes depósitos de tecido adiposo branco e marrom presentes no corpo (RADA et al., 2009). Quando comparadas com outras populações e fontes de células-tronco, as MSCs derivadas de tecido adiposo podem ser facilmente isoladas além de proporcionar rendimentos mais elevados após o processamento do tecido (SALGADO et al., 2010). O procedimento cirúrgico simples, o acesso fácil ao tecido adiposo e a simplicidade do isolamento celular tornam essa fonte atraente para pesquisas e aplicações biomédicas (SCHÄFFLER e BÜCHLER, 2007) quando comparadas, por exemplo, com às células-tronco derivadas de medula óssea.

Semelhante a outras populações de células-tronco, inicialmente acreditou-se que o principal potencial das MSCs derivadas de tecido adiposo, para abordagens na medicina regenerativa, estava intimamente relacionado à sua capacidade de diferenciação. Embora isso seja verdade, há uma crescente descrição dos efeitos tróficos das MSCs derivadas de tecido adiposo na proteção, sobrevivência e diferenciação de uma variedade de células e tecidos

endógenos. Além disso, elas também demonstraram possuir um caráter imunomodulador. Este efeito está intimamente relacionado com seu secretoma e seus fatores solúveis. Moléculas como fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fatores estimulantes de colônias de granulócitos e macrófagos, interleucinas (ILs) 6, 7, 8 e 11, fator de necrose tumoral α (TNF- α), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento nervoso (NGF) e adipocinas foram identificados dentro do secretoma das MSCs derivadas de tecido adiposo (SALGADO et al., 2010).

Mecanismos de ação das células-tronco mesenquimais

O potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais pode ser atribuído a três mecanismos-chave de ação. O primeiro mecanismo é chamado de *homing*, uma importante característica distintiva das MSCs em comparação com a maioria dos outros tipos celulares, pela qual as células-tronco administradas sistemicamente migram para o foco da lesão aguda devido a sinalizações químicas (VIZOSO et al., 2017), sendo esta característica a base para que as células-tronco possam atingir os sítios alterados após a administração intravenosa, intra-lesional ou peri-lesional (BAGLIO et al., 2012). As citocinas liberadas nos sítios de inflamação ou lesão promovem a sinalização química para orientar a migração das células implantadas (DAHLGREN, 2009a).

Nas alterações, pode-se observar um aumento da população de MSCs circulantes, sugerindo a existência de um reservatório de células mesenquimais que são mobilizadas em resposta à lesão, para atingir o local danificado e auxiliar na reparação tecidual (ALM et al., 2010; DENG et al., 2011). Hipotetiza-se que a migração para os tecidos alvo ocorre por um processo semelhante ao da migração de leucócitos. A quimiotaxia é mediada por receptores da superfície celular, como os receptores de quimiocinas. Embora o mecanismo exato da interação do endotélio com a célula-tronco no local alvo não esteja bem estabelecido, integrinas e selectinas medeiam essas interações (RUSTER et al., 2006; DOCHEVA et al., 2007). O motivo pelo qual as MSCs se alojam especificamente em locais que tem características de tecidos lesados e cancerígenos, ainda é incerto, mas a inflamação é provavelmente o denominador responsável pela migração. A alta concentração de quimiocinas inflamatórias liberadas após o dano tecidual pode realmente controlar a migração de MSCs, que expressam receptores para vários fatores de crescimento, incluindo

o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1), e receptores de quimiocinas, como CCR2, CCR3, CCR4 e CCL5 (PONTE et al., 2007).

Os mecanismos precisos que direcionam o *homing* das MSCs representam um assunto atraente para investigação, devido às suas implicações nas aplicações terapêuticas dessas células, tanto como efetores da reparação quanto vetores de sinais específicos (BAGLIO et al., 2012). O segundo mecanismo de ação das MSCs é a diferenciação em múltiplos tipos celulares, enxertando-se localmente e induzindo a restauração da função tecidual, seja aumentado ou substituindo os tecidos danificados (DEANS e MOSELEY, 2000; JIANG et al., 2006). O terceiro mecanismo principal é a secreção de fatores bioativos, que podem afetar potencialmente os processos fisiológicos locais e sistêmicos (GNECCHI et al., 2008).

Secretoma de células-tronco mesenquimais como nova estratégia terapêutica

Nos últimos anos, tem surgido o estudo de um tipo diferente de regulação biológica envolvendo a comunicação entre as células por substâncias secretadas (VIZOSO et al., 2017). O secretoma é referido como o conjunto rico e complexo de moléculas secretadas pelas células constitutivamente, ou por sinais de ativação de maneira regulada (MAKRIDAKIS et al., 2013; BRION et al., 1992). Na secreção regulada, as proteínas são armazenadas em vesículas secretoras e sua liberação é estimulada por um sinal específico. O tratamento celular *in vitro* induzido por este sinal, aumenta a quantidade de proteínas e citocinas particulares segregadas no meio de cultura (LEE et al., 2010; WANG et al., 2006; KILROY et al., 2007).

As proteínas secretadas são moléculas principais da comunicação intercelular e participam da maioria dos processos fisiológicos, como sinalização celular, crescimento, divisão, diferenciação, invasão, metástase, adesão e ligação celular, angiogênese e apoptose (MUSTAFA et al., 2011; MAKRIDAKIS et al., 2013). Até o momento, uma variedade de citocinas, citocinas quimiotáticas (quimiocinas), fatores angiogênicos, fatores de crescimento, proteínas de ligação a fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular e enzimas de remodelação da matriz com ações pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e pleiotrópicas, foram identificadas em secretomas de MSCs (SKALNIKOVA et al., 2011).

Tem havido um crescente esforço nos últimos anos para analisar o secretoma de células-tronco por abordagens proteômicas, marcação e caracterização das moléculas secretadas pelas células-tronco a fim de obter informações sobre os mecanismos imunomodulatórios / anti-inflamatórios e processos neoangiogênicos, além da sobrevivência, diferenciação e recrutamento celular (FARINA et al., 2011., ROCHE et al., 2013).

O secretoma de células e tecidos individuais é específico, e mudam em resposta às flutuações nos estados fisiológicos ou nas alterações. Os fatores solúveis e microvesículas podem ser capazes de desencadear de forma independente a regeneração e reparo, bem como a mediação da organogênese de órgãos produzidos com engenharia de tecidos *ex vivo* (JUSTEWICZ et al., 2012; MAGUIRE, 2013).

Em mamíferos, as proteínas segregadas típicas incluem proteínas do soro como a albumina, as imunoglobulinas e proteínas da matriz extracelular como colágenos, proteoglicanos, fibronectina e lamininas (LODISH et al., 1999). As proteínas pouco abundantes, mas altamente bioativas segregadas, desempenham um papel fundamental na regulação da renovação e diferenciação celular (SKALNIKOVA et al., 2011).

Componentes do secretoma

O secretoma de MSCs contém muitas moléculas de sinalização celular, incluindo fatores de crescimento e citocinas que modulam os comportamentos celulares, como proliferação, diferenciação e produção de matriz extracelular, ou fornecem efeitos pró e anti-inflamatórios. Estudos recentes forneceram evidências de que as MSCs também secretam pequenas vesículas extracelulares ligadas à membrana que contêm biomoléculas, incluindo fatores de crescimento, citocinas e várias formas de RNA capazes de desencadear uma variedade de respostas em todo o organismo (RANI et al., 2015). Notavelmente, foi recentemente relatado que as vesículas extracelulares sozinhas podem fornecer benefício terapêutico semelhante ou melhorado às suas contrapartes celulares (SHAO et al., 2017).

2.1.1. Citocinas e fatores de crescimento

As MSCs secretam uma ampla variedade de citocinas de sinalização celular e fatores de crescimento. Essas moléculas bioativas podem estimular as populações de células endógenas a respostas que podem contribuir para a cura em uma variedade de tecidos (PHELPS et al., 2018). Algumas das biomoléculas mais importantes do ponto de vista fisiológico secretadas pelas MSCs incluem HGF, que tem sido relatado como envolvido na imunomodulação, migração celular, desenvolvimento, cicatrização de feridas e anti-apoptose; fator de crescimento transformante β (TGF- β) potencializado em imunomodulação, crescimento, proliferação e diferenciação celular e cicatrização de feridas; VEGF, desempenhando um papel importante na angiogênese mas também na imunomodulação e sobrevivência celular; e moléculas como o gene estimulado pelo fator de necrose tumoral 6 (ETG6), a prostaglandina E2 (PGE2) e as galectinas 1 e 9, que são todas relatadas como tendo um grande papel na imunomodulação (MADRIGAL et al., 2014; BAI et al., 2016).

2.1.2. Vesículas Extracelulares

Vesículas extracelulares é um termo genérico para diferentes tipos de vesículas secretadas por MSCs. Os exossomos, com diâmetros entre 30 a 200 nm, são formados pelo brotamento interno de corpos multivesiculares, que se fundem com a membrana plasmática para serem liberados no ambiente extracelular. As microvesículas, também referidas como ectossomos, são maiores com diâmetros entre 50 a 1000 nm e brotam diretamente da membrana plasmática. Os corpos apoptóticos variam de tamanho entre 500 a 2000 nm e abrangem fragmentos de células mortas ou moribundas. As explorações do valor terapêutico estão atualmente focadas principalmente em exossomos e microvesículas. Cada tipo de vesícula é caracterizada por sua origem, tamanho e marcadores de identificação únicos (PHELPS et al., 2018).

A maioria das células evidentemente secretam grandes quantidades de micro e nano-vesículas tanto *in vivo* para os fluidos corporais quanto *in vitro* para o meio de cultura de células (BAGLIO et al., 2012). As vesículas extracelulares são partículas ligadas à membrana fosfolipídica secretadas pelas células, e contêm materiais biológicos incluindo DNA, RNA, lipídios bioativos e proteínas. Os componentes internos são específicos da fonte celular (isto

é, do indivíduo, bem como do tecido particular do qual as MSCs foram derivadas) e do estado fisiológico das células (PHELPS et al., 2018). As vesículas extracelulares podem ser direcionadas para células locais ou transportadas pelos fluidos biológicos para células em tecidos distantes. Após a ligação com as células receptoras, podem permanecer estavelmente associadas com a membrana plasmática, dissociar-se, fundir-se diretamente com a membrana ou ser internalizadas por vias endocíticas (RAPOSO e STOORVOGEL, 2013). A composição bioquímica, a biogênese complexa dessas vesículas e, em particular, seu papel fisiológico foram apenas parcialmente decifrados. No entanto, essas vesículas têm características notáveis, incluindo a capacidade de transferir proteínas e material genético funcional como o RNA e miRNA para outras células, pelo qual tem potencial como mediadores de comunicação celular (RATAJCZAK et al., 2006; VALADI et al., 2007; SKOG et al., 2008; PEGTEL et al., 2010).

Os exossomos são pequenas vesículas membranosas que são liberadas no espaço extracelular a partir de corpos multivesiculares pela maioria dos tipos celulares (SIMPSON et al., 2009). São liberados da maioria das células constitutivamente, mas após a ativação, sua liberação é significativamente aumentada. Foram inicialmente implicados na maturação dos reticulócitos e posteriormente demonstraram ter um papel importante na resposta imune (SKOG et al., 2008). Baglio et al. (2012) descreveram a biogênese dos exossomos, envolvendo a formação de vesículas intraluminais por brotamento interno da membrana limitante de corpos multivesiculares, e esses corpos multivesiculares, se fundem com a membrana plasmática para liberar as vesículas intraluminais como exossomos. Os mesmos autores indicam que tanto os exossomos quanto outros tipos de microvesículas, podem operar de várias maneiras, uma vez que podem ser considerados vetores complexos que podem conter basicamente todas as moléculas biológicas conhecidas e, provavelmente, os solutos que estão presentes nas células parentais.

A quantidade e o conteúdo dos exossomos variam consistentemente com base nas condições microambientais e, particularmente, quando as células são submetidas a fatores estressantes (PAROLINI et al., 2009; HEDLUND et al., 2011; LV et al., 2012).

Modificações das condições de cultivo das células-tronco mesenquimais

Há evidências sugerindo que a modificação do meio de cultura das MSCs pode melhorar o efeito terapêutico de seu secretoma. Uma variedade de estímulos e condições celulares adicionais tem sido estudadas, incluindo: cultura de células sob condições hipóxicas ou privação de soro, o que aumenta a produção de fatores de crescimento angiogênicos e moléculas anti-inflamatórias; estímulos pró-inflamatórios (como estimulação com TNF- α , lipopolissacarídeos ou co-cultura com linfócitos T) que induzem maior secreção de fatores relacionados com o sistema imunológico; crescimento tridimensional, que aumenta a produção de fatores antitumorais e anti-inflamatórios; e engenharia de micropartículas (VIZOSO et al., 2017; SKALNIKOVA, 2013).

2.1.3. Hipóxia

As concentrações adequadas de oxigênio (O_2) podem aumentar as propriedades e o crescimento das MSCs, e o efeito trófico do seu secretoma. Em uma variedade de tecidos, a redução da tensão de oxigênio ativa o fator induzível por hipóxia α (HIF-1 α), levando à expressão de fatores angiogênicos, como o VEGF (AHLUWALIA e TARNAWSKI, 2012; HAWKINS et al., 2013; YOUN et al., 2011). Foi demonstrado que a cultura de células em condições de hipóxia tem efeitos benéficos sobre as MSCs (MADRIGAL et al., 2014). De fato, sabe-se que a maioria dos fatores de crescimento são secretados em maiores quantidades, em várias células-tronco, sob condições de hipóxia (PAWITAN, 2014). Além disso, a hipóxia permite manter um fenótipo indiferenciado de MSCs para autorrenovação, em vista das áreas com baixa oxigenação do corpo, mal perfundidas pelo sistema circulatório nas quais estão as MSCs (HAWKINS et al., 2013; HAQUE et al., 2013). Outros estudos também têm demonstrado que uma tensão de 3% de O_2 na cultura de células tem efeitos positivos na sobrevivência *in vitro* e na autorrenovação de MSCs derivadas de medula óssea, mantendo seu estado indiferenciado (PATTAPPA et al., 2013; D'IPPOLITO et al., 2006). Uma tensão de 2% de O_2 preserva a indiferenciação e aumenta a proliferação e o potencial angiogênico das MSCs derivadas de tecido adiposo (YAMAMOTO et al., 2013; LIU et al., 2013). Foi recentemente relatado que as células-tronco da polpa dentária humana cultivadas sob hipóxia são menores em tamanho e exibem núcleos maiores do que aquelas cultivadas em ambiente normóxico. Por outro lado, a cultura em 5% O_2 aumenta significativamente sua

taxa de migração e proliferação, mas também a expressão de marcadores de células-tronco e fator neurotrófico derivado do cérebro BDNF, NGF, SOX2 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (AHMED et al., 2016). Assim, pelo contrário, vários estudos têm demonstrado a influência negativa da baixa concentração de O₂ no ambiente nas MSCs, induzindo a senescência precoce (ESTRADA et al., 2012), maior tempo de duplicação e danos no DNA (FEHRER et al., 2007).

Mecanismos de ação do secretomas

2.1.4. Imunomodulação e atividade anti-inflamatória

Uma das propriedades funcionais mais bem descritas das MSCs *in vivo* é seu potente efeito no sistema imunológico. É bem conhecido que as MSCs têm a capacidade de suprimir a resposta imune (JIANG et al., 2005; CORCIONE et al., 2006; CASIRAGHI et al., 2008; JARVINEN et al., 2008; SHENG et al., 2008), no entanto, também tem sido demonstrado que podem funcionar como células apresentadoras de antígenos (CHAN et al., 2006; STAGG et al., 2006).

As MSCs afetam a proliferação, ativação e função das células imunes. Tem se mostrado em estudos pré-clínicos um efeito supressor na imunidade inata e adaptativa (KEATING, 2012; FIERABRACCI et al., 2016). As MSCs normalmente expressam o complexo principal de histocompatibilidade-I (MHC-I), mas carecem de expressão de complexo principal de histocompatibilidade-II (MHC-II), CD40, CD80 e CD86 na superfície celular e, não são reconhecidas pelas células T e frequentemente não induzem uma resposta imunológica pelo transplante (RYAN et al., 2005). Além de ser caracterizadas pela sua baixa expressão do MHC-II e moléculas co-estimuladoras, interferem em diversas vias da resposta imunológica interações célula-a-célula e a secreção de fatores solúveis, incluindo membros da família do TGF- β , IL-6 e IL-10, as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), óxido nítrico e indoleamina 2,3 deoxygenase (IDO) (BAGLIO et al., 2012). Além disso, as MSCs atuam em três etapas da resposta imune, no reconhecimento e apresentação do antígeno; ativação, proliferação e diferenciação de células T; e o estágio efetor das células T (LIANG et al., 2014).

Está bem estabelecido que o efeito anti-inflamatório do meio condicionado por MSCs é, pelo menos em parte, mediado por moléculas imunorreguladoras solúveis. Entre as citocinas anti-inflamatórias presentes em ele estão o fator de necrose tumoral $\beta 1$ (TNF- $\beta 1$), IL-13, proteína de ligação IL-18 (IL18BP), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator de neurotrofina 3 (NT-3), IL-10, IL-12p70, IL-17E, IL-27 ou antagonista do receptor de IL-1 (IL1RA) (BERMUDEZ et al., 2016; ZAGOORA et al., 2012). Também foi encontrado que o meio condicionado por MSCs contem citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1b (ZAGOORA et al., 2012), IL-6, IL-8 e IL-9 (CANTINIEAUX et al., 2013; MIRABELLA et al., 2011; LEE et al., 2011).

