Amanda Faria Assoni

Caracterização do secretoma de células
multipotentes mesenquimais estromais de
diferentes fontes

Characterization of the secretome of multipotent
mesenchymal stromal cells from various tissues

São Paulo

2015

Amanda Faria Assoni

Caracterização do secretoma de células
multipotentes mesenquimais estromais de
diferentes fontes

Characterization of the secretome of multipotent
mesenchymal stromal cells from various tissues

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientador(a): Mayana Zatz

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Faria Assoni, Amanda

Caracterização do secretoma de células multipotentes
mesenquimais estromais de diferentes fontes

Número de páginas: 103

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade
de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Células multipotentes mesenquimais estromais

2. Secretoma

3. Proteômica

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Mayana Zatz

Orientador(a)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Sandro e Telma, por todo amor,
paciência e apoio.

Epígrafe

“Your work is to find out what your work should be and not to neglect it for another’s. Clearly discover your work and attend to it with all your heart.”

Dhammapada, v. 166

Agradecimentos

Agradeço a todos que tiveram qualquer participação neste projeto. Seja com discussões, com o trabalho de bancada ou com a vida.

Agradeço muito aos meus pais, que acreditam em mim e no meu potencial. Agradeço simplesmente por tudo, vocês são o meu exemplo a ser seguido, sou muito feliz e orgulhosa por ser filha de vocês. Meus amigos e companheiros. Amo vocês!

Ao Henrique Sens, muito obrigada pela paciência e compreensão, pelas conversas, pelo apoio, pelas distrações e por me ajudar a ser uma pessoa melhor. Amo você/ Te amo.

Aos meus amigos que me ajudaram tanto na parte científica (não é, Dia?) quanto a deixar tudo ficar mais fácil e divertido. Muito obrigada Mamão, Cauêzetz, Carol, Nani, Rapidoca xuba, Dia, Estelinha, Perê, Castel, Teks, Laís e Aninha florzinhas e Daniê. E agradeço também o Time mais lindo da Usp, pelas vitórias, pelas derrotas e por todo o tempo que passamos juntas.

Agradeço a professora Mayana Zatz, por todas as oportunidades, pela confiança, pelos aprendizados e todo o crescimento proporcionado desde a iniciação científica.

Agradeço a todos que passaram pelo laboratório. Cada um de vocês me ajudou a crescer como pessoa e cientificamente. Nunca vou me esquecer de vocês e torço pelo sucesso de todos e para que a gente se encontre por aí novamente.

Agradeço à Nati, minha mãe do lab, minha amiga, meu orgulho e meu espelho. Nati, você é demais, muito obrigada por permitir que eu faça parte de um pedacinho da sua vida.

À Mari, por ser tão linda em todos os sentidos e tão “helps”. Pelas conversas e discussões científicas.

Ao Marcos, por ser fera, a pessoa mais bondosa que eu conheci, por acreditar e inspirar a gente a se dedicar tanto quanto você.

Ao Eder, por ser um exemplo de dedicação e de como aproveitar a vida também.

À Mazuda, por ser a única pessoa que me acompanharia a eventos que mais ninguém iria. Pela amizade e pelas risadas, pelas broncas e por toda a ajuda com a organização da vida do lab.

À Giu, que chegou por último, mas não por isso é menos importante. Obrigada pelas conversas, conselhos, ajuda com a vida e toda a paciência comigo.

À Jujuba, meu “Batman” eterno. Quando eu crescer eu quero ser como você. Tão organizada, dedicada, realmente um exemplo. Muito obrigada pela amizade. Minha amorinha.

À Memel, que me ofereceu este projeto e me ajudou a entrar em um mundo que eu não conhecia.

À Nane, obrigada pelos ensinamentos científicos ou não. Pelas risadas, comidas e corridas.

Ao Michel, pelo conhecimento científico e otimismo.

À Naila, Toninha, Inês, Thiago, Luiz, Ernesto por fazerem parte deste processo.

À Helo, você é essencial. Muito obrigada pela ajuda e organização no biotério.

Ao Miguel, pelas idéias, discussões e conversas produtivas e pelas improdutivas também.

Ao Val, pela paciência, por todo conhecimento, que até me impressiona. E principalmente pela oportunidade e amizade.

À Karina, Jessica, Adriana, Malu e Fabinho, por toda a ajuda, paciência e pelas conversas e risadas.

Ao professores Maria Rita, Mariz e Keith e todos os seus alunos por toda a ajuda e companhia.

À FAPESP, ao CNPQ e ao Grupo Fleury pelo apoio financeiro.

Índice

Resumo	10
Abstract	12
I - Introdução	13
1. Células Tronco	13
2. Células Multipotentes Mesenquimais Estromais	14
2.1. Mecanismos modulatórios das CTMs	18
2.2. Estudos sobre identificação de proteínas no Secretoma de Células Multipotentes Mesenquimais Estromais	20
II - Objetivos	23
III - Materiais e Métodos	24
IV- Resultados	33
1- Caracterização das células CTMs	33
2- Padronização da análise do secretoma de CTM por proteômica shotgun	37
3- Controle de qualidade de aquisição de dados	41
4- Comparação do secretoma de células multipotentes mesenquimais estromais de diferentes fontes de obtenção de mesmos indivíduos	47
V- Discussão	73
VI- Conclusões	84
VII- Bibliografia	85
VII- Biografia	102
VIII- Anexo	103

Resumo

Células multipotentes mesenquimais estromais (CTM) são células adultas multipotentes que podem ser isoladas a partir de diferentes tecidos e são capazes de atingir sítios danificados, exercer papéis na regeneração tecidual e modular a resposta imune. Estas células demonstraram resultados discrepantes em estudos *in vivo* dependentes de sua fonte de obtenção. Há na literatura hipóteses de que o mecanismo predominante pelo qual as CTMs atuam no reparo tecidual estaria relacionado à sua atividade parácrina, criando um microambiente com sinais tróficos. Nesse sentido, a avaliação do conteúdo do secretoma destas células é de grande interesse. Portanto, este projeto teve como objetivo analisar o meio condicionado de CTMs obtidas de diferentes fontes (tecido adiposo, músculo esquelético e tubas uterinas) de mesmos indivíduos. A abordagem experimental consistiu em proteômica *shotgun* (nanocromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem) com o intuito de identificar alvos diferentemente expressos entre as culturas que possam sugerir funções específicas de cada linhagem celular. Os dados espectrais foram obtidos pelo modo de aquisição dependente de dados (Top15). Os dados adquiridos foram processados pelas plataformas MaxQuant e TPP (Trans-Proteomic Pipeline). Foi realizada análise qualitativa de vias enriquecidas por meio do programa Ingenuity utilizando as proteínas em comum nos secretoma de todas as CTMs analisadas. Essa análise permitiu observar vias enriquecidas de proliferação celular, migração celular e desenvolvimento do sistema cardiovascular, demonstrando que as proteínas secretadas por quaisquer das CTMs analisadas podem ser relacionadas a resultados encontrados na literatura utilizando estas células para terapias para patologias. As análises estatísticas para determinar se haveria dependência da composição do secretoma em função do indivíduo doador ou tecido fonte das CTMs revelaram proteínas diferencialmente expressas entre todos os grupos. Estas proteínas diferencialmente expressas são relacionadas à proliferação, sinalização e interação celular, além de modulação do sistema imune e da angiogênese. Neste contexto, podemos concluir que o secretoma das CTMs é muito semelhante, que as CTMs isoladas de quaisquer tecidos ou indivíduos são

capazes de secretar moléculas que possivelmente exercem benefícios em determinado tratamento. Entretanto, estes benefícios podem ser exacerbados ou suprimidos pelas moléculas diferencialmente expressas, as quais são dependentes tanto dos tecidos quanto dos indivíduos dos quais as CTMs foram obtidas.

Abstract

Multipotent Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) are multipotent adult cells that can be isolated from different tissues and are able to reach damaged sites, play a role in tissue regeneration and modulate immune response. These cells showed conflicting results in studies *in vivo* depending on their tissue origin. It is hypothesised that the predominant mechanism by which MSCs function could be related to its paracrine activity, creating a microenvironment with trophic signals. Accordingly, the evaluation of the content of the secretome of these cells is of great interest. Towards this end, this project analyzed the proteins of conditioned medium of MSCs obtained from different sources from the same donors (adipose tissue, uterine tubes and skeletal muscle). The MSCs were characterized by flow cytometry for the presence of membrane markers and by differentiation *in vitro* into adipocytes, chondrocytes, and osteoblasts. The conditioned media were obtained and the protein profile was analysed by liquid nanochromatography coupled to tandem mass spectrometry. Spectral data were obtained by full-acquisition mode MS / dd-MS2 (Top15). The acquired data were processed by MaxQuant software and TPP (Trans-Proteomic Pipeline). Qualitative analysis of enriched pathways through the Ingenuity program using the shared proteins between the cell lineages was performed. It showed enriched pathways related to cell proliferation, cell migration and development of the cardiovascular system. This allows considering that the secreted proteins from the analyzed MSCs might be related to findings in the literature using these cells for therapies. After this, the proteins were analyzed for differential expression by comparing the MSCs into groups of different sources or different donors. In which were observed differentially expressed proteins related to proliferation, cell signaling and interaction, modulation of the immune system and angiogenesis. In this context, we can conclude that MSC's secretome is very similar in the analyzed lineages, and that any MSCs are able to secrete molecules which potentially exert for certain treatment benefits. However, these benefits can be exacerbated or annulled by differentially expressed molecules, which are dependent both as the individual and tissues from which MSCs were obtained.

I. Introdução

1. Células Tronco

As células-tronco (CT) têm sido, nos últimos anos, o grande foco das pesquisas na área de medicina regenerativa. Células-tronco são capazes de se auto-renovar, gerando CFUs (do inglês *Colony Forming Units*) e também de se diferenciar em outros tipos celulares (Caplan 1991). Elas trazem consigo a esperança de terapia e cura de graves doenças, devido principalmente às suas características.

De acordo com seu potencial de diferenciação podem ser classificadas em:

totipotentes, capazes de gerar quaisquer tecidos, até mesmo os anexos embrionários;

pluripotentes, que originam todos os tecidos do organismo, excetuando-se os anexos embrionários(entre os exemplos estão as células-tronco embrionárias e as *iPSC* do inglês *induced Pluripotent Stem Cells*, mencionadas a seguir); e

multipotentes, presentes em todas as camadas germinativas e capazes de originar apenas células de tecidos específicos (STEM CELL Research and Ethics, 2000).

Células-tronco pluripotentes podem ser obtidas a partir da massa interna de blastocistos, sendo denominadas células-tronco embrionárias (CTEs) (Thomson, 1998). No Brasil as CTEs podem ser utilizadas para pesquisa de acordo com a Lei de Biossegurança, caso sejam retiradas de óvulos fertilizados em clínicas de reprodução assistida congelados há mais de três anos, desta forma considerando estes embriões inviáveis. Existem também as células pluripotentes geradas a partir da reprogramação de células adultas, também conhecidas como células *iPSC* – do inglês *induced Pluripotent Stem Cells* (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007).As *iPSC* possuem uma potencialidade equivalente às CTEs sem os entraves éticos, entretanto, a segurança de seu emprego em terapias celulares é duvidosa. Apesar de estudos buscarem maneiras de possibilitar seu uso em

terapias (Suzuki, Nakahata, & Okamoto, 2014), sua pluripotência torna possível o desenvolvimento de tumores, caso uma célula não diferenciada seja transplantada ou sofra dediferenciação. Desta forma, estas células são utilizadas principalmente como modelos *in vitro* para o estudos de doenças que afetam tecidos de difícil acesso (Robinton & Daley, 2012).