O equilíbrio entre essas citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias pode determinar o efeito final. No entanto, é também notável que as MSCs inibem as citocinas pró-inflamatórias, como o interferon- γ e o TNF- α , enquanto aumentam a liberação de IL-10 anti-inflamatória (CAPLAN, 2007; YI e SONG, 2012).

2.1.5. Atividade Anti-apoptótica

As MSCs previnem a morte celular por meio da restauração do microambiente local, produzindo proteínas inibidoras da apoptose e diminuindo a expressão de proteínas anti-apoptóticas (LI et al., 2015). Deste modo, foi relatado que as MSCs diminuem a expressão dos fatores pró-apoptóticos Bax e de caspase-3 clivada, mas aumentam os níveis de Bcl-2 anti-apoptóticos, enquanto a expressão de fatores pró-angiogênicos, como fator básico de crescimento fibroblástico (bFGF), o VEGF e o CXCL12 foram aumentados em corações tratados com MSCs (TANG et al., 2005).

2.1.6. Cicatrização de Feridas e Reparo de Tecidos

Um papel benéfico na cicatrização de feridas e reparação de tecidos foi observado por parte das MSCs no local da lesão (TOMA et al., 2002). Dados de modelos animais indicam que os efeitos autócrinos ou parácrinos das MSCs, em vez de seu enxerto direto e diferenciação tecidual, podem desempenhar um papel fundamental na cicatrização de feridas (SALGADO et al., 2010; STASTNA e VAN EYK, 2012; DRAGO et al., 2013).

Vários estudos relataram a presença de fatores de crescimento no meio condicionado por MSCs que contribuem para a regeneração de tecidos de órgãos danificados, com especial

ênfase na proliferação (BERMUDEZ et al., 2015; BHANG et al., 2014; PARK et al., 2010; LEE et al., 2011). Também vale ressaltar que o secretoma de MSCs possui efeitos anti-fibróticos e angiogênicos que podem reduzir a formação de cicatrizes (CARGNONI et al., 2012; PREDA et al., 2014).

2.1.7. Efeitos Neuroprotetores e Neurotróficos

Na última década, numerosos estudos surgiram apoiando os efeitos neuroprotetores e neurotróficos do secretoma de MSCs (RATAJCZAK et al., 2016; CASEIRO et al., 2016; LUARTE et al., 2016). Vários estudos relataram efeitos benéficos de abordagens baseadas em MSCs em modelos de lesão nervosa. Estes efeitos incluem a modulação do ambiente inflamatório no local, vascularização aumentada do local de regeneração, aumento da espessura das bainhas de mielina, modulação do estágio de degeneração, regeneração acelerada das fibras e aumento do seu número, redução de cicatrizes fibróticas e melhoria na organização das fibras (CASEIRO et al., 2016).

2.1.8. Regulação da angiogênese

A angiogênese é definida como o processo pelo qual a nova vasculatura brota de vasos sanguíneos pré-existentes. A angiogênese normal é importante durante o processo de cicatrização de feridas (VIZOSO et al., 2017). Vários estudos tem demonstrado o efeito do secretoma das MSCs em etapas fundamentais da angiogênese. Por exemplo, diferentes populações de MSCs induzem proliferação e migração de células endoteliais promovendo a formação de vasos, bem como previnem a apoptose de células endoteliais *in vitro* (BURLACU et al., 2013).

O papel das MSCs na angiogênese é de grande interesse dado o amplo espectro de doenças clínicas relacionadas ao crescimento insuficiente ou anormal de vasos, incluindo doenças ateroscleróticas e distúrbios de cicatrização. O transplante bem-sucedido de MSCs para promover a angiogênese foi demonstrado em diferentes modelos animais de isquemia cerebral / acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, bexiga neurogênica, doença arterial periférica e incontinência urinária por estresse (HSIEH et al., 2013; LIU et al., 2013; SHARMA et al., 2013).

Esses dados indicam que vários fatores presentes no meio condicionado por MSCs podem representar um coquetel equilibrado que atua em conjunto para promover a angiogênese. Além disso, tem se demonstrado que a secreção destes fatores pró e antiangiogênicos pode ser modificada dependendo das quimiocinas e condições hipóxicas (VIZOSO et al., 2017).

2.1.9. Efeito Antimicrobiano

Vários estudos *in vivo* mostraram efeitos benéficos do tratamento com MSC na sepse induzida por bactérias, sugerindo propriedades imunomoduladoras das MSCs mediadas pela atividade aumentada de fagócitos (GUPTA et al., 2007; GONZALEZ-REY et al., 2009; MEI et al., 2010). Em experimentos *in vitro*, a resposta imune das células hospedeiras não é envolvida no processo, pelo que as substâncias presentes no meio condicionado devem ser responsáveis pelo efeito antibacteriano, como as quimiocinas CXCL10, CXCL8, CXCL1, CXCL6, CCL20 e CCL5, que são conhecidas por terem efeitos antibacterianos, o que leva a considerar que uma sinalização parácrina pode estar implicada no potencial antibacteriano do meio condicionado (YANG et al., 2003; EGESTEN et al., 2007; COLLIN et al., 2008).

Produção de meio condicionado por células-tronco mesenquimais

A análise proteômica da secreção celular envolve vários passos básicos: isolamento e caracterização celular, cultura celular em meio de cultura contendo FBS que é geralmente seguido por uma extensa lavagem celular e cultura em meio livre de soro. A presença de soro no meio de cultura de células influencia dramaticamente a separação e a detecção das proteínas secretadas pelas MSCs em quantidades menores (SKALNIKOVA, 2013). Assim, os fatores tróficos secretados pelas MSCs em pequenas quantidades podem ser mascarados sob as proteínas séricas altamente abundantes se o meio contendo soro for usado. A omissão de FBS não só diminui substancialmente a complexidade da amostra, mas também aumenta a reprodutibilidade (PLANQUE et al., 2009).

BROWN et al (2012) descreve um processamento da preparação do meio condicionado, onde relata que a maioria dos estudos do secretoma de células de mamífero são realizados *in vitro* cultivando primeiro as células de interesse em meio suplementado com soro até um 80 ou 100% de confluência para obter um número suficiente de células. As

células são então cuidadosamente lavadas com solução salina tamponada com fosfato estéril (até seis vezes) para remover as proteínas do FBS, antes de serem incubadas em meio isento de soro. O meio condicionado contendo proteínas segregadas pelas células é coletado, centrifugado a 300G para remover as células flutuantes e os restos celulares brutos, para depois passar por um filtro de 0,22 µm para remover pequenos detritos. O meio condicionado é então concentrado até 200 vezes usando dispositivos de filtração por centrifugação (geralmente com um corte de massa molecular de 3 kDa). Outros métodos para concentração de proteínas utilizados são o vácuo de velocidade (speed vacuum), e precipitação de proteínas pelo ácido tricloroacético, embora este último possa levar a maiores perdas de proteínas e problemas com a re-solubilização de proteínas (DOWELL et al., 2009). As amostras de meio condicionado podem ser armazenadas a -80 °C antes de mais análises (STASTNA e VAN EYK, 2012). A concentração de proteína normalmente contém de 50 a 100 µg de proteína total, e é fracionada por SDS-PAGE. Em geral, dependendo da técnica proteômica e do espectrômetro de massa, descobriu-se que a maioria das células de mamíferos libera de 100 a 600 proteínas ou mais, incluindo proteínas clássica e não classicamente secretadas (BROWN et al., 2012).

Várias proteínas intracelulares do secretoma cultivado *in vitro* são consistentemente libertadas por culturas celulares de mamíferos no meio condicionado. Embora essas proteínas intracelulares possam ser liberadas devido à morte celular, existem evidências de que algumas dessas proteínas são secretadas por vias não clássicas, como por meio de vesículas e exossomos, e podem ter funções extracelulares (NICKEL, 2010).

Talvez o maior desafio nos estudos secretômicos esteja na discriminação de proteínas que são verdadeiramente secretadas daquelas que são liberadas como resultado de estresse não-fisiológicos de lesão mecânica. Para minimizar esses problemas, algumas técnicas têm sido propostas, como o sistema de cultura de fibra oca, que permite culturas celulares de alta densidade com mínima lise celular (WU et al., 2009).

A análise proteômica do secretoma de MSCs foi recentemente possibilitada principalmente devido ao extenso desenvolvimento em técnicas de separação de proteínas, MS, métodos imunológicos e bioinformática, juntamente com isolamento, expansão e diferenciação de MSCs. Desde 2003, quando a primeira análise proteômica do secretoma de

MSCs derivado da medula óssea humana foi realizada (POTIAN et al., 2003), mais de 30 estudos adicionais foram publicados, mostrando o crescente interesse no secretoma de MSCs (SKALNIKOVA, 2013).

Vantagens do uso do meio condicionado sobre as células-tronco mesenquimais

Alguns dos desafios relacionados ao transplante de MSCs são a rejeição imunomediada, instabilidade genética induzida por senescência ou perda de função e sobrevivência celular limitada (LIM et al., 2011). Além dessas questões, o maior problema no uso de MSCs para aplicações clínicas é a possibilidade de transformação maligna. A produção de uma quantidade suficiente de MSCs para uso clínico requer uma expansão *in vitro* consistente, que pode levar à transformação espontânea das células (RUBIO et al., 2008). À luz dessas observações, a escolha de trasladar o potencial das MSCs para a clínica deve ser considerada com cautela.

O uso de terapias livres de células, como o meio condicionado por MSCs em medicina regenerativa, oferece vantagens importantes sobre as terapias baseadas em células-tronco incluindo considerações de segurança associadas ao transplante de populações de células vivas e proliferativas como compatibilidade imunológica, tumorigenicidade, formação de êmbolos e transmissão de infecções; o secretoma de MSCs pode ser avaliado quanto a segurança, dosagem e potência de uma maneira análoga a agentes farmacêuticos convencionais; o armazenamento pode ser feito sem o requerimento de agentes crioprotetores potencialmente tóxicos por um longo período sem perda da potência do produto (EIRO et al., 2014; BERMUDEZ et al., 2015; BERMUDEZ et al., 2016); o uso de secretoma de MSCs, é mais econômico e mais prático para aplicação clínica, uma vez que evita procedimentos de coleta de células (OSUGI et al., 2012); a produção em massa é possível usando linhagens celulares sob condições laboratoriais controladas, fornecendo uma fonte conveniente de fatores bioativos; o tempo e custo de expansão e manutenção de células-tronco cultivadas podem ser reduzidos e podem estar imediatamente disponíveis para o tratamento; e o produto biológico obtido para aplicações terapêuticas pode ser modificado para os efeitos celulares específicos desejados (VIZOSO et al., 2017).

Atualmente, sabe-se que o meio condicionado por MSCs melhora significativamente vários biomarcadores fisiopatológicos em diferentes afeções e, em geral, pode ser tão eficaz quanto o transplante das MSCs correspondentes em distintos modelos animais (VIZOSO et al., 2017; IONESCU et al., 2012; TIMMERS et al., 2007; CHANG et al., 2013; ZHOU et al., 2013; EIRO et al., 2014).

3. REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, A.; TARNAWSKI, A. S. Critical role of hypoxia sensor-HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 90-97, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986712803413944>.
- AHMED, N. E.; MURAKAMI, M.; KANEKO, S.; NAKASHIMA, M. The effects of hypoxia on the stemness properties of human dental pulp stem cells (DPSCs). **Scientific Reports**, v. 6, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep35476>
- ALM, J. J., KOIVU, H. M., HEINO, T. J., HENTUNEN, T. A., LAITINEN, S., AND ARO, H. T. Circulating plastic adherent mesenchymal stem cells in aged hip fracture patients. **Journal of Orthopedic Research**, v. 28, p. 1634-1642, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.21167>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00359>
- BAI, L.; LI, D.; LI J.; LUO, Z.; YU, S.; CAO, S.; SHEN, L.; ZUO, Z.; MA, X. Bioactive molecules derived from umbilical cord mesenchymal stem cells. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 8, p. 761-769, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.09.006>
- BERMUDEZ, M. A.; SENDON-LAGO, J.; EIRO, N.; TREVIÑO, M.; GONZALEZ, F.; YEBRA-PIMENTEL, E.; GIRALDEZ, M. J.; MACIA, M.; LAMELAS, M. L.; SAA, J.; VIZOSO, F.; PEREZ-FERNANDEZ, R. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, n. 2, p. 983-992, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15859>
- BERMUDEZ, M. A.; SENDON-LAGO, J.; SEOANE, S.; EIRO, N.; GONZALEZ, F.; SAA, J.; VIZOSO, F.; PEREZ-FERNANDEZ, R. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. **Experimental Eye Research**, v. 149, p. 84-92, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.06.022>
- BHANG, S. H.; LEE, S.; SHIN, J. Y.; LEE, T. J.; JANG, H. K.; KIM, B. S. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. **Molecular Therapy**, v. 22, p. 862-872, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/mt.2013.301>
- BRION, C.; MILLER, S. G.; MOORE, H. P. Regulated and constitutive secretion. Differential effects of protein synthesis arrest on transport of glycosaminoglycan chains to the two secretory pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 1477-1483, 1992.
- BROWN, K. J.; FORMOLO, C. A.; SEOL, H.; MARATHI, R. L.; DUGUEZ, S.; AN, E.; PILLAI, D.; NAZARIAN, J.; ROOD, B. R.; HATHOUT Y. Advances in the proteomic investigation of the cell secretome. **Expert Review of Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 337-345, 2012.
- BURLACU, A.; GRIGORESCU, G.; ROSCA, A. M.; PREDA, M. B.; SIMIONESCU, M. Factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have complementary effects on angiogenesis in vitro. **Stem Cells and Development**, v. 22, p. 643-653, 2013.

CANTINIEAUX, D.; QUERTAINMONT, R.; BLACHER, S.; ROSSI, L.; WANET, T.; NOEL, A.; BROOK, G.; SCHOENEN, J.; FRANZEN, R. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: An original strategy to avoid cell transplantation. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

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. Adult mesenchymal stem cells: When, where, and how. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 6, 2015.

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

CAPLAN, A. I.; CORREA, D. The MSC: An injury drugstore. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 1, p. 11-15, 2011.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076-1084, 2006.

CARGNONI, A.; RESSEL, L.; ROSSI, D.; POLI, A.; ARIENTI, D.; LOMBARDI, G.; PAROLINI, O. Conditioned medium from amniotic mesenchymal tissue cells reduces progression of bleomycin-induced lung fibrosis. **Cytotherapy**, v. 14, n. 2, p. 153-161, 2012.

CASEIRO, A. R.; PEREIRA, T.; IVANOVA, G.; LUIS, A. L.; MAURICIO, A. C. Neuromuscular regeneration: Perspective on the application of mesenchymal stem cells and their secretion products. **Stem Cells International**, v. 2016, p.16, 2016.

CASIRAGHI, F., AZZOLLINI, N., CASSIS, P., IMBERTI, B., MORIGI, M., CUGINI, D., CAVINATO, R. A., TODESCHINI, M., SOLINI, S., SONZOGNI, A., PERICO, N., REMUZZI, G., AND NORIS, M. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3933-3946, 2008.

CASTEILLA, L.; PLANAT-BÉNARD, V.; COUSIN, B.; SILVESTRE, J. S.; LAHARRAGUE, P.; CHARRIÈRE, G.; CARRIÈRE, A.; PÉNICAUD, L. Plasticity of adipose tissue: A promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases?. **Archives des maladies du coeur et des vaisseaux**, v. 98, p. 922-926, 2005.

CHAN, J. L., TANG, K. C., PATEL, A. P., BONILLA, L. M., PIEROBON, N., PONZIO, N. M., RAMESHWAR, P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon- γ . **Blood**, v. 107, p. 4817-4824, 2006.

CHANG, C. P.; CHIO, C. C.; CHEONG, C. U.; CHAO, C. M.; CHENG, B. C.; LIN, M. T. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. **Clinical Science**, v. 124, n. 3, p. 165-176, 2013.