Em relação às células-tronco multipotentes, existem duas populações mais estudadas devido à facilidade de obtenção, inexistência de problemas éticos e potencialidade para uso em terapias, que são: as células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e as células multipotentes mesenquimais estromais (CTMs). As CTHs são originalmente obtidas da medula óssea, cultivadas em suspensão, capazes de se diferenciar em todas as células da linhagem sanguínea e podem ser identificadas por proteínas de superfície celular como CD34, CD38, CD45 e CD133. As CTMs foram primeiramente observadas como células não-hematopoiéticas encontradas na medula óssea, consistindo os precursores multipotentes do estroma da medula óssea (Till e McCulloch, 1964; Friedenstein et al., 1970). Posteriormente, Caplan e colaboradores descreveram o isolamento, caracterização e forma de cultivo das CTMs de medula óssea, e atribuiu este termo devido ao seu potencial de auto-renovação e de diferenciação em vários fenótipos da camada germinativa mesenquimal, (Caplan, 1991; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27056/>). As células multipotentes mesenquimais estromais (CTMs) constituem o foco de nossa pesquisa, como detalhado a seguir.

2. Células Multipotentes Mesenquimais Estromais

As CTMs podem ser isoladas a partir de diferentes tecidos como a medula óssea, sangue periférico, sangue do cordão umbilical, tecido do cordão umbilical, polpa de dente, músculo, tecido adiposo, tuba uterina, músculo orbicular do lábio, vilosidade coriônica da placenta, e sangue menstrual (Bianco, 2001a; Secco *et al.*, 2008; Gronthos, 2002; Montarras, 2005; Zuk, 2001, Jazedje *et al.*, 2009; Bueno *et al.*, 2008; Igura *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2007). Na medula óssea, elas consistuem 0,01% das células mononucleares e provêm o suporte estrutural e

funcional para as células-tronco hematopoiéticas (HSCs) em seu nicho (Johnson e Dorshkind, 1986; Pittenger *et al.*)

As CTMs possuem um potencial terapêutico considerável e por isso em muitas áreas de pesquisa já estão em fase clínica para inúmeras doenças que possuem mecanismos variáveis, incluindo doenças neurológicas, cardíacas, sanguíneas, imunológicas, degenerativas e câncer (Trounson, Thakar, Lomax, & Gibbons, 2011). Entretanto, o uso deste tipo celular por vários grupos que empregam diferentes métodos de isolamento e cultivo faz com que os resultados não sejam comparáveis, o que pode retardar o progresso das pesquisas com CTMs. Neste contexto, o *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* do *International Society for Cellular Therapy* propõe critérios mínimos para definir células multipotentes mesenquimais estromais humanas.

As “células multipotentes mesenquimais estromais” (CTMs), referidas neste trabalho também como células mesenquimais, devem expressar as proteínas de superfície CD105, CD73 e CD90, e não apresentar os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR. Além disso, necessitam ter o potencial de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006).

Além das diferentes metodologias de obtenção e manutenção empregadas com CTMs, outra variável é o tecido do corpo humano de onde estas células foram isoladas. Na maioria dos estudos a escolha da fonte das CTMs ocorre de acordo com sua viabilidade, abundância e facilidade de obtenção (Trounson *et al.*, 2011). Isto se dá, pois, mecanismos e funções específicas de cada célula isolada de um determinado tecido não são bem caracterizados. Porém, podemos observar diferentes resultados dependentes da fonte de obtenção das células.

Há quase uma década nosso grupo de pesquisa trabalha com CTMs na tentativa do desenvolvimento de uma terapia celular para Distrofias Musculares Progressivas (DMPs). As DMPs constituem um grupo de doenças genéticas hereditárias caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética com distribuição e severidade variadas (Emery, 2002). Alguns trabalhos com o modelo murino *mdx* para a distrofia de Duchenne demonstram que os

músculos distróficos apresentam infiltrado inflamatório pró-fibrótico (Villalta, Nguyen, Deng, Gotoh, & Tidball, 2009). Desta forma, estudos comparativos importantes foram realizados *in vivo* em modelos murinos, principalmente com células mesenquimais de tecido adiposo (hASC – *human adipose stem cell*) e de cordão umbilical (hUCT – *human umbilical cord tissue*).

Todas as linhagens obtidas de células mesenquimais passam, primeiramente, por um processo de caracterização *in vitro*, no qual as células apresentam comportamento semelhante entre as linhagens, sendo que a maioria das linhagens submetidas à caracterização *in vitro* são capazes de se diferenciar e apresentam os marcadores de membrana característicos mencionados anteriormente. Entretanto, isso não foi observado *in vivo* com a variação sendo linhagem-dependente, conforme descrito nos exemplos a seguir.

Em um primeiro experimento, células obtidas de hASC foram transplantadas no camundongo SJL (modelo para Distrofia Muscular tipo Cinturas 2B), sem uso de imunossupressão, foi observada a expressão de proteínas musculares humanas no músculo dos animais, além de significativa melhora funcional em relação aos controles (Vieira et al., 2008). Entretanto, esse resultado só foi observado com células de uma doadora específica. Pois, ao utilizar células de outro doador obtidas do tecido do cordão umbilical, não foi observada a expressão de proteínas humanas. (Vieira et al., 2008; Zucconi, et al., 2010).

Apesar de não ter sido observada a regeneração tecidual nos os animais que receberam hUCT, estes apresentaram um quadro menos severo do que os animais controles, mostrando que as células trouxeram um efeito parácrino benéfico aos camundongos. Resultados semelhantes foram observados no modelo de distrofia muscular canino (GRMD – *Golden Retriever Muscular Dystrophy*). Ao receberem hASC sistemicamente, as células se integraram ao músculo e expressaram distrofina humana até 6 meses após o transplante (Vieira et al., 2012). Novamente, este resultado foi obtido somente com uma linhagem de hASC de uma doadora (dados não publicados). Já naqueles animais onde foram transplantadas hUCT por via sistêmica, as células chegaram ao local, porém, não se diferenciaram em músculo, de acordo com o que foi visto no modelo SJL (Zucconi et al., 2011). Em

suma, mesmo com características semelhantes *in vitro*, as CTMs podem ser mais ou menos eficientes *in vivo*, dependendo de seu nicho ou indivíduo de obtenção, apresentando, portanto, diferentes potenciais terapêuticos.

Outro trabalho, utilizando o modelo murino duplo nocaute para distrofina e utrofina (que apresenta fraqueza considerável e sobrevida de 120 a 150 dias) foram transplantados pericitos, uma subpopulação celular obtida a partir da população heterogênea das CTMs, através de separação por marcadores de superfície específicos. Nessa pesquisa foram comparadas células de uma mesma doadora, porém de tecidos diferentes. Observou-se um efeito significativo na sobrevida dos animais somente no transplante de pericitos derivados de tecido adiposo. Os resultados demonstram que a sobrevida dos animais é dependente do tecido do qual as células foram isoladas. Novamente, as células injetadas não foram encontradas nos músculos do modelo murino, indicando, portanto, que os pericitos contribuíram para o aumento na sobrevida mesmo sem se integrarem ao músculo distrófico (Valadares et al., 2014).

As CTMs foram inicialmente empregadas em terapias devido à sua habilidade de diferenciação em inúmeros tipos celulares e reposição de tecidos lesionados, o que foi observado em algumas patologias, como lesão muscular (Pereira et al., 2014; N. M. Vieira et al., 2012; Natássia M Vieira et al., 2008). Entretanto, alguns trabalhos envolvendo outras patologias como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, e lesão do menisco, que inicialmente sugeriam que as CTMs restaurariam os tecidos danificados, demonstraram que o efeito benéfico se deve à ação de efeitos tróficos liberados pelas células transplantadas (revisado por Arnold I. Caplan & Dennis, 2006).

Podemos concluir a partir da literatura que os efeitos que as células injetadas exercem são tecido-dependentes e, provavelmente, parácrinos. Deste modo, a análise dos efeitos dos meios condicionados é de grande interesse (Blaber et al., 2012).

Ribeiro e colaboradores (2012) analisaram os efeitos do cultivo de neurônios com meios condicionados de CTMs de cordão umbilical ou de tecido adiposo. Observaram efeitos positivos maiores no cultivo dos neurônios com meio

condicionado de CTMs originadas de cordão umbilical comparados aos efeitos resultantes do cultivo com meio condicionado de CTMs do tecido adiposo (Ribeiro et al., 2012). Também se observou efeitos protetores dos meios condicionados de CTMs de medula óssea em um modelo de lesão pulmonar e fibrose, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O meio condicionado das CTMs da medula óssea foi capaz de proteger o pulmão diminuindo a inflamação, fibrose, deposição de colágeno e apoptose de células pulmonares (Shen et al., 2015).

Outros trabalhos sugerem que a diferenciação terminal não é determinante para o sucesso das terapias com células mesenquimais, mas que o mecanismo pelo qual essas células contribuem para o reparo tecidual é provavelmente pela produção de fatores tróficos, citocinas e substâncias antioxidantes, com capacidade de modular a resposta imune e inflamatória. Estes estudos mostram, em diferentes modelos, recuperação funcional mesmo sem uma diferenciação significativa das células, que poderiam ser atribuídos à secreção de fatores anti-inflamatórios, neurotróficos, angiogênicos, imunomodulatórios e/ou anti-fibróticos como resumido a seguir. (A.I. Caplan & Correa, 2012; English, French, & Wood, 2010; Gang et al., 2009; Gharaibeh, Lavasani, Cummins, & Huard, 2011; Lavasani et al., 2012; Pinheiro et al., 2012).

2.1. Mecanismos modulatórios das CTMs

Trabalhos recentes indicam que a recuperação funcional adquirida com o uso de CTMs é complexa, uma vez que as células possuem um tempo de vida curto nos hospedeiros após o transplante e não migram ou diferenciam-se em tecidos (Eggenhofer et al., 2012; Song et al., 2012; Toma, Wagner, Bowry, Schwartz, & Villanueva, 2009). Entretanto, elas exercem benefícios terapêuticos mesmo quando não há a migração para o local da lesão (Deans & Moseley, 2000; Ghecchi, Danieli, & Cervio, 2012).

Um dos mecanismos de ação do secretoma, que constitui a totalidade de moléculas secretadas pelas células, das CTMs é a regulação da angiogênese, o

processo no qual novos vasos sanguíneos são formados por brotamento de uma vasculatura pré-existente. Este processo é importante tanto no desenvolvimento embrionário quanto durante a regeneração tecidual. Grande número de moléculas relacionadas à angiogênese foram identificadas no secretoma de CTMs, como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), interleucina-6 (IL-6), entre outros (Chen et al., 2008; Estrada et al., 2009; Huang et al., 2013; T Kinnaird et al., 2004; Tim Kinnaird, Stabile, Burnett, & Epstein, 2004). Estas moléculas podem ter sua expressão modificada por algumas citocinas e condições de cultura celular, como hipóxia (Paquet et al., 2015).

Outro mecanismo é a imunomodulação. As CTMs possuem privilégio imunológico, uma vez que tipicamente expressam MHC-I, mas não expressam MHC-II, CD40, CD80 e CD86. Por não possuírem moléculas de superfície co-estimulatórias, estas células não induzem resposta imune pelo organismo hospedeiro (Ryan, Barry, Murphy, & Mahon, 2005). Além disso, foi identificado que as CTMs são capazes de suprimir o sistema imune por interação célula-célula, fatores solúveis e indução de células T reguladoras (Di Nicola et al., 2002). Também podem atuar estimulando a resposta imune, no reconhecimento e apresentação de antígenos, ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos T e também no estágio efetor do linfócito T (J. L. Chan et al., 2006).

Há também o efeito anti-apoptótico exercido pelo secretoma das CTMs, não somente pela restauração do microambiente das células, mas também pela produção de proteínas que foram identificadas como inibidores de apoptose clássicos. Quando em co-cultura com macrófagos alveolares, as CTMs de medula óssea reduziram a apoptose e a expressão dos fatores pró-apoptóticos Bax e caspase-3 e aumentaram os níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Lu et al., 2008).

Deste modo, as CTMs funcionariam como uma fábrica de mediadores locais, estimulando a proliferação e sobrevivência celular em determinados tecidos (revisado por A.I. Caplan & Correa, 2012). De acordo com Baglio et. al. (2012), o mecanismo predominante pelo qual as CTMs atuam no reparo tecidual estaria

relacionado à sua atividade parácrina, criando um microambiente com sinais tróficos e de sobrevivência (com citocinas e fatores de crescimento secretados por elas).