CHIMENTI, I.; SMITH, R. R.; LI, T. S.; GERSTENBLITH, G.; MESSINA, E.; GIACOMELLO, A.;

- MARBAN, E. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. **Circulation Research**, v. 106, n.5, p. 971-980, 2010.
- COLANTONIO, A.; Dunkinson, C.; Bovenkamp, D. E.; Van Eyk, J. E. Effective removal of albumin from serum. *Proteomics*, v. 5, p. 3831–3835, 2005.
- COLLIN, M.; LINGE, H. M.; BJARTELL, A.; GIWERCMAN, A.; MALM, J.; EGESTEN, A. Constitutive expression of the antibacterial CXC chemokine GCP-2/CXCL6 by epithelial cells of the male reproductive tract. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 1, p. 37-43, 2008.
- CORCIONE, A., BENVENUTO, F., FERRETTI, E., GIUNTI, D., CAPIELLO, V., CAZZANTI, F., RISSO, M., GUALANDI, F., MANCARDI, G. L., PISTOIA, V., UCCELLI, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, p. 367-372, 2006.
- D’IPPOLITO, G.; DIABIRA, S.; HOWARD, G. A.; ROOS, B. A.; SCHILLER, P. C. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human miami cells. **Bone**, v. 39, p. 513-522, 2006.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T.; CAPLAN, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 5-6, p. 419-427, 2009.
- DAHLGREN, L. A. Management of tendon injuries. *In*: ROBINSON, N. E; SPRAYBERRY, K. (Org.). **Current therapy in equine medicine**. chap. 115, p. 518-523, 2009.
- DAHLGREN, L. A. Stem Cell Therapy. *In*: ROBINSON, N. E; SPRAYBERRY, K. (Org.). **Current therapy in equine medicine**, chap. 199, p. 908-911, 2009.
- DE BARI, C.; DELL’ACCIO, F.; LUYTEN, F. P. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 1, p. 85-95, 2001.
- DE BARI, C.; DELL’ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 8, p. 1928-1942, 2001.
- DE UGARTE, D. A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P. A.; ELBARBARY, A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H.; FRASER, J. K. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. **Immunology Letters**, v. 89, p. 267-270, 2003.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v. 28, p. 875-884, 2000.
- DELORME, B.; NIVET, E.; GAILLARD, J.; HAUPL, T.; RINGE, J.; DEVEZE, A.; MAGNAN, J.; SOHIER, J.; KHRESTCHATISKY, M.; ROMAN, F. S.; CHARBORD, P.; SENSEBÉ, L.; LAYROLLE, P.; FÉRON, F. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 6, p. 853-866, 2010.
- DENG, J., ZOU, Z. M., ZHOU, T. L., SU, Y. P., AI, G. P., WANG, J. P., XU, H., AND DONG, S. W.

Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue. **Neurological Sciences**, v. 32, p. 641-651, 2011.

DOCHEVA, D.; POPOV, C.; MUTSCHLER, W.; SCHIEKER, M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: Surface characteristics and the integrin system. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n.1, p. 21–38, 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. 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.

DOWELL, J. A.; JOHNSON, J. A.; LI, L. Identification of astrocyte secreted proteins with a combination of shotgun proteomics and bioinformatics. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 8, p. 4135-4143, 2009.

DRAGO, D.; COSSETTI, C.; IRACI, N.; GAUDE, E.; MUSCO, G.; BACHI, A.; PLUCHINO, S. The stem cell secretome and its role in brain repair. **Biochimie**, v. 95, p. 2271-2285, 2013.

DUGGAL, S.; BRINCHMANN, J. E. Importance of serum source for the in vitro replicative senescence of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 11, p. 2908-2915, 2011.

EGESTEN, A.; ELIASSON, M.; JOHANSSON, H. M.; OLIN, A. I.; MORGELIN, M.; MUELLER, A.; PEASE, J. E.; FRICK, I. M.; BJORCK, L. The CXC chemokine MIG/CXCL9 is important in innate immunity against streptococcus pyogenes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 5, p. 684-693, 2007.

EGGENHOFER, E.; BENSELER, V.; KROEMER, A.; POPP, F. C.; GEISLER, E. K.; SCHLITT, H. J.; BAAN, C. C.; DAHLKE, M. H.; HOOGDUIJN, M. J. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 297, 2012.

EIRO, N.; SENDON-LAGO, J.; SEOANE, S.; BERMUDEZ, M. A.; LAMELAS, M. L.; GARCIA-CABALLERO, T.; SCHNEIDER, J.; PEREZ-FERNANDEZ, R.; VIZOSO, F. J. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. **Oncotarget**, v. 5, p. 10692-10708, 2014.

ESTRADA, J. C.; ALBO, C.; BENGURIA, A.; DOPAZO, A.; LOPEZ-ROMERO, P.; CARRERA-QUINTANAR, L.; ROCHE, E.; CLEMENTE, E. P.; ENRIQUEZ, J. A.; BERNAD, A.; SAMPER, E. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, p. 743-755, 2012.

FARINA, A.; D'ANIELLO, C.; SEVERINO, V.; HOCHSTRASSER, D. F.; PARENTE, A.; MINCHIOTTI, G.; CHAMBERY, A. Temporal proteomic profiling of embryonic stem cell secretome during cardiac and neural differentiation. **Proteomics**, v. 11, n. 20, p. 3972-3982, 2011.

FEHRER, C.; BRUNAUER, R.; LASCHOBBER, G.; UNTERLUGGAUER, H.; REITINGER, S.; KLOSS, F.; GULLY, C.; GASSNER, R.; LEPPERDINGER, G. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. **Aging Cell**, v. 6, p. 745-757, 2007.

FIERABRACCI, A.; DEL FATTORE, A.; MURACA, M.; DELFINO, D. V. The use of mesenchymal stem cells for the treatment of autoimmunity: From animals models to human disease. **Current Drug Targets**, v. 17, p. 229-238, 2016.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and tissue kinetics**, v. 3, p. 393–403, 1970.

GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V. J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, v. 103, n.11, p. 1204-1219, 2008.

GONZALEZ-REY, E.; ANDERSON, P.; GONZALEZ, M. A.; RICO, L.; BUSCHER, D.; DELGADO, M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. **Gut**, v. 58, p. 929-939, 2009.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 13625-13630, 2000.

GUPTA, N.; SU, X.; POPOV, B.; LEE, J. W.; SERIKOV, V.; MATTHAY, M. A. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1855-1863, 2007.

HARMAN, R. M.; YANG, S.; HE M. K.; VAN DE WALLE, G. R. Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds. **Stem Cell Res Ther**, v. 8, p. 157, 2017.

HAQUE, N.; RAHMAN, M. T.; ABU KASIM, N. H.; ALABSI, A. M. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p.12, 2013.

HAWKINS, K. E.; SHARP, T. V.; MCKAY, T. R. The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. **Regenerative Medicine**, v. 8, p. 771-782, 2013.

HEDLUND, M., NAGAEVA, O., KARGL, D., BARANOV, V., MINCHEVA-NILSSON, L. Thermal and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

HOYNOWSKI, S. M.; FRY, M. M.; GARDNER, B. M.; LEMING, M. T.; J. R.; TUCKER, BLACK, L.; SAND, T.; MITCHELL, K. E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 2 p. 347-353, 2007.

HSIEH, J. Y.; WANG, H. W.; CHANG, S. J.; LIAO, K. H.; LEE, I. H.; LIN, W. S.; WU, C. H.; LIN, W. Y.; CHENG, S. M. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

HUA, J.; YU, H.; DONG, W.; YANG, C.; GAO, Z.; LEI, A.; SUN, Y.; PAN, S.; WU, Y.; DOU, Z. Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: Potential differentiation of germ cells. **Tissue and Cell**, v. 41, p. 448-455, 2009.

- HUMPHREYS, B. D.; BONVENTRE, J. V. Mesenchymal stem cells in acute injury kidney. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 311-325, 2008.
- IONESCU, L.; BYRNE, R. N.; VAN HAAFTEN, T.; VADIVEL, A.; ALPHONSE, R. S.; REY-PARRA, G. J.; WEISSMANN, G.; HALL, A.; EATON, F.; THEBAUD, B. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: In vivo evidence for stem cell paracrine action. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 303, n. 11, p. L967-L977, 2012.
- JARVINEN, L., BADRI, L., WETTLAUFER, S., OHTSUKA, T., STANDIFORD, T. J., TOEWS, G. B., PINSKY, D. J., PETERS-GOLDEN, M., LAMA, V. N. Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 4389-4396, 2008.
- JIANG, W. *et al.* Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. **Transplant International**, v. 19, p. 570-580, 2006.
- JIANG, X. X., ZHANG, Y., LIU, B., ZHANG, S. X., WU, Y., YU, X. D., AND MAO, N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte- derived dendritic cells. **Blood**, v. 105, p. 4120-4126, 2005.
- JUSTEWICZ, D. M.; SHOKES, J. E.; REAVIS, B.; BOYD, S. A.; BURNETTE, T. B.; HALBERSTADT, C. R.; SPENCER, T.; LUDLOW, J. W.; BERTRAM, T. A.; JAIN, D. Characterization of the human smooth muscle cell secretome for regenerative medicine. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 18, p. 797-816, 2012.
- KEATING, A. Mesenchymal stromal cells: New directions. **Cell Stem Cell**, v. 10, 709–716, 2012.
- KILROY, G. E.; FOSTER, S. J.; WU, X.; RUIZ, J.; SHERWOOD, S.; HEIFETZ, A.; LUDLOW, J. W.; STRICKER, D. M.; POTINY, S.; GREEN, P.; HALVORSEN, Y. D.; CHEATHAM, B.; STORMS, R. W.; GIMBLE, J. M. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. **Journal of Cellular Physiology**, v. 212, n. 3, p. 702-709, 2007.
- KLIMANSKAYA, I.; ROSENTHAL, N.; LANZA, R. Derive and conquer: sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 131-142, 2008.
- LAI, R. C.; TAN, S. S.; TEH, B. J.; SZE, S. K.; ARSLAN, F.; DE KLEIJN, D. P.; CHOO, A.; LIM, S. K. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. **International Journal of Proteomics**, v. 2012, p. 14, 2012.
- LE BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, p. 383-396, 2012.
- LEE, M. J.; KIM, J.; KIM, M. Y.; BAE, Y. S.; RYU, S. H.; LEE, T. G.; KIM, J. H. Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha-induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n.4, p. 1754-1762, 2010.
- LEE, M. J.; KIM, J.; LEE, K. I.; SHIN, J. M.; CHAE, J. I.; CHUNG, H. M. Enhancement of wound healing by secretory factors of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. **Cytotherapy**, v. 13, n. 2, p. 165-178, 2011.

- LI, B.; ZHANG, H.; ZENG, M.; HE, W.; LI, M.; HUANG, X.; DENG, D.Y.; WU, J. Bone marrow mesenchymal stem cells protect alveolar macrophages from lipopolysaccharide-induced apoptosis partially by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. **Cell Biology International**, v. 39, n. 2, p. 192-200, 2015.
- LIANG, X.; DING, Y.; ZHANG, Y.; TSE, H. F.; LIAN, Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: Current status and perspectives. **Cell Transplant**, v. 23, p. 1045-1059, 2014.
- LIM, P., PATEL, S. A., AND RAMESHWAR, P. Effective tissue repair and immunomodulation by mesenchymal stem cells within a milieu of cytokines. **Stem Cell-Based Tissue Repair**, p. 346-365, 2011.
- LIU, G.; PARETA, R. A.; WU, R.; SHI, Y.; ZHOU, X.; LIU, H.; DENG, C.; SUN, X.; ATALA, A.; OPARA, E.C.; ZHANG, Y. Skeletal myogenic differentiation of urine-derived stem cells and angiogenesis using microbeads loaded with growth factors. **Biomaterials**, v. 34, p. 1311-1326, 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.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D.; DARNELL, J. (Ed.). **Molecular Cell Biology**, W. H. Freeman, 1999.
- LOVATI, B.; CORRADETI, C. A.; LANGE, 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. 103-112, 2011.
- LUARTE, A.; BATIZ, L. F.; WYNEKEN, U.; LAFOURCADE, C. Potential therapies by stem cell-derived exosomes in CNS diseases: Focusing on the neurogenic niche. **Stem Cells International**, v. 2016, p.16, 2016.
- LV, L. H., WAN, Y. L., LIN, Y., ZHANG, W., YANG, M., LI, G. L., LIN, H. M., SHANG, C. Z., CHEN, Y. J., MIN, J. Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell anti-tumor responses in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 15874-15885, 2012.
- MADRIGAL, M.; RAO, K. S.; RIORDAN, N. H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, p. 260, 2014.
- MAGUIRE, G. Stem cell therapy without the cells. **Communicative & Integrative Biology**, v. 6, n. 6, 2013.
- MAIA, L.; DE MORAES, C. N.; DIAS, M. C.; MARTINEZ, J. B.; CABALLOL, A. O.; TESTONI, G.; DE QUEIROZ, C. M.; PEÑA, R. D.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; DE OLIVEIRA, E. A proteomic study of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord. **Theriogenology**, v. 100, p. 8-15, 2017.
- MAKRIDAKIS, M.; ROUBELAKIS, M. G.; VLAHOU, A. Stem cells: Insights into the secretome. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1834, n. 11, p. 2380-2384, 2013.
- MEI, S. H.; HAITSMAN, J. J.; DOS SANTOS, C. C.; DENG, Y.; LAI, P. F.; SLUTSKY, A. S.; LILES,

- W. C.; STEWART, D. J. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, p. 1047-1057, 2010.
- MIRABELLA, T.; CILLI, M.; CARLONE, S.; CANCEDDA, R.; GENTILI, C. Amniotic liquid derived stem cells as reservoir of secreted angiogenic factors capable of stimulating neo-arteriogenesis in an ischemic model. **Biomaterials**, v. 32, p. 3689-3699, 2011.
- MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, p. 1068-1074, 2006.
- MULLER-EHMSSEN, J.; WHITTAKER, P.; KLONER, R. A.; DOW, J. S.; SAKODA, T.; LONG, T. I.; LAIRD, P. W.; KEDES, L. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, p. 107-116, 2002.
- MUSTAFA, S. A.; HOHEISEL, J. D.; ALHAMDANI, M. S. Secretome profiling with antibody microarrays. **Molecular BioSystems**, v. 7, p. 1795-1801, 2011.
- NAKAHARA, H.; BRUDER, S. P.; GOLDBERG, V. M.; CAPLAN A. I. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 259, p. 223-232, 1990.
- NARDI, N. B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. **Genética na Escola**, v. 02, n. 02, p. 25-29, 2007.
- NICKEL, W. Pathways of unconventional protein secretion. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 621-626, 2010.
- OEDAYRAJSINGH-VARMA, M. J.; VAN HAM, S. M.; KNIPPENBERG, M.; HELDER, M. N.; KLEIN-NULEND, J.; SCHOUTEN, T. E.; RITT, M. J.; VAN MILLIGEN, F. J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. **Cytotherapy**, v. 8, n. 2, p. 166-177, 2006.
- ORCIANI, M.; DI PRIMIO, R. Skin-derived mesenchymal stem cells: Isolation, culture, and characterization. **Methods in Molecular Biology**, v. 989, p. 275-283, 2013.
- OSUGI, M.; KATAGIRI, W.; YOSHIMI, R.; INUKAI, T.; HIBI, H.; UEDA, M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. **Tissue Engineering: Part A** v. 18, n. 13-14, p. 1479-1489, 2012.
- PAREKKADAN, B.; MILWID, J. M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, p. 87-117, 2010.
- PARK, B. S.; KIM, W. S.; CHOI, J. S.; KIM, H. K.; WON, J. H.; OHKUBO, F.; FUKUOKA, H. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: Evidence of increased growth factor secretion. **Biomedical Research**, v. 31, p. 27-34, 2010.
- PAROLINI, I.; FEDERICI, C.; RAGGI, C.; LUGINI, L.; PALLESCHI, S.; DE MILITO, A.; COSCIA, C.; IESSI, E.; LOGOZZI, M.; MOLINARI, A.; COLONE, M.; TATTI, M.; SARGIACOMO, M.; FAIS, S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 34211-34222, 2009.

- PATTAPPA, G.; THORPE, S. D.; JEGARD, N. C.; HEYWOOD, H. K.; DE BRUIJN, J. D.; LEE, D. A. Continuous and uninterrupted oxygen tension influences the colony formation and oxidative metabolism of human mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 19, p. 68-79, 2013.
- PAWITAN, J. A. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. **BioMed Research International**, v. 2014, p.14, 2014.
- PEGTEL, D. M.; COSMOPOULOS, K.; THORLEY-LAWSON, D. A.; VAN EIJNDHOVEN, M. A.; HOPMANS, E. S.; LINDENBERG, J. L.; DE GRUIJL, T. D.; WÜRDINGER, T.; MIDDELDORP, J. M. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 6328-6333, 2010.
- PEREIRA, L. V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.1, p.7-14, 2008.
- PHELPS, J.; SANATI-NEZHAD, A.; UNGRIN, M.; DUNCAN, N. A.; SEN, A. Bioprocessing of Mesenchymal Stem Cells and Their Derivatives: Toward Cell-Free Therapeutics. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 23, 2018.
- PLANQUE, C.; KULASINGAM, V.; SMITH, C. R.; RECKAMP, K.; GOODGLICK, L.; DIAMANDIS, E. P. Identification of five candidate lung cancer biomarkers by proteomics analysis of conditioned media of four lung cancer cell lines. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2746-2758, 2009.
- PONTE, A. L., MARAIS, E., GALLAY, N., LANGONNE, A., DELORME, B., HERAULT, O., CHARBORD, P., AND DOMENECH, J. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. **Stem Cells**, v. 25, n. 7, p. 1737-1745, 2007.
- POTIAN, J. A.; AVIV, H.; PONZIO, N. M.; HARRISON, J. S.; RAMESHWAR, P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens, **Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3426-3434, 2003.
- PREDA, M. B.; RONNINGEN, T.; BURLACU, A.; SIMIONESCU, M.; MOSKAUG, J. O.; VALEN, G. Remote transplantation of mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury. **Stem Cells**, v. 32, n. 8, p. 2123-2134, 2014.
- RADA, T.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Adipose tissue-derived stem Cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 15, n. 2, p. 113–125, 2009.
- 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.
- RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373-383, 2013.
- RATAJCZAK, J.; BRONCKAERS, A.; DILLEN, Y.; GERVOIS, P.; VANGANSEWINKEL, T.; DRIESEN, R. B.; WOLFS, E.; LAMBRICHTS, I.; HILKENS, P. The neurovascular properties of dental stem cells and their importance in dental tissue engineering. **Stem Cells International**, v. 2016,

p. 17, 2016.