Neste contexto é importante ressaltar que as CTMs são uma população heterogênea de células, constituída por diferentes subpopulações, as quais podem possuir potenciais modulatórios distintos e até mesmo com efeitos antagônicos. Além disso, uma mesma população de células pode alterar sua resposta de acordo com seu microambiente, como exemplificado a seguir.

TOLL-likereceptors (TLRs) são uma grande família de receptores de membrana que, quando ativados, desencadeiam uma resposta imune. Waterman, Tomchuck, Henkle, & Betancourt, 2010 demonstraram que CTMs expressam estes receptores (como TLR-3 e TLR-4), e podem ser polarizadas para perfis de moléculas secretadas pró-inflamatórias ou antiinflamatórias. Assim sendo, em uma cultura de CTMs uma mesma população pode apresentar comportamentos diferentes dependentes do estímulo ao qual são submetidas.

Um estudo com camundongos observou duas subpopulações de pericitos no músculo esquelético, no qual demonstraram que uma das populações (tipo-1) não forma músculo *in vivo*, mas contribui para a deposição de gordura no músculo esquelético, enquanto o tipo-2 contribui apenas para a nova formação de músculo após a lesão, mas não para a adipogênese. (Birbrair et al., 2013) Assim sendo, em uma cultura de CTMs podem existir duas subpopulações com perfis discrepantes que interagem simultaneamente. A aplicação em terapia celular de populações heterogêneas faz com que os resultados sejam imprevisíveis.

Esta característica pode resultar em uma subpopulação de CTMs anulando o efeito de outra subpopulação de CTMs. Entretanto, como apontado por Bibber e colaboradores (Bibber, Sinha, Lobba, Greco, & Rameshwar, 2013): transplantar populações heterogêneas de CTMs pode ser vantajoso uma vez que diferentes subpopulações de células podem interagir para alcançar uma resposta mais eficaz.

2.2. Estudos sobre identificação de proteínas no Secretoma de Células Multipotentes Mesenquimais Estromais

O secretoma constitui a totalidade de moléculas secretadas pelas células, que podem ser responsáveis por várias funções biológicas e incluem proteínas, hormônios, lipídeos e material genético (Katsuda, Kosaka, Takeshita, & Ochiya, 2013). Estas moléculas são secretadas pelo mecanismo clássico e não-clássico de secreção, incluindo translocação de proteínas, exocitose e encapsulação de vesículas ou exossomos (van Vliet, Thomas, Merino-Trigo, Teasdale, & Gleeson, 2003).

Estudos acerca do secretoma de células mesenquimais são bastante recentes. Entre eles, encontramos uma comparação entre o secretoma de células-tronco embrionárias humanas (hESCs), mesenquimais (CTMs) de medula óssea e células indutíveis multi-linhagem isoladas da medula óssea (Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible MIAMI). Foi observado que as MIAMI secretam um número maior de fatores solúveis, com papéis conhecidos na angiogênese, arteriogênese, imunomodulação, neuroproteção, crescimento axonal, entre outras funções, favorecendo, portanto, a sobrevivência celular (Stephane Roche & Sylvain Lehmann, 2012). Polacek e colaboradores (2011) compararam o perfil secretório de CTMs isoladas a partir de medula óssea e condrócitos para formação de tecido cartilaginoso. Seus achados mostram grande semelhança entre os fatores secretados por estes dois tipos celulares, com as CTMs secretando um número maior de fatores reguladores da matriz extracelular.

A análise do perfil de secreção a partir da diferenciação de distintas linhagens de CTMs mostrou alterações significativas no mesmo, descritas a seguir. Durante a diferenciação osteogênica, Kristensen e colaboradores (2012) evidenciaram uma grande complexidade no secretoma de osteoblastos, que incluía proteínas com funções endócrinas ou regulatórias de processos celulares, além da formação óssea. Em um trabalho semelhante, envolvendo diferenciação miogênica, Chan e colaboradores quantificaram 34 proteínas (previamente identificadas) e mostraram que 30 estavam diferencialmente expressas durante este processo. Observou-se que *follistatin-like protein 1*, *osteoglycin*, *spondin-1*, *cytokin-induced apoptosis inhibitor 1*, *fibrillin-2*, entre outras, sofriam alteração de sua expressão após o início do processo de diferenciação (C. Y. X. Chan et al., 2011).

Além disso, tem-se pesquisado o conteúdo e papel de vesículas secretadas pelas CTMs, as quais podem ser responsáveis pelo transporte dos fatores secretados e, conseqüentemente, pelos efeitos benéficos previamente descritos. Collino e colaboradores relataram que o conteúdo de micro RNAs das microvesículas está relacionado à função da célula que o secretou (Collino et al., 2010). Um estudo proteômico visando caracterizar o conteúdo das microvesículas secretadas por CTMs de medula óssea identificou algumas moléculas que podem ser responsáveis pelos efeitos benéficos resultantes do transplante de CTMs, como as moléculas de sinalização RRAS/NRAS, MAPK1, GNA13/GNG12, CDC42 e VAV2 (Kim et al., 2012). Em resumo, a bibliografia recente mostra uma importância cada vez maior da atividade parácrina das células mesenquimais e sugere diferenças de potencial terapêutico de acordo com o tecido que originou cada linhagem. Portanto, a caracterização do secretoma de diferentes tipos de célula multipotentes mesenquimais estromais e a comparação entre os fatores secretados por CTMs de obtidas de diferentes tecidos e doadores é essencial para aumentar a nossa compreensão acerca do seu potencial visando otimizar seu uso em terapias específicas, de modo robusto e seguro.

II. Objetivos

1. Padronizar a análise do secretoma das CTMs
2. Identificar os fatores liberados pelas CTMs
3. Analisar e comparar o proteoma do meio condicionado de células multipotentes mesenquimais estromais de tecido adiposo, tubas uterinas e músculo esquelético obtidos de uma mesma doadora
4. Identificar proteínas diferentemente expressas entre as culturas que possam sugerir a melhor aplicação de uma linhagem celular para uma determinada abordagem terapêutica.

III. Materiais e Métodos

1. Obtenção e cultivo das linhagens de CTMs

Três tecidos de mesmo doador (adiposo, músculo esquelético, e tubas uterinas) de 5 indivíduos (totalizando 15 amostras) foram obtidos de procedimentos de histerectomia total abdominal após o consentimento livre e esclarecido dos doadores conforme o protocolo apresentado ao comitê de ética (Anexo I). Os tecidos foram armazenados em PBS ou meio DMEM com 4% de antibióticos a 4 °C e processados dentro de 24 horas após a coleta. A digestão do tecido foi realizada como descrito (Zuk et al., 2001), mas com menores quantidades de material de cada tecido (tecido adiposo: ~ 10 mg; tubas uterinas: ~ 2 mg; tecido muscular: ~ 1 mg). Os tecidos foram cortados em pequenos pedaços com bisturis e incubados com 1 mg/mL de collagenase tipo II (Sigma Aldrich) numa mistura 1: 3 de proporção (peso do tecido: volume de collagenase) diluído em DMEM-F12 com 20% soro fetal bovino (FBS), 1% de aminoácidos não essenciais (GIBCO) e 1% de antibiótico / antimicótico (Gibco) e incubados a 37 °C durante 30-40 minutos, num agitador, a 250 RPM. Após a digestão, as células foram centrifugadas a 500 xg por 5 minutos e o precipitado obtido foi plaqueado. As células foram cultivadas em meio DMEM F-12 com 20% de FBS, 1% NEAA e 1% de antibióticos / antimicótico até a terceira passagem e em seguida, congeladas.

2. Caracterização celular

As células foram caracterizadas segundo Zuk et al (2001). As linhagens de células multipotentes mesenquimais estromais (CTMs) foram analisadas por citometria de fluxo (sistema GuavaExpressPlus) para expressão de proteínas de superfície celular CD105, CD73, CD90, CD45, CD34, CD29, CD31, CD29 e HLA-DR). Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da BD biosciences.

Para confirmação das propriedades das CTM, as células aderentes (passagem 6, com 80-90% de confluência) foram submetidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica *in-vitro*.

As diferenciações celulares foram feitas em placas de cultura de 24 poços. Foram plaqueadas 3×10^4 células por poço e utilizados meios comerciais de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica segundo recomendações do fabricante (Invitrogen). Já os controles experimentais foram cultivados em meio de proliferação celular DMEM-LG (Dulbecco's modified Eagle's medium - low glucose ; Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de antibiótico (Gibco). Ao final da diferenciação foram realizadas as colorações de azul de toluidina para diferenciação condrogênica, alizarin red para diferenciação osteogênica e oil red para diferenciação adipogênica (Secco et al., 2008). A aquisição das imagens dos cultivos celulares foi realizada com auxílio do software AxioVision LE, versão 4.8.2.0.

3. Cultura celular e obtenção dos meios condicionados

As células foram cultivadas até atingirem a passagem 6, utilizando 6 garrafas de 225 cm² (Corning) na qual foram plaqueadas em uma concentração de 5000 células por cm² e mantidas até a confluência de aproximadamente 80%. No momento da coleta do meio condicionado a viabilidade das células foi analisada por diluição em solução de trypan blue 0,4% (Life Technologies) e quantificação em contador de células automático Countess (Invitrogen). O meio de cultura utilizado foi DMEM low glucose com 10% de HyClone (soro fetal bovino cujos componentes são definidos; Thermo Scientific) e 1% de antibiótico. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas logo em seguida com 32mL de meio de cultura em cada garrafa preparado sem soro fetal bovino. Após 8 horas de condicionamento, foi realizada uma nova lavagem para retirada de lisados celulares e um novo condicionamento foi feito por 20 horas, e este último foi utilizado para as análises.

4. Concentração dos meios condicionados

Após o período de condicionamento, o meio de cultura foi centrifugado a 500 xg por 10 minutos em tubos de 50mL para a retirada dos restos celulares, e filtrado logo em seguida em uma membrana de 0,22 µm (Stericup&Steritop; Millipore). Para concentrar este meio condicionado, foram utilizados filtros Amicon Ultra - Ultracel 3K (Millipore), que foram previamente lavados com água MilliQ em uma centrifugação a 400xg por 10 minutos. A concentração seguiu o protocolo do fabricante e as amostras foram centrifugadas várias vezes (30 minutos a 400xg), até atingirem um volume de 2mL. As proteínas contidas no meio condicionado concentrado foram quantificadas através da fluorescência do aminoácido triptofano.

5. Fluxo de trabalho adotado a partir da obtenção dos meios condicionados

Após a obtenção do meio condicionado e sua concentração, 400 µg de proteínas totais de cada uma das linhagens celulares foram submetidos ao isolamento de proteínas glicosiladas e, a partir deste, 2µg de proteínas glicosiladas resultantes foram submetidas à digestão e posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS-MS). Os meios condicionados contendo as proteínas totais também foram submetidos à digestão, sendo que 100µg de proteína total foram digeridos, como demonstrado no esquema da figura 1.

Figura 1. Esquema demonstrando o fluxo de trabalho adotado a partir do meio condicionado total até a análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS-MS).

6. Quantificação protéica

As análises foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC) com detector de fluorescência (H-ClassBio, Waters). A quantificação pelo método do triptofano foi realizada por injeção em fase móvel de água a um fluxo de 0,3 mL/mL e detectadas com comprimento de emissão de 295 nm e de excitação de 350 nm. A curva de calibração foi preparada utilizando-se 4 concentrações de triptofano livre entre o intervalo de 5 µg/mL a 100 µg/mL. Neste ensaio, 15 µL de cada amostra foram solubilizados (1:4) em solução de uréia 8M em Tris-Cl 10 mM pH8.5. As concentrações protéicas foram determinadas aplicando-se um fator de conversão de 90 vezes entre triptofano livre e o conteúdo correspondente desse aminoácido nas proteínas totais humanas (Wiśniewski, Hein, Cox, & Mann, 2014).