RATAJCZAK, J., MIEKUS, K., KUCIA, M., ZHANG, J., RECA, R., DVORAK, P., AND RATAJCZAK, M. Z. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **Leukemia**, v. 20, p. 847-856, 2006.

ROCHE, S.; D'IPPOLITO, G.; GOMEZ, L. A.; BOUCKENOOGHE, T.; LEHMANN, S.; MONTERO-MENEI, C. N.; SCHILLER, P. C. Comparative analysis of protein expression of three stem cell populations: Models of cytokine delivery system in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, p. 72-82, 2013.

RUBIO, D., GARCIA, S., PAZ, M. F., DE LA CUEVA, T., LOPEZ-FERNANDEZ, L. A., LLOYD, A. C., GARCIA-CASTRO, J., BERNAD, A. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. **PLOS ONE**, v. 3, n. 1, 2008.

RUSTER, B.; GOTTIG, S.; LUDWIG, R. J.; BISTRAN, R.; MULLER, S.; SEIFRIED, E.; GILLE, J.; HENSCHLER, R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. **Blood**, v. 108, p. 3938-3944, 2006.

RYAN, J. M.; BARRY, F. P.; MURPHY, J. M.; MAHON, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **Journal of Inflammation**, v. 2, n. 8, 2005.

SALGADO, A. J.; REIS, R. L.; SOUSA, N. J.; GIMBLE, J. M. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 2, p. 103-110, 2010.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical applications for novel cell-based therapies. **Stem Cells**, v. 25, n. 4, p. 818-827, 2007.

SHAO, L.; ZHANG, Y.; LAN, B.; WANG, J.; ZHANG, Z.; ZHANG, L.; XIAO, P.; MENG, Q.; GENG, Y.; YU, X.; LI, Y. MiRNA-sequence indicates that mesenchymal stem cells and exosomes have similar mechanism to enhance cardiac repair. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 9, 2017.

SHARMA, A. K.; BURY, M. I.; FULLER, N. J.; MARKS, A. J.; KOLLHOFF, D. M.; RAO, M. V.; HOTA, P. V.; MATOKA, D. J.; EDASSERY, S. L.; THAKER, H.; SARWARK, J. F.; JANICKI, J. A.; AMEER, G. A.; CHENG, E. Y. Cotransplantation with specific populations of spina bifida bone marrow stem/progenitor cells enhances urinary bladder regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 10, p. 4003-4008, 2013.

SHENG, H., WANG, Y., JIN, Y., ZHANG, Q., ZHANG, Y., WANG, L., SHEN, B., YIN, S., LIU, W., CUI, L., LI, N. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. **Cell Research**, v. 18, p. 846-857, 2008.

SHIH, D. T.; LEE, D. C.; CHEN, S. C.; TSAI, R. Y.; HUANG, C. T.; TSAI, C. C.; SHEN, E. Y.; CHIU, W. T. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. **Stem Cells**, v. 23, n. 7, p. 1012-1020, 2005.

SIMPSON, R. J.; LIM, J.W.; MORITZ, R. L.; MATHIVANAN, S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. **Expert Review of Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 267-283, 2009.

SKALNIKOVA, H. K. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome.

Biochimie, v. 95, n. 12, p. 2196-221, 2013.

SKALNIKOVA, H.; MOTLIK, J.; GADHER, S. J.; KOVAROVA, H. Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. **Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 691-708, 2011.

SKOG, J., WÜRDINGER, T., VAN RIJN, S., MEIJER, D. H., GAINCHE, L., SENA-ESTEVEES, M., CURRY, W. T. JR., CARTER, B. S., KRICHEVSKY, A. M., AND BREAKEYFIELD, X. O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature Cell Biology**, v. 10, p. 1470-1476, 2008.

SOTIROPOULOU, P. A.; PEREZ, S. A.; SALAGIANNI, M.; BAXEVANIS, C. N.; PAPAMICHAIL, M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 2 p. 462-471, 2006.

STAGG, J., POMMEY, S., ELIOPOULOS, N., GALIPEAU, J. Interferon- γ -stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. **Blood**, v. 107, p. 2570-2577, 2006.

STASTNA, M.; VAN EYK, J. E. Investigating the secretome: Lessons about the cells that comprise the heart. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 5, p. 08-018, 2012.

TANG, Y. L.; ZHAO, Q.; QIN, X.; SHEN, L.; CHENG, L.; GE, J.; PHILLIPS, M. I. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 80, n. 1, p. 229-236, 2005.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. Repair processes in irradiated mouse hematopoietic tissue. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 114, p. 115-125, 1964.

TIMMERS, L.; LIM, S. K.; ARSLAN, F.; ARMSTRONG, J. S.; HOEFER, I. E.; DOEVENDANS, P. A.; PIEK, J. J.; EL OAKLEY, R. M.; CHOO, A.; LEE, C. N.; PASTERKAMP, G.; DE KLEIJN, D. P. V. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. **Stem Cell Research**, v. 1, n. 2, p. 129-137, 2007.

TOMA, C.; PITTENGER, M. F.; CAHILL, K. S.; BYRNE, B. J.; KESSLER, P. D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation**, v. 105, p. 93-98, 2002.

TOMA, C.; WAGNER, W. R.; BOWRY, S.; SCHWARTZ, A.; VILLANUEVA, F. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: In vivo observations of cell kinetics. **Circulation Research**, v. 104, n. 3, p. 398-402, 2009.

VALADI, H., EKSTRÖM, K., BOSSIOS, A., SJÖSTRAND, M., LEE, J. J., LÖTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, p. 654-659, 2007.

VILLARON, E. M.; ALMEIDA, J.; LOPEZ-HOLGADO, N.; ALCOCEBA, M.; SANCHEZ-ABARCA, L. I.; SANCHEZ-GUIJO, F. M.; ALBERCA, M.; PEREZ-SIMON, J. A.; SAN MIGUEL, J. F.; DEL CANIZO, M. C. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Haematologica**, v. 89, p. 1421-1427, 2004.

VILLATORO, A.J.; ALCOHOLADO, C.; MARTÍN-ASTORGA, M.C., FERNÁNDEZ, V.;

CIFUENTES, M.; BECERRA, J. Comparative analysis and characterization of soluble factors and exosomes from cultured adipose tissue and bone marrow mesenchymal stem cells in canine species. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 208, p. 6–15, 2019.

VIZOSO, F. J.; EIRO, N.; CID, S.; SCHNEIDER, J.; PEREZ-FERNANDEZ, R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1852, 2017.

WANG, M.; CRISOSTOMO, P. R.; HERRING, C.; MELDRUM, K. K.; MELDRUM, D. R. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 4, p. R880-R884, 2006.

WU, H. Y.; CHANG, Y. H.; CHANG, Y. C.; LIAO, P. C. Proteomics analysis of nasopharyngeal carcinoma cell secretome using a hollow fiber culture system and mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 1, p. 380-389, 2009.

YAMAMOTO, Y.; FUJITA, M.; TANAKA, Y.; KOJIMA, I.; KANATANI, Y.; ISHIHARA, M.; TACHIBANA, S. Low oxygen tension enhances proliferation and maintains stemness of adipose tissue-derived stromal cells. **Biological Research**, v. 2, p. 199-205, 2013.

YANG, D.; CHEN, Q.; HOOVER, D. M.; STALEY, P.; TUCKER, K. D.; LUBKOWSKI, J.; OPPENHEIM, J. J. Many chemokines including CCL20/MIP-3 α display antimicrobial activity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 3, p. 448-455, 2003.

YI, T.; SONG, S. U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, p. 213-221, 2012.

YOUN, S. W.; LEE, S. W.; LEE, J.; JEONG, H. K.; SUH, J. W.; YOON, C. H.; KANG, H. J.; KIM, H. Z.; KOH, G. Y.; OH, B. H.; PARK, Y. B.; KIM, H. S. Comp-Ang1 stimulates HIF-1 α -mediated SDF-1 overexpression and recovers ischemic injury through BM-derived progenitor cell recruitment. **Blood**, v. 117, p. 4376-4386, 2011.

ZAGOURA, D. S.; ROUBELAKIS, M. G.; BITSIKA, V.; TROHATOU, O.; PAPPAS, K. I.; KAPELOUZOU, A.; ANTSAKLIS, A.; ANAGNOU, N. P. Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure. **Gut**, v. 61, p. 894-906, 2012.

ZHENG, B.; CAO, B.; CRISAN, M.; SUN, B.; LI, G.; LOGAR, A.; YAP, S.; POLLETT, J. B.; DROWLEY, L.; CASSINO, T.; GHARAIBEH, B.; DEASY, B. M.; HUARD, J.; PÉAULT, B. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1025-1034, 2007.

ZHOU, B. R.; XU, Y.; GUO, S. L.; WANG, Y.; ZHU, F.; PERMATASARI, F.; WU, D.; YIN, Z. Q.; LUO, D. The effect of conditioned media of adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 9, 2013.

HIPOTESE

- A hipoxia e a falta de soro fetal bovino no cultivo celular *in vitro* modificam de forma distinta o secretoma produzido por AD-MSCs em caninos e felinos.

OBJETIVOS

- Identificar os efeitos da hipoxia e ausência de soro fetal bovino sobre o secretoma de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de cães e gatos.

- Analisar as principais diferenças ontológicas entre os distintos perfis proteômicos.

- Determinar as proteínas de maior relevância, analisar suas funções moleculares, processos biológicos e localizações sub-celulares, e estudar suas interações específicas fora do meio condicionado.

- Identificar o método de cultivo celular ideal para produzir o melhor meio condicionado em quantidade e importância proteica.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1

Artigo redirigido de acordo com as normas da revista Stem Cells Translational Medicine
<https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/21576580/about/information-for-authors>

Culture conditions modifies the secretome of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue in cats

María Laura Lara¹, Fabiana Ferreira de Souza¹, Rubia Alves Schmith¹, Viviane Maria Codognoto¹, Bruna De Vita¹, Camila de Paula Freitas¹, Marina Landim Alvarenga², Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga¹.

¹ Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, Brazil.

² Omics Animal Biotechnology, Botucatu, Brazil.

ABSTRACT

It is known that mesenchymal stromal cells (MSCs) exert therapeutic effects predominantly through their homing capacity and paracrine activity. As the secretome plays a direct role in the biological activities of MSCs, and the analysis of its proteic components is fundamental to identify the responsible actors of different biological processes. In the present study, besides describing for the first time the secretome of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue (AD-MSCs) in the feline species *Felis catus* in standard culture conditions, we identified and compared the effects exerted by different culture conditions, such as the use of serum-free medium and hypoxia, on AD-MSCs protein expression. Each type of culture environment influenced the MSCs in a unique way, modifying the secretome and producing distinct proteomic profiles. Secretomes cultured with serum-free medium had more than twice identified proteins when compared with secretomes cultured with FBS. 5% hypoxic conditions didn't cause any increase in protein amount and affected only a small fraction of the proteome. Most relevant proteins were related to ECM, having the capacity to modulate their environment, influencing cell signaling pathways and functions and also providing a more suitable environment for cell proliferation and

maintenance. Secretome as cell-free therapy, opens new therapeutic possibilities, being essential to continue investigating about diverse modifications that can be made in the conditioned media production to direct its use for different therapeutic and diagnostic targets.

Key words: MSCs, secretome, conditioned medium, serum-free, proteomic.

INTRODUCTION

Mesenchymal stromal cells, currently called medicinal signaling cells (MSCs) [1] play a key role in self-renewal of adult tissues throughout life [2]. It was initially thought that the therapeutic effects of transplanted MSCs were mediated by migration to the sites of injury, integration into damaged tissue, and differentiation into specialized cells, however, only a small proportion of MSCs actually graft and survive in the host damaged tissue. MSCs exert their therapeutic effects predominantly through their homing capacity and their paracrine activity [3,4]. MSCs conditioned medium and its proteomic profile, have become targets of intensive study in search for identification of proteins that regulates many biological processes and that are being used in regenerative medicine [5].

Because of its short lifetime inside the body, MSCs therapy does not allow a wide production of proteins within the organism, as it does in the direct application of conditioned medium, *in vitro* produced under controlled conditions. By using the conditioned medium in a clinical way, other advantages over the use of MSCs are known, such as the absence of immunological incompatibility, tumorigenicity, plunging, transmission of infections, as well as allowing their use with a precise dosage and being available for clinical application in an analogous way to conventional pharmaceutical agents [6,7].

MSCs biological product can be modified and improved *in vitro* by using specific stimuli which may increase particular proteins and cytokines expression in the culture medium, stimulating specific cellular effects desired for therapeutic applications [8–10]. A variety of stimuli and cell culture conditions have been studied, including cell culture under hypoxic conditions or serum deprivation, which increase the production of angiogenic growth factors and anti-inflammatory molecules, pro-inflammatory stimuli that induce

secretion of factors related to the immune system, three-dimensional cell growth which increases the production of antitumor and anti-inflammatory factors, and microparticle engineering [5,11].

In domestic animals therapy, adipose tissue is the most attractive source for isolation of MSCs, because of its easy tissue access, cell isolation simplicity, and higher yields after tissue processing when compared, for example, with MSCs derived from bone marrow [12]. Also, there has been a growing description of the trophic effects of MSCs derived from adipose tissue (AD-MSCs) on the protection, survival and differentiation of a variety of cells and tissues, effects closely related to their secretome and their soluble factors [13]. Although it is well known that the cell secretome is a valuable source for the discovery of biological products, therapeutic targets and biomarkers in various diseases, the paracrine profile of the conditioned medium by MSCs in veterinary patients and its clinical use have been very little studied [14][15]. In this research, besides describing feline AD-MSCs secretome in standard culture conditions, we also analyzed protein expression variations caused by specific culture conditions, and project these findings for its use in therapeutic applications.

MATERIALS AND METHODS

Animals and inclusion criteria

Samples were collected from 5 female feline donors, healthy and with less than 2 years of age. Each donor was clinically evaluated and underwent blood count and biochemical exams. Each feline AD-MSCs sample was tested by PCR for *Babesia spp.*, *Chlamydophila felis*, FIV, Felv, *Mycoplasma spp.*, and *Toxoplasma gondii*. The conditioned media were tested for bacterial and mycological culture. Thus, within the inclusion criteria of this study, only cell and conditioned media samples with negative results for all tests mentioned, were used. Experimental protocol number 0074/2018 was approved by the ethics and animal welfare committee and all procedures were carried out under its regulations.

AD-MSCs bank assembly

Adipose tissue (subcutaneous or intra-abdominal) was collected during the elective ovariohysterectomy of each donor and was taken to the laboratory for processing. The tissue was washed three times with Hank's balance salt solution (HBSS) containing 1% penicillin, 1.2% amphotericin (all from Gibco[®], NY, USA) and 0.04% amikacin (TEUTO, GO, Brazil), and was cut into fragments smaller than 1 mm³. The tissue was digested in HBSS with 0.04% collagenase from *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich[®], MO, USA), and was placed in a water bath at 37.5 °C for 30 min, under constant agitation. Samples were passed through 70 µm syringe driven filters (FALCON[®], NC, USA) and centrifuged at 340 g for 10 min 3 times. Pellet obtained after the third centrifugation was resuspended and cultured with Dulbecco's modified Eagle medium and F-12 nutrient mixture (DMEM / F-12 – Gibco[®], NY, USA) containing 20% FBS (Gibco[®], Brazil), 1% penicillin, 1.2% amphotericin, and 0.04% amikacin, in duplicate using 25 cm² flasks (SARSTEDT[®], Nümbrecht, Germany) maintained at 37.5 °C with 5% CO₂. The culture medium was changed every 48 h until cells achieved 80% confluence, in order to carry out the first cell passage to 75 cm² flasks, maintaining the same culture conditions. Cells were frozen to form part of the MSCs bank when the second passage achieved 80% confluence. Cell counting and viability was performed in a Neubauer chamber with Tripzan Blue (Gibco[®], NY, USA) and they were

frozen in cryotubes with 3×10^6 cells, using cryopreservation medium composed of 90% FBS and 10% dimethyl sulphoxide (DMSO - Sigma-Aldrich[®], MO, USA). The cryotubes were frozen at -80 °C, placed in a commercial freezing container (Mr. Frosty, NALGENE[®], MA, USA) for the first 24 h.

Assay for cellular differentiation into mesodermal lineage

For osteogenic/adipogenic differentiation second passage AD-MSCs were seeded in six-well plates with maintenance medium. After 48 h incubation, the medium was replaced with STEMPRO (Thermo Fisher Scientific[®], MA, USA) osteogenic or adipogenic differentiation medium supplemented with 20% FBS according to the manufacturer's recommendations. Differentiation medium was changed every 2 to 3 days and confirmation of osteogenic and adipogenic differentiation were confirmed according to Maia et al. [16], respectively, by the observation of calcified extracellular matrix deposits using 2% Alizarin red staining, pH 4.2, and the presence of intracytoplasmic lipids droplets using 0.5% Oil Red O (both from Sigma-Aldrich[®], MO, USA).

Immunophenotypic analysis

Immunophenotypic analysis was performed according to the method described by Maia et al. [16] with modifications. Characterization was performed using a LSRFortessa flow cytometer (Becton Dickinson and Company[®], NC, USA) with monoclonal antibodies CD44 (AbD Serotec[®], CA, USA), CD90 (eBioscience[®], MA, USA), CD105 (Biorbyt[®], CA, USA), CD34 (AbD Serotec[®], CA, USA) and MHC class II (AbD Serotec[®], CA, USA). During the analyses, 10.000 events were recorded. The results were presented as the mean and standard error of the mean.