7. Fracionamento do conteúdo proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

Para o fracionamento das amostras foi utilizado o NuPAGE® Bis-TrisPre-Castgels (Life Technologies) em um gradiente de poliacrilamida de 4–12% seguindo instruções do fabricante. Brevemente, as amostras (13 µL) foram diluídas em 5 µL de tampão de amostra e 2 µL de agente redutor e incubadas a 70 °C por 10 minutos. As amostras foram aplicadas ao gel e submetidas à eletroforese em tampão de corrida MOPS 1x por a 150 V por 50 minutos. Após a eletroforese, cada porção do gel equivalente a uma amostra foi dividida em 4 segmentos e posteriormente digeridas *in gel*.

8. Isolamento de proteínas glicosiladas

Na tentativa de aumentar a porcentagem de proteínas secretadas detectadas, foi realizado o isolamento de proteínas glicosiladas por afinidade à concanavalina (ConA) e aglutinina de gérmen de trigo (*wheat germ agglutinin*, WGA) (Glycoprotein isolation kit, ThermoScientific) como indicado pelo fabricante. Resumidamente, 200µg de proteínas contidas no meio condicionado total foram diluídas em tampão de ligação e lavagem e aplicadas à resina contendo ConA ou WGA. Após isso foram encubadas durante 10 minutos, lavadas e em seguida as glicoproteínas foram eluídas em tampão de eluição.

9. Digestão

9.1. Digestão em solução assistida por filtro

As amostras foram digeridas pelo método assistido por filtro (FASP) (Wiśniewski, Zougman, Nagaraj, & Mann, 2009a). Neste protocolo, as proteínas são retidas em um filtro AmiconUltra 0.5mL30K (Millipore) e sequencialmente reduzidas

com DTT (ditiotreitól), alquiladas com iodoacetamida, e digeridas com tripsina grau proteômico em uma proporção enzima:proteína de 1:50.

9.2. Digestão em solução assistida por RapiGest

As amostras foram digeridas em solução utilizando RapiGest (Waters) como agente surfactante. Neste protocolo, as proteínas foram reduzidas com DTT (ditiotreitól), alquiladas com iodoacetamida, e digeridas com tripsina grau proteômico em uma proporção enzima:proteína de 1:50.

9.3. Digestão *in gel*

As porções excisadas do gel foram digeridas como previamente descrito (http://lnbio.cnpem.br/massspectrometry/files/2012/11/Protocolo_digest%C3%A3o-em-gel-MAS.pdf), no qual, brevemente, o gel foi desidratado utilizando acetonitrila (100%), reduzido com solução de DTT 10 mM e alquilados em solução de IAA 50 mM. O tampão utilizado foi bicarbonato de amônio 100 mM e as amostras foram digeridas utilizando tripsina (12,5 ng/μL) overnight a 37°C.

10. Adaptação do protocolo de quantificação absoluta baseada na intensidade dos íons precursores

Após a digestão, foram adicionados às amostras dos meios condicionados totais 200 fmol de enolase de levedura e 2000 fmol de álcool desidrogenase de levedura (Waters MassPREP™). Já às proteínas glicosiladas isoladas, foram adicionados 4 fmol de enolase de levedura e 40 fmol de álcool desidrogenase de levedura (Waters MassPREP™).

11. Processamento das amostras e análise do perfil protéico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem

As amostras foram processadas por um sistema nanoAcquity composto por uma bomba binária, uma bomba auxiliar e um amostrador. Os peptídeos foram

capturados, dessalinizados e concentrados em uma coluna de captura Symmetry C18 (180 μm $\times$ 20 mm, 5 μm) por meio de uma fase móvel composta por água com 0,1% de ácido trifluoroacético a um fluxo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 5 minutos. Em seguida, os peptídeos foram separados em uma coluna analítica HSS C18 (75 μm $\times$ 150 mm, 1.7 μm) pela eluição por um gradiente linear de 2 % de DMSO em água com 0,1 % de ácido fórmico e 5 % de DMSO em acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico. A proporção da solução orgânica foi elevada de 0 a 60 % em 80 minutos.

O sistema cromatográfico é diretamente acoplado a um espectrômetro de massas em tandem do tipo Q-Exactive (ThermoScientific), equipado com uma fonte do tipo nano-eletrospray, um quadrupolo para seleção de íons precursores, um dispositivo de armazenamento de íons para injeções pulsadas (C-Trap), uma célula de colisão para experimentos de HCD (*Higher Energy Collisional Dissociation*), e um analisador do tipo Orbitrap para análise de massas por transformada de Fourier. As aquisições dos dados espectrais foram obtidas pelo modo de aquisição dd-MS² (Top15), que compreende uma varredura completa seguida de uma aquisição dependente de dados dos 15 íons mais intensos (excetuando os mono carregados e aqueles com cargas superiores a 7), com a aplicação de uma energia de colisão normalizada de 35.

12. Planejamento e aquisição dos dados de proteômica shotgun

As amostras tanto do meio condicionado total quanto das proteínas glicosiladas isoladas foram aleatorizadas em bloco para aquisição de suas replicatas técnicas (aquisições repetidas de uma mesma amostra biológica). As amostras dos meios condicionados totais foram adquiridas em seis replicatas técnicas, já as proteínas glicosiladas isoladas foram adquiridas em três replicatas técnicas. O espectrômetro de massas em tandem do tipo Q-Exactive (ThermoScientific) foi calibrado no modo positivo no início de cada sequência analítica.

As sequências analíticas tiveram início após a aquisição de extrato de linhagem celular humana Mino (new mantle cell lymphoma) para controle de qualidade de número de proteínas identificadas (Lai et al., 2002).

13. Processamento dos dados proteômicos

Os dados adquiridos foram processados pelo programa MaxQuant(Cox & Mann, 2008) especificamente desenhado para dados de alta resolução e quantitativos. A identificação protéica foi realizada pela ferramenta de busca Andromeda utilizando o banco de dados do proteoma humano UniProtKB (SwissProt novembro 2014). Os seguintes parâmetros foram aplicados na identificação: permissão de no máximo duas clivagens incompletas pela tripsina, modificação fixa por carbamidometilação das cisteínas e modificações variáveis por acetilação da porção N-terminal e oxidação da metionina. A quantificação foi baseada na estratégia sem marcação (Label-freequantification- LFQ) e na adaptação da estratégia iBAQ (Schwanhäusser et al., 2011)para a obtenção das concentrações protéicas.