Conditioned media production and preparation

Samples were used in third passage to ensure a homogenous cell culture, maintain a similar state of indifferentiation, and to avoid interference outside the culture conditions. A cryotube from each cell sample was thawed and cultured in 4 - 75 cm² flasks in order to use one of them for each group (Table 1). Cell cultures were performed with an initial mean of 4×10^5

MSCs, viability of 52.4%, and cell concentration of 5,300 cells/ cm². Cell cultures were performed at 37.5 °C with 5% CO₂ with DMEM/F-12 medium with 20% FBS changed every 48 h. When cells achieved 80% confluence, the culture media were removed and the flasks were washed 3 times with HBSS for the complete removal of FBS and phenol red from culture medium.

Cells were cultured in different environmental conditions, taking into account oxygen concentration (O₂), and FBS presence or absence (Table 1).

Table 1. Characterization of each study group, indicating the variations in cell culture conditions.

Study group	Culture conditions characterization
N + FBS	Normoxia with FBS: Control group, cultured with 9 ml of DMEM / F-12 medium, 20% FBS, at 37.5 °C with 5% CO ₂ in air.
H + FBS	Hypoxia with FBS: Cultured with 9 ml of DMEM / F12 medium, 20% FBS, at 37.5 °C with 5% CO ₂ , 5% O ₂ and 90% N ₂ .
N - FBS	Normoxia without FBS: Cultured with 9 ml of DMEM / F12 medium without FBS at 37.5 °C with 5% CO ₂ in air.
H - FBS	Hypoxia without FBS: Cultured with 9 ml of DMEM / F12 medium without FBS at 37.5 °C with 5% CO ₂ , 5% O ₂ and 90% N ₂ .

Cells were maintained under the described conditions for the next 4 days and then the conditioned media were collected, centrifuged at 900 g for 10 min, filtered through a 0.22 µm filtration unit (KASVI[®], PR, Brazil), and stored at -80 °C until its next processing.

Conditioned media were thawed, and a 20 mL pool, containing the same volume of each sample, was prepared for each study group (n= 5). To extract the proteins contained into the extracellular vesicles, the pools were placed in ice bath and sonicated (BRANSON[®], NH, USA) in 10 intervals of 30 s separated by 1 min between each.

Samples were concentrated using Amicon centrifugal filters (Sigma-Aldrich[®], MO, USA) with a 3kDa molecular weight cut-off, centrifuged at 7,500 g for 40 min. The reduced volumes were collected and centrifuged a second time at 10,000 g for 60 min because of the

low protein concentration obtained. Concentrated samples were placed in 1.5 mL Protein LoBind microtubes (Eppendorf[®], Germany) and frozen at -80 °C. Total protein measurement was performed on a NanoDrop 2000 equipment, confirmed by SDS PAGE 1D electrophoresis using the protocol established by Laemmli [17] with gel at 12% concentration stained with silver dye. In samples cultured with the presence of FBS, albumin depletion was performed using the protocol established by Colantonio et al. [18].

Proteomic Strategies

Digestion in solution of cellular secretomes was performed in triplicate using the protocols and procedures previously described by Codognoto et al. [19]. For the MS, the samples were thawed, diluted in 0.1% formic acid in a relation of 0.66 µg protein/µL, homogenized in a tube shaker and centrifuged at 1,100 g for 5 min. Next, aliquots of 10 - 15 µL resulting from the peptides digestion were deposited in screw neck total recovery vials with cap (Waters Corporation[®], MA, USA) where another 4.5 µL aliquot was separated by a C18 column RP-nano UPLC (Waters Corporation[®], MA, USA) coupled to a Q-ToF mass spectrometer (Waters Corporation[®], MA, USA) with nanoelectrospray source at a flow rate of 0.600 µL/min. A gradient of 2-90% acetonitrile in 0.1% formic acid was maintained for 45 min. The nanoelectrospray voltage was maintained at 3.5 kV, a cone voltage of 30 V and a source temperature of 100 µC. The instrument was operated in top three mode in which a mass spectrum is acquired followed by MS/MS of the three most intense peaks detected. After MS/MS fragmentation, the ion was maintained in the exclusion lane for 60 seconds and for the analysis of endogenous cleavage peptides, a real exclusion time was used. The spectra were acquired using MassLynx software v.4.1 (Waters Corporation[®], MA, USA) and the raw data files were converted to a peak list format (.mgf, mascot generic format). The relative quantification of each protein in the mixture was determined by the exponentially modified protein abundance index (emPAI) obtained by Mascot Distiller software. Search parameters included trypsin as protease, with a maximum of 1 lost cleavage; carbamidomethylation of cysteine as fixed modification and oxidation of methionine as a variable modification, and a tolerance of 0.1 Da for both ions precursors and fragments, and molecular weight monoisotope.

Data analysis

Distribution of the variables in the statistical analysis of the cell culture after 4 days of conditioning was evaluated by graphical analysis (Histogram and QQ Plot) and normality tests (Shapiro-Wilk). Friedman's test and Dunn's test were used to compare the variables between the groups. Analyses were conducted in GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, 2007), and statistical differences were considered when $P < 0.05$.

Mascot Software (Matrix Science Inc[®], MA, USA) was used to search for MS / MS ions with *Felis catus* taxonomy order from the NCBI database. The Mascot results were submitted to the Protein Pilot Software 4.0 program (AB Sciex[®], MA, USA) to perform the data set analysis to validate MS / MS base peptides and protein identification. By the Venn diagram web tool facilitated by Bioinformatics & Systems Biology, the protein intersections between the secretomes were analyzed. The protein identification results were entered in the UniprotKB (www.uniprot.org.br) and Panther (www.pantherdb.org) databases, to analyze them by their gene ontology (GO) taking into account their molecular function, biological process and cellular component. The protein interactions networks within each secretome were performed with String 11.0 online software (www.string-db.org).

For data normalization, the proteins that were not found in at least half of the samples of the evaluated groups were excluded, and made the variables more comparable in order to obtain better results. Sum of the protein abundance emPAI value of each sample was divided by the total protein count and the final result was used for the statistical analysis [20]. The MetaboAnalyst R software [21] was used to perform a non-hierarchical clustering analysis, to confirm the groups division considering the emPAI values of each protein. The multivariate analysis of the proteomic data was performed with the same software, using principal component analysis (PCA) to describe the group variations and the partial least squares - discriminant analysis (PLS-DA) was used to indicate the importance of proteins in each group classification, indicating its value and importance in the VIP projection score, where important proteins were considered with a value of $\alpha \geq 1$ [22]. Heat map was used to compare the proteins and their expression in the groups.

The proteins that were determined as the most significant in the global analysis were characterized individually by determining their molecular function, biological process and subcellular localization, as well as being analyzed by the Panther Classification System, String 11.0 and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) software, in order to determine its functions, interactions and participation in biological pathways, but in an independent way, in order to know its functioning not only in relation to other secretome proteins, but also in processes and pathways in which they are physiologically and pathologically involved.

RESULTS

MSC lineage confirmation

Only samples that presented high expression of CD 44 (90% or higher) and low expression of CD 34 and MHC II (below 10%) and positive differentiation for adipogenic and osteogenic lineage were used. The expression of CD 90 and CD 105 was variable among donors in a range between 30 and 50%.

Cell expansion and viability

Cell cultures maintained for 4 days to produce the conditioned media did not show statistical difference in unattached cells and cell viability, but cell confluence and number of resulting living cells were influenced by culture conditions (Table 2).

Table 2. Statistical analysis from feline MSCs samples including cellular confluence, subjective measurement of unattached cells, number of living cells and cell viability after 96 hours of conditioned culture.

Group	Confluence	Unattached cells	Number of cells	Viability
N + FBS	100% ^a	2.2	2.35x10 ⁶ ^{ab}	64.1%
H + FBS	93% ^{ab}	2.4	2.01x10 ⁶ ^a	60.3%
N - FBS	56% ^{ab}	3	0.62x10 ⁶ ^b	72.7%
H - FBS	54% ^b	3	0.67x10 ⁶ ^{ab}	68.9%

Different letters (a, b, c) indicates statistical difference ($p < 0.05$).

After protein concentration, it was obtained a volume reduction between 96.1 and 98.9 %.

MS and data analysis

Proteomics identified 93 proteins for *Felis catus* species (Table S1), of which 25 proteins were found in the N+FBS group, 20 in the H+FBS group, 57 in the N-FBS group, 56 in the H-FBS group and 5 were expressed in all groups evaluated.(Figure 1).

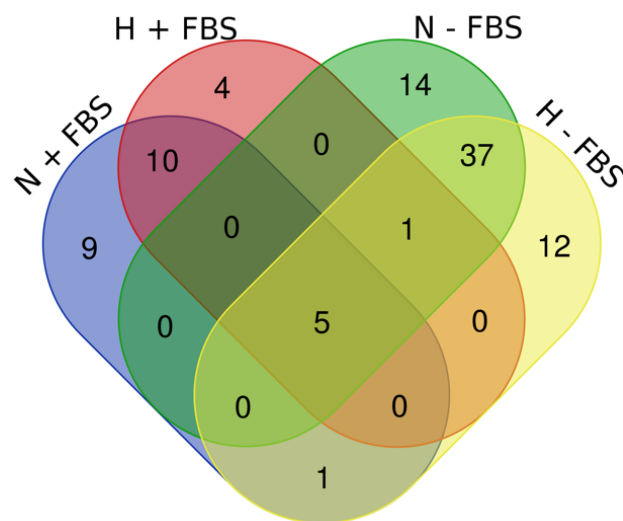


Figure 1. Venn diagram of proteins identified in conditioned media from feline AD-MSCs, showing the amount of proteins found in each group, and the amount shared between them.

The GO results of the secretomes are described by molecular function, biological process and cellular component (Figure S1 - S3). The protein interactions networks show the difference between the protein connections in the different secretomes (Figure S4).

PCA analysis confirmed the groups division according to the variables present in each one of them. The sum of the principal components was 89.4%, which confirm the accuracy of the division of the groups. Dendrogram shows the same separation tendency between the groups and between their replicates (Figure 2).

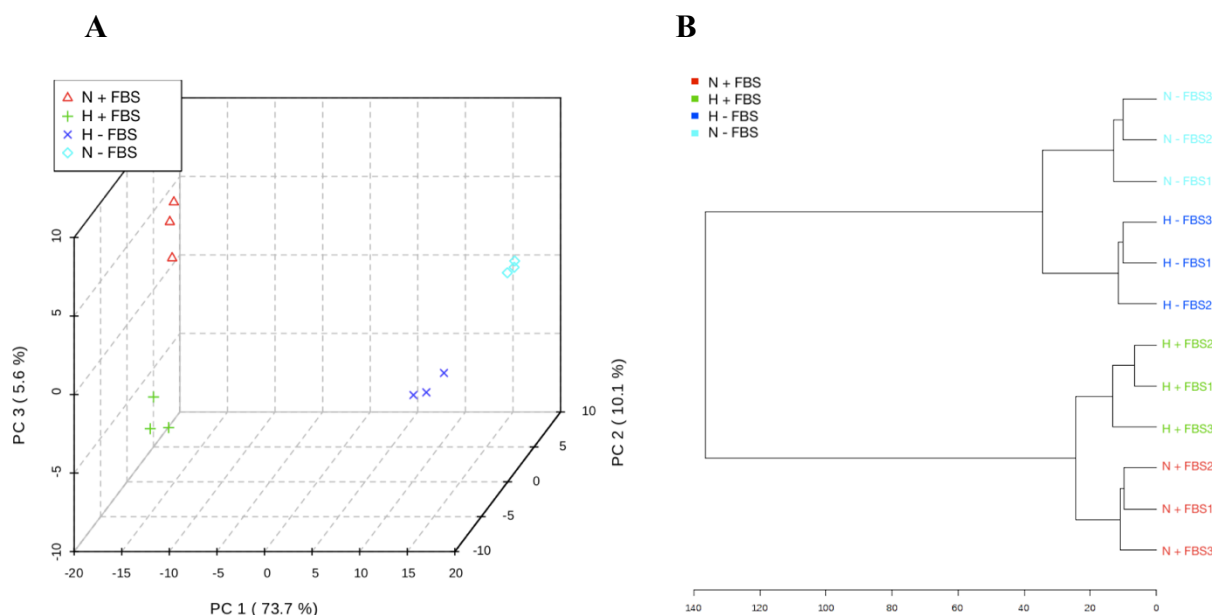


Figure 2. Statistical group division according to presented variables. A) 3D score plot of the principal component analysis (PCA). PC1, PC2 and PC3 indicate the variations between groups ($73.7\% + 10.1\% + 5.6\% = 89.4\%$) and confirm their division. Note the distance measure of clusters. B) Clustering results shown as dendrogram, confirming the PCA results and the division of the groups.

The PLS-DA analysis determined 15 proteins as relevant, which are alpha 2-HS glycoprotein (AHSG), biglycan (BGN), cystatin (CST3), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), c-type lectin domain family 3 member B (CLEC3B), actin gamma 1 (ACTG1), phosphoglycerate mutase (PGAM1), TIMP metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2), profilin (PFN1), secreted protein acidic and cysteine rich (SPARC), triosephosphate isomerase (TPI1), nucleophosmin 1 (NPM1), decorin (DCN), cathepsin B (CTSB), and 1 uncharacterized protein (Figure 3). 7 of the most relevant proteins were identified in higher concentration in the H-FBS group, 6 in the N-FBS group, and 2 in the N + FBS group.

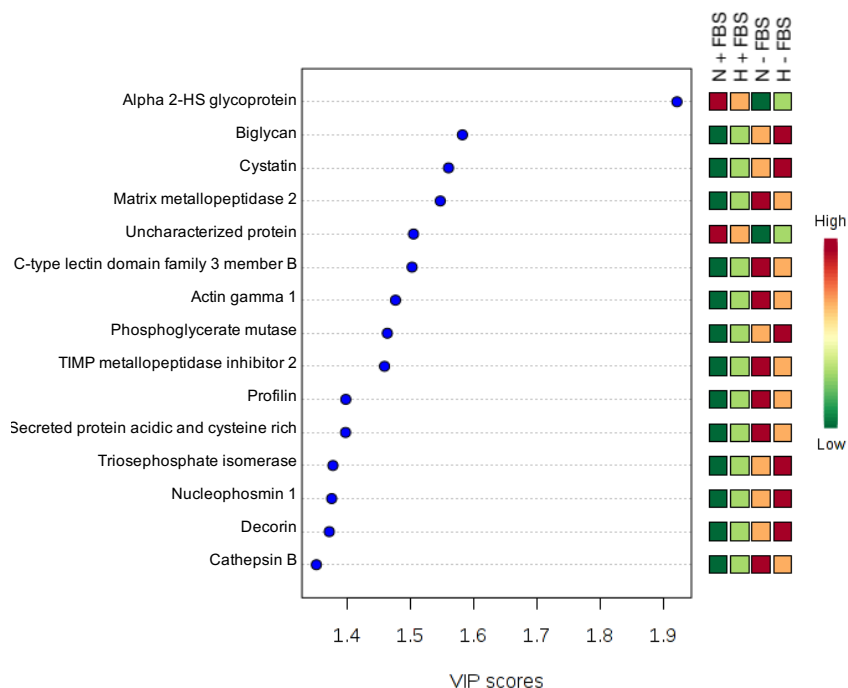


Figure 3. PLS-DA discrimination analysis indicates the importance of proteins in each group classification, with their value projected in the Variable Importance in Projection (VIP) score plot. The VIP score limit was established as ≥ 1 ($\alpha \geq 1$), where samples were within the range of 1.4 to 1.9. The colored boxes indicate the corresponding relative protein concentrations in each study group.

The most relevant proteins also were described by gene, molecular function, biological process and subcellular localization (Table S2). Heat map shows a general perspective about each protein abundance in each one of the groups and their replicates (Figure S5), evidencing a main division within it, caused by the FBS variable.

DISCUSSION

Characterization of cellular secretome *in vivo* is a difficult procedure. Then, a common approach is the analysis of the media conditioned by cell culture. This *in vitro* model assumes that protein secretion will be driven by different stimulus to which cells will be subjected during culture [23]. It was already described that serum starvation stops cell proliferation and increases cell death [24,25]. In the present experiment, after 4 days in culture with serum-free media, AD-MSCs presented a reduced growth rate, with low confluence index and fewer living cells in culture. However, there was no difference in cell viability, indicating that although the groups cultured with serum-free medium had fewer cells, those that were present, were viable.

Clearly protein profiles underwent a division within the groups caused by the variable of FBS, being that secretomes cultured with serum-free medium had more than twice identified proteins when compared with secretomes cultured with FBS [23]. This difference in identified proteins between profiles could be caused by a true increase in protein amount because of different environmental pre-conditions, but also by the presence of highly abundant proteins in the FBS, which often mask less abundant proteins secreted by the MSCs, hiding their identification by MS [26–28].

In hypoxic states, the cell quickly enters in a metabolic crisis state, which requires a change in the cellular metabolic strategy to facilitate its entry into an adaptive state that supports cell survival [29]. One of the relevant factors of MSCs for therapeutic development is their anti-inflammatory and immune modulating properties, and it has been shown that hypoxia benefits the production and secretion of a greater number of trophic factors, increasing angiogenic effects and the immunomodulation activity [30–34]. As MSCs tend to be found in hypoxic areas of the body [35,36], *in vitro* hypoxia also reinforces the regenerative potential and survival of MSC and retains their undifferentiated phenotype, which allows self-renewal without differentiation [33]. In the present study, oxidative stress does not seem to affect cell proliferation since hypoxia caused no changes in cell growth or viability. Also no increase in protein abundance was evidenced, agreeing with the fact that 5% O₂ hypoxic conditions in AD-MSCs culture affect only a small fraction of the proteome, and does not seem to greatly affect protein secretion [37,38]. As AD-MSCs secretome have been

very little studied in veterinary patients, investigating the different proteomic profiles that can be produced, and focusing its study and production for clinical use, encourage the scientific community to continue investigating the secretomic variations caused by the different oxygen tensions in addition to other forms of AD-MCSs culture conditions.

Within the analyzed secretomic profiles, most proteins that compound felines AD-MSCs secretome have not been yet characterized in the UniProt database for the *Felis catus* species. Most of them were described and named in this study (Table S2), nevertheless, there are still some proteins that need to be described.

The GO analyses confirmed differences between groups cultivated with and without FBS. The predominant molecular functions in all groups were binding and catalytic activity. Moreover, most relevant proteins were found only in serum-free groups. One molecular function in groups conditioned with FBS was transport, including AQP7 as the predominant protein responsible of water channels activity, glycerol and membrane transport. On the other hand, the groups conditioned with serum-free medium presented molecular functions as transcriptional regulatory activity and structural molecular activity where ACTG1, a structural constituent of the cytoskeleton, was found as a relevant protein. The predominant biological process of the groups conditioned with FBS was the metabolic process. In serum-free groups, the predominant biological process was the cellular process, and they also presented biological processes as immune system process, composed of an uncharacterized protein (PRDX1) responsible for cellular catabolic process, homeostasis, response to oxidative stress, activation of leukocytes, erythrocyte homeostasis, reactive oxygen metabolic process and activation of natural killer cells. The same serum-free groups also present a higher percentage in response to stimulus function, which were found relevant proteins such as MMP2 responding to hypoxia, and TIMP2 responding to hormones and cytokines. The presence of proteins with those biological processes indicate that feline AD-MSCs secretome produced in serum starvation may also have higher immunomodulation properties when compared to the ones cultured in presence of FBS.

By confirming the groups division according to the presented variables, we can say that proteins that were produced in each type of conditioned media and their concentration (emPAI value) classify each group separately, confirming that each type of culture

environment influences the MSCs in a unique way, modifying the secretome and producing distinct proteomic profiles.

Most relevant proteins were related to the extracellular matrix (ECM), cell adhesion, cell migration and morphogenesis. In the body, MSCs are in constant contact with the ECM, which serves not only as a structural support, but as a reservoir of many biochemical and mechanical signals that are transduced for interactions, influencing cell signaling pathways and functions [39,40]. In the cell niche, cell-ECM interactions influence and modulate MSCs self-renewal and differentiation [41–43]. *In vitro*, MSCs interact with the plastic culture surface and produce ECM and cell adhesion proteins, that surround cells and create niche-like areas to provide a more suitable environment for cell proliferation and maintenance [40,44] [45]. One of those proteins is SPARC, a Ca²⁺ binding glycoprotein that influences bone formation, maintenance and repair, through the regulation of the procollagen processing and assembly in the bone matrix, and the regulation of osteoblasts and osteoclasts mineralization, differentiation and activity [46] [47]. In non-mineralized tissues, SPARC, as well as DCN, has been implicated as a significant contributor to fibrotic diseases, in addition to regulating the activity of growth factors that are important for vascular homeostasis [48][49]. Normally, the expression of SPARC is closely aligned with the one of fibrillar collagens, as collagen I, III and V, involving SPARC in the assembly of the ECM [47,50].

Other abundant proteins identified in the groups cultured with serum-free medium, were DCN and BGN, members of the small leucine-rich proteoglycans family and JAK-STAT negative regulators. Due to its extensive links repertoire to the ECM components, growth factors and cell surface receptors, DCN and BGN can be considered "the guardians and orchestrators of the matrix" [51,52]. One of DCN main characteristics is its antifibrotic capacity, which is why it has become a target of approach to treat different diseases. It also inhibits the expression of proinflammatory cytokines and increases the expression of anti-inflammatory cytokines to improve the MSCs functions [53]. BGN acts in the regulation of the inflammatory response reaction, takes place in the innate immune system acting on the links between the innate and adaptive immune systems, and as an endogenous ligand of the of innate immunity receptors in macrophages [54–56]. The JAK-STAT pathway plays a major role in cytokine receptor signaling during immune response and also can promote cell

differentiation. The presence of DCN and BGN, associated with the high abundance of ECM proteins may indicate that under serum-free culture conditions, AD-MSCs produce high amounts of proteins that are relevant for immunomodulation and tissue regeneration. In fact, future studies related to the intricate interactions between BGN and innate immunity receptors, would reveal significant perspectives for the development of new drugs for the treatment of inflammatory diseases [51].

ACTG1, a non-characterized protein in felines, is part of the cellular cytoskeleton, participates in signal transduction regulation, protein transport and signal compartmentation, and can undergo reorganization in response to its microenvironment [58]. Once the actin is within the nucleus, it can be found in filamentous forms [59,60], contributing to physiological events to control the MSCs differentiation [61]. The formation of intranuclear actin filaments coincides with osteogenic gene expression, resulting in an onset and acceleration of the MSCs entry into the osteogenic lineage [58]. It has been suggested that a greater cytoskeletal structure due to the increase of actin stress fibers will increase the differentiation towards an osteoblastic lineage and prevent the adipogenic differentiation [42,62]. On the other hand, intranuclear actin can directly affect the nuclear stiffness and structure [63] modulating gene expression and transcription [61,64,65] by increasing RNA polymerase and regulating heterochromatin location [66]. Actin is critical for cell division and mobility, and it has also been shown that its dynamic polymerization regulates the density of incoming signals [67,68] and refines specific aspects of signal transduction [69]. These results support the hypothesis that serum starvation induce feline AD-MSCs to produce proteins important for cell proliferation and tissue regeneration.

On the contrary, those same proteins were less abundant in cultures with FBS. In these same groups, more abundant proteins were AHSN and an uncharacterized protein (AQP7), responsible of water channels activity, glycerol and membrane transport. The main physiological function of AHSN is bone remodeling and the inhibition of unwanted ectopic calcification [70]. AHSN blocks osteogenic signaling pathways by binding to TGF- β and BMPs related to TGF- β , inhibiting angiogenesis and osteogenic differentiation of MSCs [71]. AHSN can stabilize matrix metalloproteinases and prevent their degradation by autolysis [72]. It is also associated with brain development and immune function, acting as an anti-

inflammatory mediator that participates in the apoptosis inhibition of vascular smooth muscle cells and increasing the immune response [73]. The expression level of AHSG can significantly alter the TGF- β signaling in tumor cells, and promotes the progression and tumorigenesis of different types of cancer affecting molecular determinants of tumor progression including proliferation, migration and invasion [74,75] [76].

Among the differences between serum-free medium groups, the group cultured under hypoxia conditions presented even more ECM proteins and actin filament binding proteins, components of the cytoskeleton. In addition, we must remember that this group presented the greatest expression of the most important proteins in proteic profiles. The group cultured under normoxic conditions, presented more binding proteins with intracellular functions such as ATP binding, cell division, DNA repair (SMC1A) , nucleosomal DNA binding (LOC101085738) , positive regulation of intracellular protein transport (ICE1), apoptotic process and cell division (BIRC6). These results indicate that the group cultured with serum-free serum in hypoxic conditions, has a greater capacity to regulate biochemical and mechanical signals, influencing cell signaling pathways and functions for more suitable environment for cell proliferation and maintenance.

The heat map confirms the division of the groups mainly by the variable of the FBS, being the groups cultured with FBS similar between them, and differentiating from the groups cultivated with serum-free medium. It becomes clear how FBS causes AD-MSCs to produce completely different proteomic profiles, sharing only 5 proteins between all groups.

CONCLUSION

Proteomics identified 93 proteins for *Felis catus* species, of which 25 proteins were found in the N+FBS group, 20 in the H+FBS group, 57 in the N-FBS group, 56 in the H-FBS group and only 5 were expressed in all groups evaluated. Clearly protein profiles underwent a division caused by the variable of FBS, being that secretomes cultured with serum-free medium had more than twice identified proteins when compared with secretomes cultured with FBS. Since 5% O₂ hypoxic conditions didn't cause any increase in protein amount and affected only a small fraction of the proteome, it urges us to continue investigating the secretomic variations caused by different oxygen tensions in addition to other forms of MSCs culture conditions in domestic animals, with the aim of projecting the results for their clinical use.

The PSA analysis and the dendrogram confirm that each type of culture environment influences the MSCs in a unique way, modifying the secretome and producing distinct proteomic profiles. The PLS-DA analysis determined 15 proteins as relevant, which are AHSG, BGN, CST3, MMP2, CLEC3B, ACTG1, PGAM1, TIMP2, PFN1, SPARC, TPI1, NPM1, DCN, CTSB and AQP7. Most relevant proteins were related to ECM, that serves not only as a structural support, but as a reservoir of many biochemical and mechanical signals, influencing cell signaling pathways and functions and providing a more suitable environment for cell proliferation and maintenance. The presence of DCN and BGN, associated with the high abundance of ECM proteins may indicate that under serum-free culture conditions, AD-MSCs produce high amounts of relevant proteins for immunomodulation and tissue regeneration. Most relevant proteins were greatest expressed on serum-free and hypoxic conditions group, the same group that presented more ECM proteins. These characteristics make this group ideal for use as cell-free therapy because of its unique capacities of regulating ECM, immunomodulation, tissue regeneration, cell proliferation and maintenance.

REFERENCES

- 1 Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med* 2017;6:1445–1451.
- 2 Humphreys BD, Bonventre J V. Mesenchymal Stem Cells in Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med* 2008;59:311–325.
- 3 Lai RC, Tan SS, Teh BJ, et al. Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome. *Int J Proteomics* 2012;2012:14.
- 4 Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front Physiol* 2012;3:359.
- 5 Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* 2013;95:2196–2211.
- 6 Eiró N, Sendon-Lago J, Seoane S, et al. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget* 2014;5:10692–10708.
- 7 Bermudez MA, Sendon-Lago J, Seoane S, et al. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Exp Eye Res* 2016;149:84–92.
- 8 Lee MJ, Kim J, Kim MY, et al. Proteomic Analysis of Tumor Necrosis Factor- α -Induced Secretome of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Proteome Res* 2010;9:1754–1762.
- 9 Wang M, Crisostomo PR, Herring C, et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2006;291:R880–R884.
- 10 Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 2007;212:702–709.
- 11 Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci* 2017;18:1852.
- 12 Schäffler A, Büchler C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells-Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells* 2007;25:818–827.
- 13 Salgado AJBOG, Reis RLG, Sousa NJC, et al. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010;5:103–110.
- 14 Brown KJ, Formolo CA, Seol H, et al. Advances in the proteomic investigation of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics* 2012;9:337–345.
- 15 Harman RM, Yang S, He MK, et al. Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:157.
- 16 Maia L, Landim-Alvarenga FC, Da Mota LSLS, et al. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. *Microsc Res Tech* 2013;76:618–

- 624.
- 17 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.
 - 18 Colantonio DA, Dunkinson C, Bovenkamp DE, et al. Effective removal of albumin from serum. *Proteomics* 2005;5:3831–3835.
 - 19 Codognoto VM, Yamada PH, Schmith RA, et al. Functional insights into the role of seminal plasma proteins on sperm motility of buffalo. *Anim Reprod Sci* 2018;195:251–258.
 - 20 Cabrera T, Ramires-Neto C, Belaz KRA, et al. Influence of spermatozoal lipidomic profile on the cryoresistance of frozen spermatozoa from stallions. *Theriogenology* 2018;108:161–166.
 - 21 Chong J, Soufan O, Li C, et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res* 2018;46:W486–W494.
 - 22 Checa A, Bedia C, Jaumot J. Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. *Anal Chim Acta* 2015;885:1–16.
 - 23 Nonnis S, Maffioli E, Zanotti L, et al. Effect of fetal bovine serum in culture media on MS analysis of mesenchymal stromal cells secretome. *EuPA Open Proteomics* 2016;10:28–30.
 - 24 COOPER S. Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points. *FASEB J* 2003;17:333–340.
 - 25 Shin J-S, Hong S-W, Lee S-LO, et al. Serum starvation induces G1 arrest through suppression of Skp2-CDK2 and CDK4 in SK-OV-3 cells. *Int J Oncol* 2008;32:435–439.
 - 26 Finoulst I, Vink P, Rovers E, et al. Identification of low abundant secreted proteins and peptides from primary culture supernatants of human T-cells. *J Proteomics* 2011;75:23–33.
 - 27 Colzani M, Waridel P, Laurent J, et al. Metabolic Labeling and Protein Linearization Technology Allow the Study of Proteins Secreted by Cultured Cells in Serum-Containing Media. *J Proteome Res* 2009;8:4779–4788.
 - 28 Pellitteri-Hahn MC, Warren MC, Didier DN, et al. Improved Mass Spectrometric Proteomic Profiling of the Secretome of Rat Vascular Endothelial Cells. *J Proteome Res* 2006;5:2861–2864.
 - 29 Taylor CT. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem J* 2008;409:19–26.
 - 30 Efimenko A, Starostina E, Kalinina N, et al. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *J Transl Med* 2011;9:10.
 - 31 Roemeling-van Rhijn M, Mensah FKF, Korevaar SS, et al. Effects of Hypoxia on the Immunomodulatory Properties of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem cells. *Front Immunol* 2013;4:203.
 - 32 Huang W-H, Chen H-L, Huang P-H, et al. Hypoxic mesenchymal stem cells engraft and ameliorate limb ischaemia in allogeneic recipients. *Cardiovasc Res* 2014;101:266–276.
 - 33 Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* 2014;12:260.
 - 34 Pawitan JA. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine.

- Biomed Res Int 2014;2014:1–14.
- 35 Hawkins KE, Sharp T V, McKay TR. The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. *Regen Med* 2013;8:771–782.
- 36 Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, et al. Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. *Sci World J* 2013;2013:1–12.
- 37 Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:221.
- 38 Riis S, Stensballe A, Emmersen J, et al. Mass spectrometry analysis of adipose-derived stem cells reveals a significant effect of hypoxia on pathways regulating extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther* 2016;7:52.
- 39 Ragelle H, Naba A, Larson BL, et al. Comprehensive proteomic characterization of stem cell-derived extracellular matrices. *Biomaterials* 2017;128:147–159.
- 40 Hynes RO. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* (80-) 2009;326:1216–1219.
- 41 Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol* 2014;32:795–803.
- 42 Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 2006;126:677–689.
- 43 Watt FM, Huck WTS. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:467–473.
- 44 Sainio A, Järveläinen H. Extracellular matrix macromolecules: potential tools and targets in cancer gene therapy. *Mol Cell Ther* 2014;2:14.
- 45 Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV, et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:53.
- 46 Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* 2001;19:816–827.
- 47 Rosset EM, Bradshaw AD. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biol* 2016;52–54:78–87.
- 48 Eyre DR, Paz MA, Gallop PM. Cross-Linking in Collagen and Elastin. *Annu Rev Biochem* 1984;53:717–748.
- 49 Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, et al. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:1281–1285.
- 50 Bradshaw AD. The Extracellular Matrix. *Encycl. Cell Biol.*, 2015:694–703.
- 51 Nastase M V, Young MF, Schaefer L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J Histochem Cytochem* 2012;60:963–975.
- 52 Neill T, Schaefer L, Iozzo R V. Decorin. *Am J Pathol* 2012;181:380–387.
- 53 Liu D, Kong F, Yuan Y, et al. Decorin-Modified Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Attenuate Radiation-Induced Lung Injuries via Regulating Inflammation, Fibrotic Factors, and Immune Responses. *Int J Radiat Oncol* 2018;101:945–956.
- 54 Schaefer L, Babelova A, Kiss E, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J*

- Clin Invest 2005;115:2223–2233.
- 55 Moreth K, Brodbeck R, Babelova A, et al. The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis. J Clin Invest 2010;120:4251–4272.
- 56 Popovic Z V., Wang S, Papatriantafyllou M, et al. The Proteoglycan Biglycan Enhances Antigen-Specific T Cell Activation Potentially via MyD88 and TRIF Pathways and Triggers Autoimmune Perimyocarditis. J Immunol 2011;187:6217–6226.
- 57 Brandan E, Cabello-Verrugio C, Vial C. Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy. Matrix Biol 2008;27:700–708.
- 58 Sen B, Xie Z, Uzer G, et al. Intranuclear Actin Regulates Osteogenesis. Stem Cells 2015;33:3065–3076.
- 59 Belin BJ, Cimini BA, Blackburn EH, et al. Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei. Mol Biol Cell 2013;24:982–994.
- 60 Baarlink C, Wang H, Grosse R. Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL. Science (80-) 2013;340:864–867.
- 61 Sen B, Uzer G, Samsonraj RM, et al. Intranuclear Actin Structure Modulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation. Stem Cells 2017;35:1624–1635.
- 62 McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. Dev Cell 2004;6:483–495.
- 63 Friedl P, Wolf K, Lammerding J. Nuclear mechanics during cell migration. Curr Opin Cell Biol 2011;23:55–64.
- 64 Kapoor P, Chen M, Winkler DD, et al. Evidence for monomeric actin function in INO80 chromatin remodeling. Nat Struct Mol Biol 2013;20:426–432.
- 65 Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B, et al. Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL. Science (80-) 2007;316:1749–1752.
- 66 Ramdas NM, Shivashankar GV. Cytoskeletal Control of Nuclear Morphology and Chromatin Organization. J Mol Biol 2015;427:695–706.
- 67 Sen B, Guilluy C, Xie Z, et al. Mechanically Induced Focal Adhesion Assembly Amplifies Anti-Adipogenic Pathways in Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells 2011;29:1829–1836.
- 68 Sen B, Xie Z, Case N, et al. Mechanical signal influence on mesenchymal stem cell fate is enhanced by incorporation of refractory periods into the loading regimen. J Biomech 2011;44:593–599.
- 69 Salaita K, Nair PM, Petit RS, et al. Restriction of Receptor Movement Alters Cellular Response: Physical Force Sensing by EphA2. Science (80-) 2010;327:1380–1385.
- 70 Osawa M, Umetsu K, Ohki T, et al. Molecular evidence for human alpha 2-HS glycoprotein (AHSG) polymorphism. Hum Genet 1997;99:18–21.
- 71 Swallow CJ, Partridge EA, Macmillan JC, et al. α 2HS-glycoprotein, an Antagonist of Transforming Growth Factor β *In vivo* , Inhibits Intestinal Tumor Progression. Cancer Res 2004;64:6402–6409.
- 72 Ray S, Lukyanov P, Ochieng J. Members of the cystatin superfamily interact with MMP-9 and protect it from autolytic degradation without affecting its gelatinolytic activities. Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics 2003;1652:91–102.

- 73 Osawa M, Umetsu K, Sato M, et al. Structure of the gene encoding human alpha 2-HS glycoprotein (AHSG). *Gene* 1997;196:121–125.
- 74 Guillory B, Sakwe AM, Saria M, et al. Lack of fetuin-A (alpha2-HS-glycoprotein) reduces mammary tumor incidence and prolongs tumor latency via the transforming growth factor-beta signaling pathway in a mouse model of breast cancer. *Am J Pathol* 2010;177:2635–2644.
- 75 Kundranda MN, Henderson M, Carter KJ, et al. The serum glycoprotein fetuin-A promotes Lewis lung carcinoma tumorigenesis via adhesive-dependent and adhesive-independent mechanisms. *Cancer Res* 2005;65:499–506.
- 76 Thompson PD, Sakwe A, Koumangoye R, et al. Alpha-2 Heremans Schmid Glycoprotein (AHSG) modulates signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma cell line SQ20B. *Exp Cell Res* 2014;321:123–132.

SUPPLEMENTAL DATA

Table S1. Feline secretomes protein profiles, indicating the presence of each protein in the different groups.

NCBI accession number	Protein name	Gene	N + FBS	H + FBS	N - FBS	H - FBS
* A0A2I2UC68	Actin gamma 1	ACTG1			X	X
* A0A2I2U7M8	Actinin alpha 1	ACTN1			X	
* A0A2I2U3E4	Actinin alpha 4	ACTN4				X
* A0A2I2U740	Alpha 2-HS glycoprotein	AHSG	X	X		
* M3X557	Alpha fetoprotein	AFP		X		
* M3WH75	Apolipoprotein H	APOH	X	X		
* M3WB04	ATP binding cassette subfamily A member 12	ABCA12	X			
* A0A2I2UUX1	Baculoviral IAP repeat containing 6	BIRC6			X	
M3W1F4	Biglycan	BGN			X	X
* M3XF77	C-type lectin domain family 3 member B	CLEC3B			X	X
A0A2I2UKC2	Calcium-transporting ATPase	ATP2C1	X			
* A0A2I2UP24	Carnitine O-acetyltransferase	CRAT	X	X	X	X
* M3WLU0	Cathepsin B	CTSB			X	X
* M3WHM7	Centrosomal protein 85	CEP85		X		
* A0A2I2U8D2	Centrosomal protein 162	CEP162	X			
* M3WYK0	Chromosome 9 open reading frame 84	C9ORF84				X
* M3W2F5	Collagen type I alpha 1 chain	COL1A1			X	X
* A0A2I2USZ8	Collagen type I alpha 2 chain	COL1A2			X	X
D5MTH1	Cystatin	CST3			X	X
M3X0W2	Decorin	DCN			X	X
M3W165	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	POLR2B	X	X		
* M3WRY2	Extracellular matrix protein 1	ECM1				X
* A0A2I2UL23	Fibrillin 1	FBN1				X
A0A2I2UMT4	Fibromodulin	FMOD			X	X
* A0A2I2U011	Fibronectin 1	FN1			X	X
M3WZ15	Fibulin-1	FBLN1				X
* A0A2I2V3V8	Filamin A	FLNA			X	
A0A2I2UV13	Fructose-bisphosphate aldolase	ALDOA			X	X
M3W9D5	Galectin	LGALS1			X	X
M3W3S8	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI			X	X
* M3WFT4	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5	HSPA5				X
* M3X7U8	Hemicentin 2	HMCN2			X	
M3W1E3	Hexosyltransferase	B3GALT4	X	X		
* M3X5V4	Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2	HIVEP2	X	X		
* M3VU96	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	ITIH2	X	X		
* M3WN60	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3	ITIH3	X	X		
* A0A2I2UC10	Interactor of little elongation complex ELL subunit 1	ICE1			X	
A0A2I2UZ37	L-lactate dehydrogenase	LDHA			X	X
* A0A2I2U4R6	Lamin A/C	LMNA			X	X
* M3WJH8	Leucine zipper protein 1	LUZP1		X	X	X
* M3W0X1	Lumican	LUM				X
A0A2K5TIV9	Malate dehydrogenase	MDH1			X	
* M3XCS9	Maestro heat like repeat family member 5	MROH5			X	X
* M3VU49	Matrix metalloproteinase	MMP13	X			
* M3W4Z9	Matrix metalloproteinase 2	MMP2			X	X
M3WA04	Metallothionein	LOC101081428			X	
* M3X673	Nucleophosmin 1	NPM1			X	X
* A0A2I2UL25	Peroxioredoxin 6	PRDX6			X	X
* M3WKJ9	Phosphoglycerate mutase	PGAM1			X	X
* A0A2I2UI05	Phosphoglucomutase 2 like 1	PGM2L1				X
* M3X7U2	Potassium calcium-activated channel subfamily N member 2	KCNN2	X	X		
* A0A2I2V3B3	Pre-mRNA processing factor 6	PRPF6			X	X
* M3W6K9	Procollagen C-endopeptidase enhancer	PCOLCE			X	
M3WEL8	Profilin	PFN1			X	X
M3W668	Protein disulfide-isomerase	PDIA3			X	X
* M3XB35	Protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent 1N (putative)	PPM1N			X	
* M3WZW0	Rho GTPase activating protein 24	ARHGAP24	X			
* M3W550	Secreted protein acidic and cysteine rich	SPARC			X	X
* A0A2I2UEM6	SEL1L family member 3	SEL1L3			X	
* M3WG24	Serpin family H member 1	SERPINH1			X	X
A0A2I2U7Y0	Serum albumin	ALB	X	X	X	X
* M3WLL8	Serpin family C member 1	SERPINC1	X			X
* A0A2I2UMH2	SIN3 transcription regulator family member B	SIN3B	X			
* M3WKU9	Solute carrier family 25 member 19	SLC25A19	X			
* M3W469	Solute carrier family 35 member D1	SLC35D1		X		
M3WJP4	Structural maintenance of chromosomes protein	SMC1A			X	

* M3WZ66	Sulfite oxidase	SUOX	X	X	X	X
A0A2I2UPH5	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1			X	X
* A0A2I2UEY5	Teashirt zinc finger homeobox 1	TSHZ1	X	X	X	X
* A0A2I2UFV7	Tenascin C	TNC	X			
* A0A2I2U4F9	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1			X	X
* M3WVW8	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2			X	X
* M3WF45	Thrombospondin 1	THBS1			X	X
M3WJ37	Transgelin	TAGLN				X
M3X9A1	Triosephosphate isomerase	TPI1			X	X
* M3WH86	Tropomyosin 2	TPM2			X	
M3WP64	Uncharacterized protein	LOC101085453	X	X	X	X
M3WVV6	Uncharacterized protein	AQP7	X	X		
M3X9L6	Uncharacterized protein	RAB11FIP5	X	X		
A0A2I2U007	Uncharacterized protein	LOC101098159	X			
M3XET9	Uncharacterized protein	-		X		
M3VVM1	Uncharacterized protein	EEF2			X	X
A0A2I2V3N0	Uncharacterized protein	RPL1			X	X
M3W2V0	Uncharacterized protein	APOE			X	X
M3X335	Uncharacterized protein	LOC101085738			X	
A0A2I2UZE5	Uncharacterized protein	PRDX1			X	X
A0A2I2U5T7	Uncharacterized protein	-			X	
A0A2I2U057	Uncharacterized protein	TPM3				X
M3VZD0	Uncharacterized protein	PCLO				X
* M3VW05	Valosin containing protein	VCP			X	X
* A0A2I2UAS4	Versican	VCAN			X	X
* A0A2I2U8W9	Vimentin	VIM				X
* M3WR26	Zinc fingers and homeoboxes 2	ZHX2			X	X

Feline proteins named in this study are marked with a symbol (*).

Table S2. Most significant proteins in an overall analyzes of feline samples, characterized by their ID number, gene, group with greater protein expression, molecular function, biological process and subcellular localization.

Protein name	NCBI accession number	UniProt accession number	Gene	Most expressed group	Molecular function	Biological process	Subcellular location
Alpha 2-HS glycoprotein	A0A2I2U740	A0A337SD37	AHSG	N+FBS	Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity; endopeptidase inhibitor activity	Negative regulation of biomineral tissue development	Extracellular region or secreted
Biglycan	M3W1F4	A0A2I2UTN2	BGN	H+FBS	Extracellular matrix binding; glycosaminoglycan binding; protein kinase inhibitor activity	Cytokine-mediated signaling pathway, negative regulation of JAK-STAT cascade; negative regulation of protein kinase activity; peptide cross-linking via chondroitin 4-sulfate glycosaminoglycan	Extracellular region or secreted
Cystatin	D5MTH1	D5MTH1	CST3	H+FBS	peptidase inhibitor activity, identical protein binding, endopeptidase inhibitor activity, cysteine-type endopeptidase inhibitor activity, protease binding, amyloid-beta binding	Response to oxidative stress, negative regulation of elastin catabolic process, positive regulation of cell population proliferation, supramolecular fiber organization, regulation of programmed cell death, negative regulation of cell death, positive regulation of DNA replication, negative regulation of proteolysis, defense response, negative regulation of peptidase activity	Extracellular space
Matrix metalloproteinase 2	M3W4Z9	M3W4Z9	MMP2	H-FBS	Metalloendopeptidase activity; zinc ion binding	-	Extracellular matrix
Uncharacterized protein	M3WVV6	M3WVV6	AQP7	N+FBS	Channel activity	Glycerol transport; renal water absorption	Membrane
C-type lectin domain family 3 member B	M3XFW7	M3XFW7	CLEC3B	H-FBS	Calcium ion binding; heparin binding; kringle domain binding	Bone mineralization; cellular response to transforming growth factor beta stimulus	Extracellular space; nucleus (granular component); cytoplasm
Actin gamma 1	A0A2I2UC68	M3W6I2	ACTG1	H-FBS	ATP binding; identical protein binding; kinesin binding; nitric-oxide synthase binding; profilin binding; protein kinase binding; structural constituent of cytoskeleton; structural constituent of postsynaptic actin cytoskeleton; Tat protein binding; ubiquitin protein ligase binding	Cell motility; cellular response to cytochalasin B; cellular response to interferon-gamma; negative regulation of protein binding; regulation of norepinephrine uptake; regulation of protein localization to plasma membrane; regulation of transmembrane transporter activity; sarcomere organization; synaptic vesicle endocytosis	Cytoskeleton ; cytosol; extracellular exosome; Nucleus (NuA4 histone acetyltransferase complex); plasma membrane; calyx of Held; cytoplasmic ribonucleoprotein granule; dense body; focal adhesion; glutamatergic synapse; myelin sheath; myofibril; phagocytic vesicle; Schaffer collateral - CA1 synapse
Phosphoglycerate mutase	M3WKJ9	A0A337S2Y5	PGAM1	H+FBS	Catalytic activity, protein binding, bisphosphoglycerate mutase activity, phosphoglycerate mutase activity, hydrolase activity	Gluconeogenesis, glycolytic process, regulation of glycolytic process, neutrophil degranulation, respiratory burst, canonical glycolysis, regulation of pentose-phosphate shunt	Cytosol
TIMP metalloproteinase inhibitor 2	M3WVW8	A0A337SHQ6	TIMP2	H-FBS	Metalloendopeptidase inhibitor activity; protease binding	Negative regulation of catalytic activity; negative regulation of membrane protein ectodomain proteolysis; response to cytokine; response to hormone	Secreted
Profilin	M3WEL8	M3WEL8	PFN1	H-FBS	Actin binding; actin monomer binding; adenyl-nucleotide exchange factor activity; phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding; proline-rich region binding; Rho GTPase binding, RNA binding	Actin cytoskeleton organization; modification of postsynaptic actin cytoskeleton; negative regulation of actin filament polymerization; negative regulation of stress fiber assembly; neural tube closure; positive regulation of actin filament bundle assembly; positive regulation of actin filament polymerization; positive regulation of ATPase activity; positive regulation of epithelial cell migration; positive regulation of ruffle assembly; protein stabilization; regulation of actin filament polymerization; regulation of transcription by RNA polymerase II; synapse maturation	Nucleus; cell cortex; cytoplasm; glutamatergic synapse
Secreted protein acidic and cysteine rich	M3W550	M3W550	SPARC	H-FBS	Calcium ion binding; collagen binding; extracellular matrix binding	Anatomical structure development; bone development; cellular response to growth factor stimulus; negative regulation of angiogenesis; negative regulation of endothelial cell proliferation; pigmentation; positive regulation of endothelial cell migration; regulation of cell morphogenesis	Collagen-containing extracellular matrix; extracellular space; nuclear matrix; cell surface; platelet alpha granule membrane
Triosephosphate isomerase	M3X9A1	M3X9A1	TP11	H+FBS	Triose-phosphate isomerase activity; ubiquitin protein ligase binding	Gluconeogenesis; glyceraldehyde-3-phosphate biosynthetic process; glycerol catabolic process; glycolytic process; multicellular organism development	Cytosol
Nucleophosmin 1	M3X673	M3X673	NPM1	H+FBS	Activating transcription factor binding; core promoter binding; histone binding; NF-kappaB binding; protein heterodimerization activity; protein homodimerization activity; protein kinase binding; protein kinase inhibitor activity; ribosomal large subunit binding; ribosomal small subunit binding; RNA binding; Tat protein binding; transcription coactivator activity; unfolded protein binding	Cell aging; centrosome cycle; DNA repair; negative regulation of apoptotic process; negative regulation of cell proliferation; negative regulation of centrosome duplication; negative regulation of protein kinase activity by regulation of protein phosphorylation; nucleocytoplasmic transport; nucleosome assembly; positive regulation of cell cycle G2/M phase transition; positive regulation of cell proliferation; positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity; positive regulation of transcription by RNA polymerase II; positive regulation of translation; protein complex oligomerization; protein localization; regulation of centriole replication; regulation of eIF2 alpha phosphorylation by dsRNA; regulation of endonuclease activity; regulation of endonuclease activity; regulation of mRNA stability involved in cellular response to UV	Cytoskeleton (spindle pole centrosome); Nucleus (nucleolus, nucleoplasm); cytoplasm; protein-DNA complex; ribonucleoprotein complex
Decorin	M3X0W2	M3X0W2	DCN	H+FBS	Collagen binding; extracellular matrix binding; glycosaminoglycan binding; protein kinase inhibitor activity	Cytokine-mediated signaling pathway; negative regulation of angiogenesis; negative regulation of endothelial cell migration; negative regulation of JAK-STAT cascade; negative regulation of protein kinase activity; negative regulation of vascular endothelial growth factor signaling pathway; peptide cross-linking via chondroitin 4-sulfate glycosaminoglycan; positive regulation of macroautophagy; positive regulation of mitochondrial depolarization; positive regulation of mitochondrial fission; positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling; positive regulation of transcription by RNA polymerase II	Extracellular matrix
Cathepsin B	M3WLU0	M3WLU0	CTSB	H-FBS	Cysteine-type endopeptidase activity	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process; regulation of catalytic activity	Extracellular space; lysosome

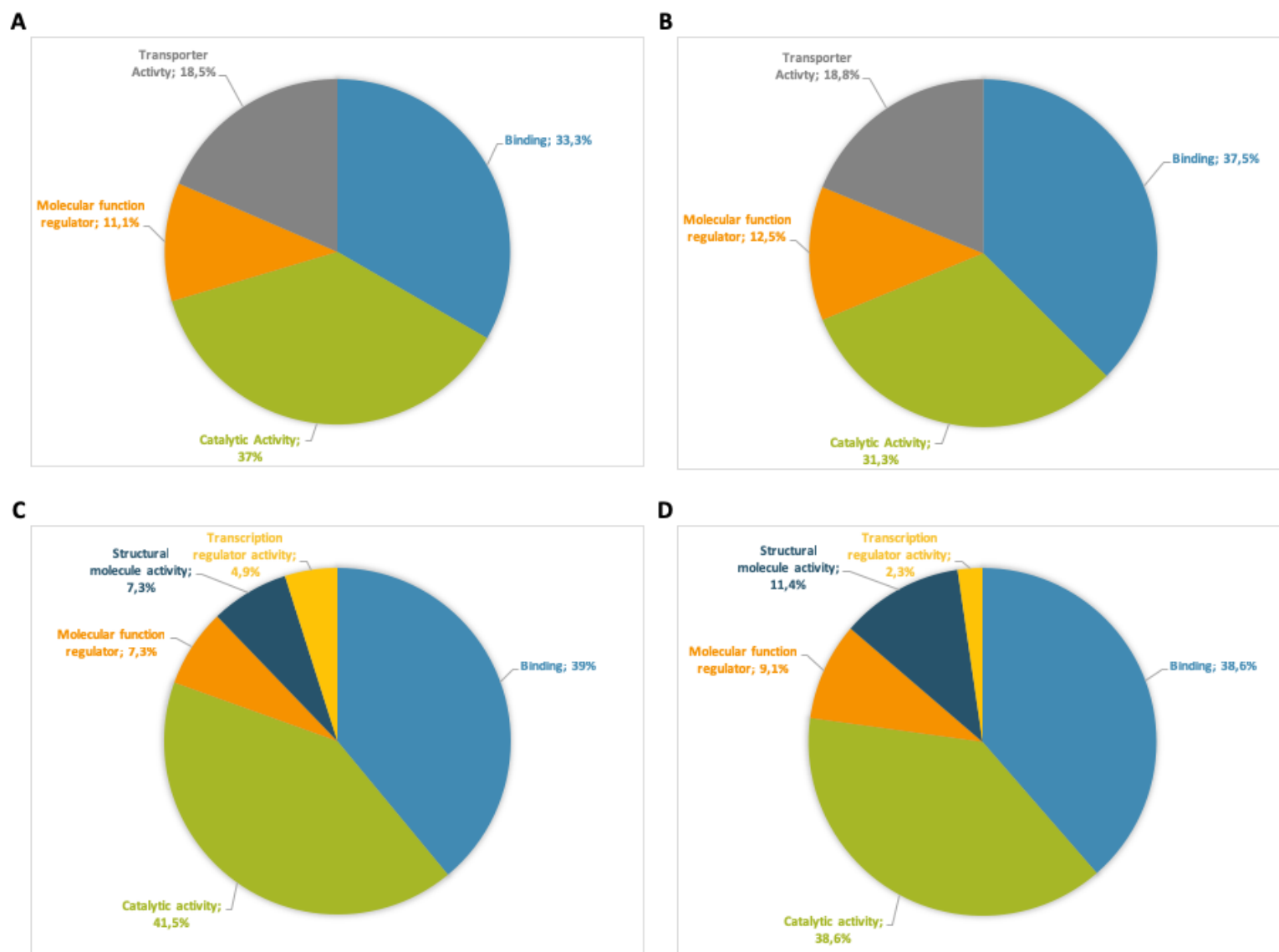


Figure S1. Gene ontology by molecular function of proteins identified in each group of feline samples (A) N+FBS, (B) H+FBS, (C) N-FBS and (D) H-FBS.

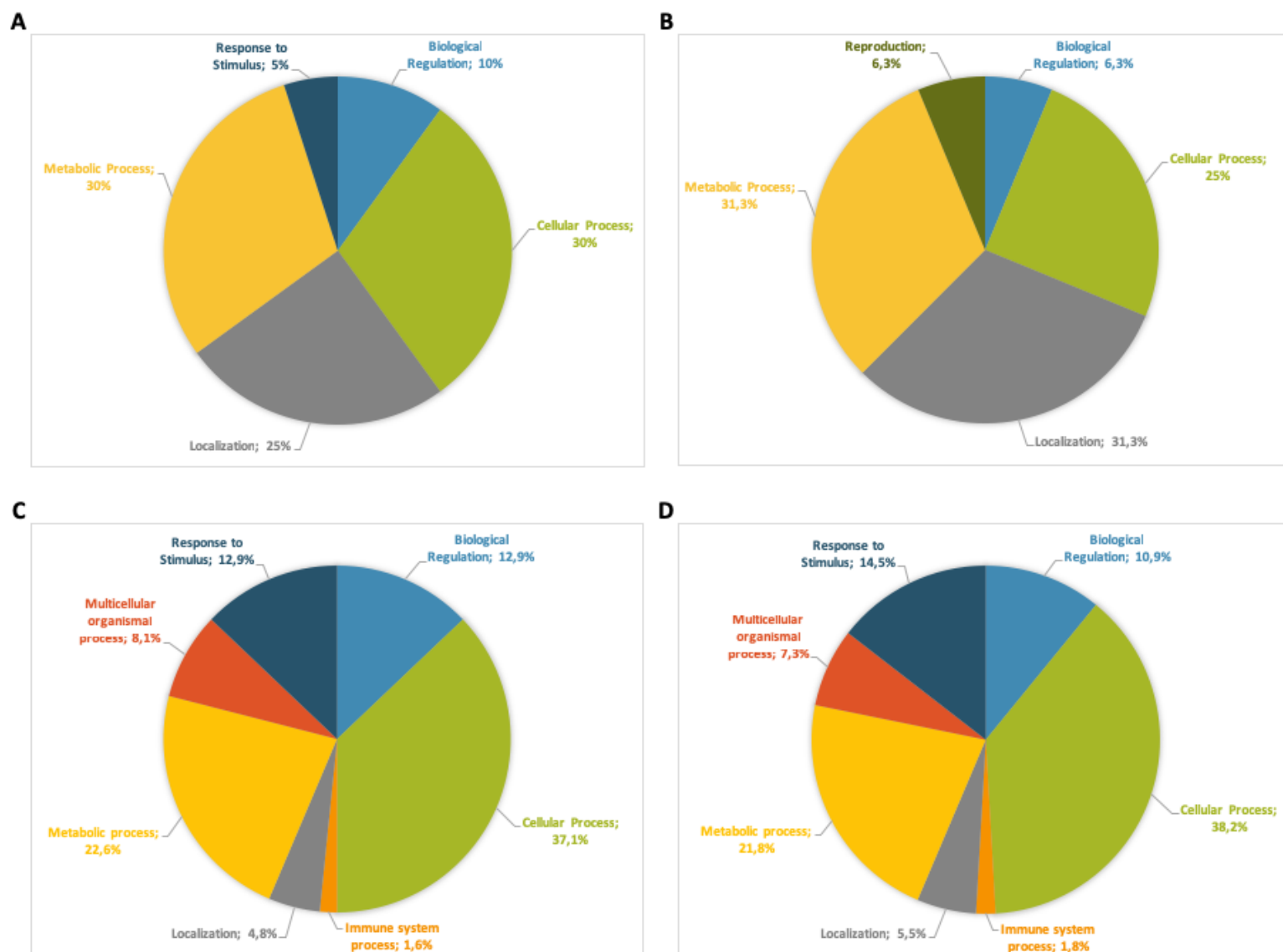


Figure S2. Gene ontology by biological process of proteins identified in each group of feline samples (A) N+FBS, (B) H+FBS, (C) N-FBS and (D) H-FBS.

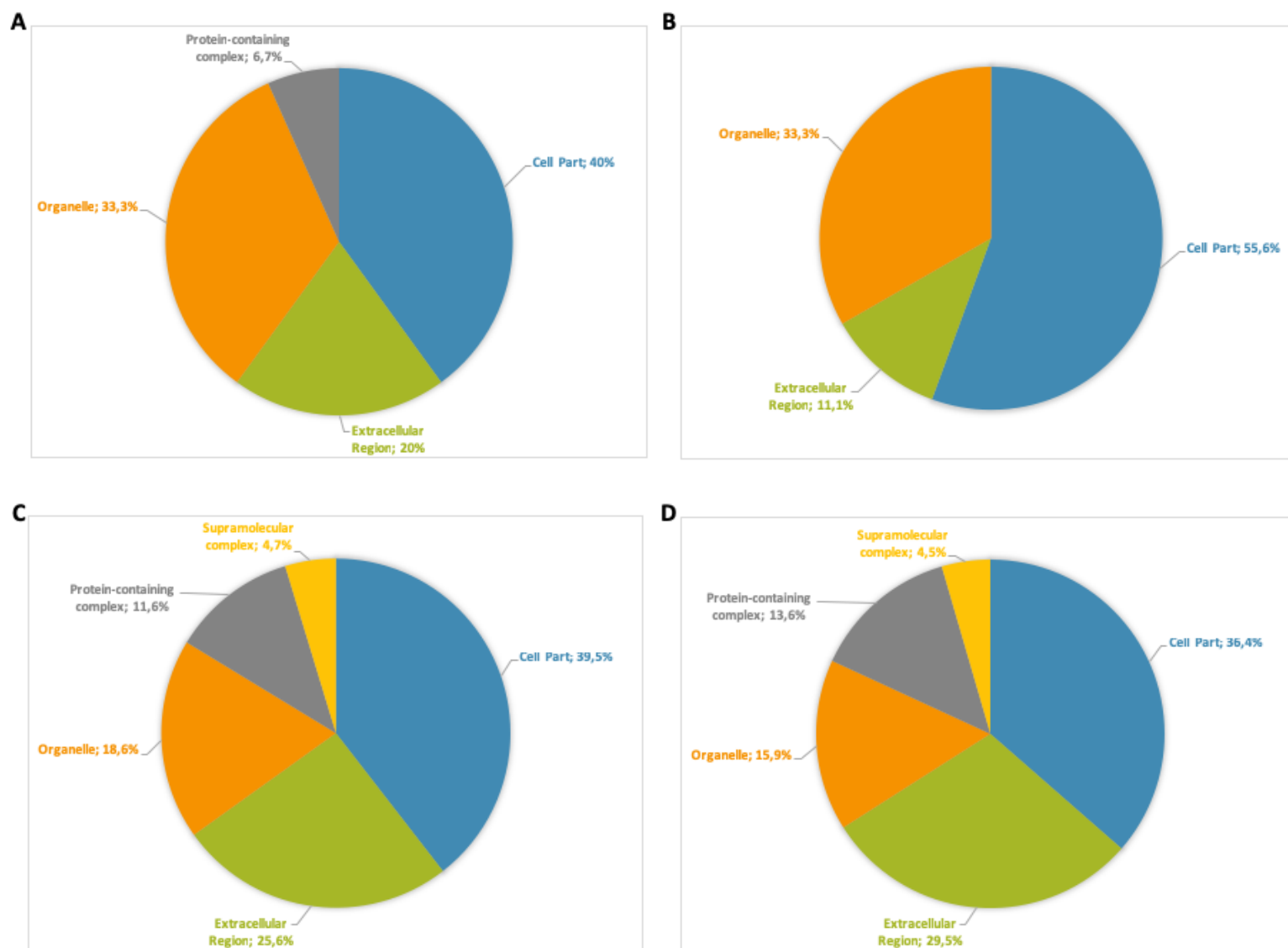


Figure S3. Gene ontology by cellular component of proteins identified in each group of feline samples (A) N+FBS, (B) H+FBS, (C) N-FBS and (D) H-FBS.

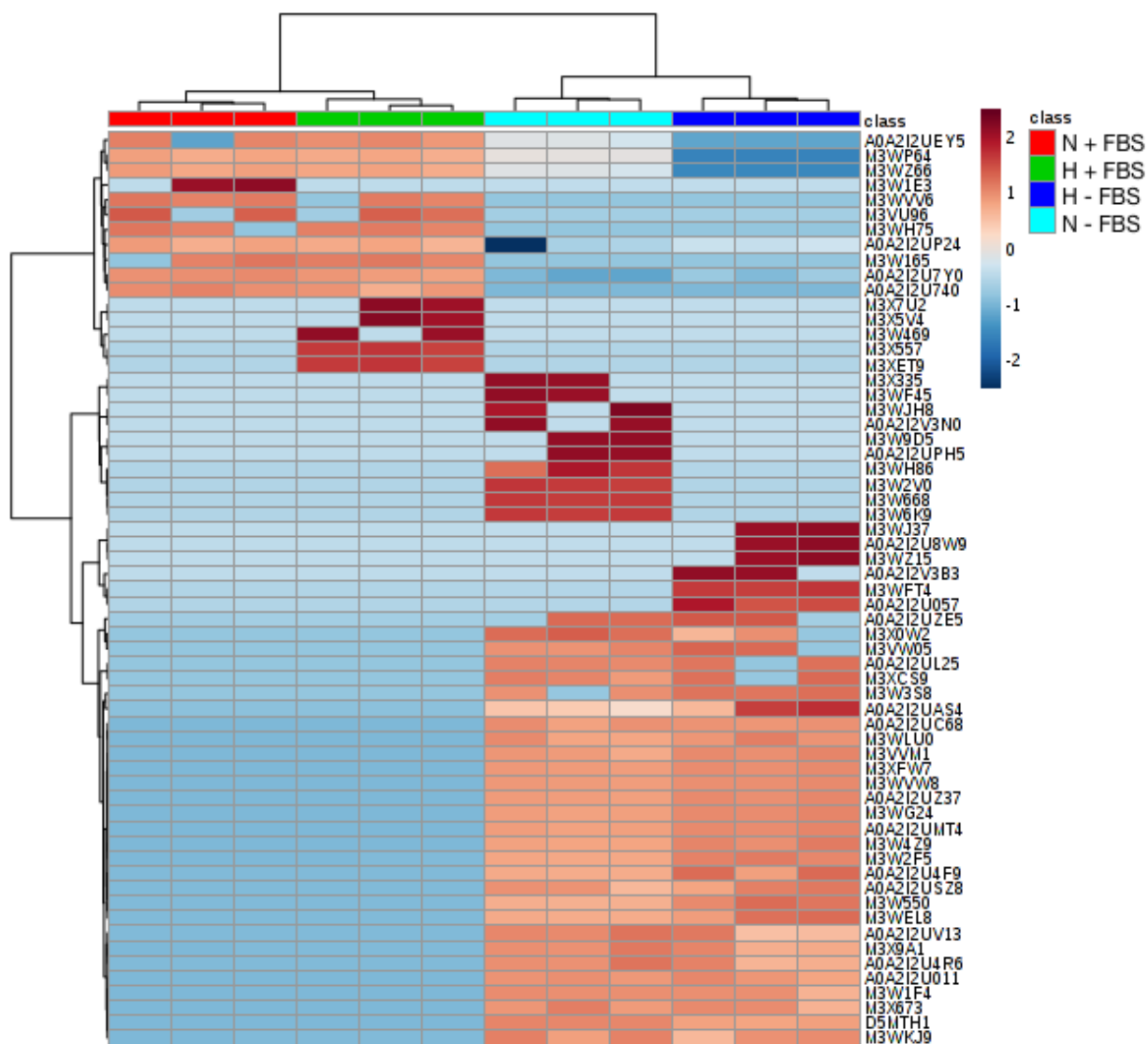


Figure S5. Heat map of feline conditioned medium samples, comparing the protein abundance in each replicate and group of study.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dificuldades encontradas durante a pesquisa

Determinação de proteína total

Na realização da comparação de extrações proteicas, inicialmente se queria a obtenção de medições de proteína total que fossem correlacionadas com os resultados dos géis 1-D. Ao realizar as medições de proteína total pelo método A280, estava-se super-estimando os valores de proteína total, pelo que se achava que as amostras tinham mais proteína da que realmente tinham, e ao de realizar a coloração dos géis 1-D, não aparecia nenhuma banda, embora o marcador molecular aparecia. Isto ocasionou um atraso no desenvolvimento da pesquisa, porque estavam se realizando processamentos complexos e demorados com amostras que inicialmente não tinham a quantidade proteica necessária para iniciar o processamento. Depois de várias tentativas para realizar as extrações proteicas e sem enxergar uma coerência entre as medições de proteína total e a ausência da colocação dos géis, se soube que os resultados não estavam sendo confiáveis. Quando as medições de proteína total foram realizadas pelo método Bradford, se obteve o valor real de proteína total e se enxergou o problema da baixa quantidade de proteína que apresentavam as amostras.

Concentração proteica

Depois de solucionar o problema da super-estimação de proteína total, foi difícil determinar o método de concentração proteica e o volume de amostra que deviam ser utilizados para obter a quantidade de proteína total necessária para a análise por espectrometria de massa. Vários volumes de amostras foram liofilizados e ressuspensos em vários volumes diferentes, mas nenhum conseguiu chegar nos valores de proteína total necessário. Foi utilizando os tubos de concentração AMICON que se atingiram os valores desejados.

Diferenças entre espécies

Ao ter várias dificuldades no desenvolvimento do projeto, vários pilotos foram realizados com amostras de uma única espécie. Foi nas amostras felinas que se determinou o volume e método de concentração ideal para obter a quantidade de proteína total desejada. Ao realizar o mesmo processamento nas amostras caninas, não se conseguiu chegar na quantidade de proteína desejada, pelo que pela falta de amostra e de tempo, a solução foi filtrar uma terceira vez nos tubos AMICON as amostras que não tinham no valor de proteína total necessário.