Foi realizada uma validação cruzada da identificação protéica por meio da plataforma *Trans-Proteomic Pipeline* (TPP) utilizando o x!Tandem como ferramentas de busca e aplicando os mesmos parâmetros usados na análise pelo Andromeda/MaxQuant.

14. Análise dos dados

A análise das amostras foi realizada de duas maneiras. As amostras foram agrupadas conforme seu tecido de origem (comparação entre tecidos) ou agrupadas conforme seu doador (comparação entre indivíduos). Como demonstrado na figura 2.

Figura 2. Esquematização dos agrupamentos para análise de dados

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o teste-t, considerando significativas as análises com $p < 0.05$ utilizando a correção de Bonferroni no ambiente R (R Development Core Team (2008)). As proteínas consideradas diferencialmente expressas significativamente foram curadas e somente consideradas para as análises posteriores caso obtivessem probabilidades acima de 95% no módulo Protein Prophet do sistema x!tandem/TPP.

15. Análise funcional por biologia de sistemas

As análises de biologia de sistemas foram realizadas através do software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). O banco de dados de referência utilizado foi o Ingenuity Knowledge Base (Genes) incluindo somente relações diretas considerando moléculas e relações na espécie humana e observadas experimentalmente.

IV. Resultados

1. Caracterização das CTMs

1.1. Diferenciação celular

Para confirmação das propriedades das CTM, as células aderentes (passagem 6, com 80-90% de confluência) foram submetidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica *in-vitro*. O que podemos observar na Figura 3.

Figura 3. Diferenciação das CTMs em adipócito, condrócito e osteoblastos para caracterização das mesmas. As imagens das diferenciações em adipócito, osteoblastos e os controles não diferenciados foram adquiridas em aumento de 20 vezes. As diferenciações em condrócitos foram adquiridas no aumento de dez vezes, com exceção das linhagens CTM T9, T24 e T29, as quais foram adquiridas em aumento de 4 vezes.

As células utilizadas foram caracterizadas como células multipotentes mesenquimais estromais quanto ao seu potencial de diferenciação para as três linhagens celulares (adipócito, condrócito e osteoblasto).

1.2. Expressão de proteínas de superfície celular

As linhagens de células mesenquimais (CTMs) foram analisadas por citometria de fluxo (sistema GuavaExpressPlus) para expressão de proteínas de superfície celular CD105, CD73, CD90, CD45, CD34, CD29, CD31, CD29 e HLA-DR. A porcentagem de células marcadas positivamente para estas proteínas está representada na tabela 1.

Tabela 1. Caracterização das CTMs por imunofenotipagem: linhagem caracterizada, proteína analisada e porcentagem de marcação positiva para cada marcador: CTM é equivalente à célula mesenquimal estromal; a última letra de cada sigla equivale ao tecido de obtenção, tecido adiposo (A), músculo esquelético (M) e tubas uterinas (T); e o número identifica o doador das células.

Linagem celular	Marcador de Superfície	Porcentagem de células marcadas positivamente	Linagem celular	Marcador de Superfície	Porcentagem de células marcadas positivamente
CTMA25	CD34	0,21%	CTMT25	CD29	99,87%
CTMA25	CD45	3%	CTMT25	CD90	99,80%
CTMA25	CD31	0,99%	CTMT25	CD73	99,78%
CTMA25	HLA DR	1,35%	CTMT25	CD105	100%
CTMA25	CD29	99,90%	CTMM29	CD29	98,67%
CTMA25	CD90	98,50%	CTMM29	CD90	99%
CTMA25	CD73	99,90%	CTMM29	CD73	99,50%
CTMA25	CD105	100%	CTMM29	CD105	100%
CTMA29	CD34	0,48%	CTMA30	CD34	0,21%
CTMA29	CD45	3,58%	CTMA30	CD45	3,50%
CTMA29	CD31	2%	CTMA30	CD31	2,20%
CTMA29	HLA DR	0,80%	CTMA30	HLA DR	0,90%
CTMA29	CD29	98%	CTMA30	CD29	99,50%
CTMA29	CD90	98%	CTMA30	CD90	99,50%
CTMA29	CD73	99%	CTMA30	CD73	99,10%
CTMA29	CD105	99,80%	CTMA30	CD105	99,79%
CTMA9	CD34	0,21%	CTMA24	CD34	0,37%
CTMA9	CD45	3,27%	CTMA24	CD45	2,45%
CTMA9	CD31	1,30%	CTMA24	CD31	1,78%
CTMA9	HLA DR	0,90%	CTMA24	HLA DR	1%
CTMA9	CD29	99,70%	CTMA24	CD29	99%
CTMA9	CD90	98%	CTMA24	CD90	97%
CTMA9	CD73	99,20%	CTMA24	CD73	100%
CTMA9	CD105	99,87%	CTMA24	CD105	99%
CTMM25	CD34	0,29%	CTMT29	CD34	0,50%
CTMM25	CD45	2,20%	CTMT29	CD45	4,89%
CTMM25	CD31	1%	CTMT29	CD31	0,90%
CTMM25	HLA DR	0,58%	CTMT29	HLA DR	0,47%
CTMM25	CD29	100%	CTMT29	CD29	99%
CTMM25	CD90	99,50%	CTMT29	CD90	99%
CTMM25	CD73	100%	CTMT29	CD73	98,46%
CTMM25	CD105	99,50%	CTMT29	CD105	99%
CTMM29	CD34	0%	CTMM30	CD34	0,10%
CTMM29	CD45	3,27%	CTMM30	CD45	4,50%
CTMM29	CD31	1,20%	CTMM30	CD31	1,26%

Linhagem celular	Marcador de Superfície	Porcentagem de células marcadas positivamente	Linhagem celular	Marcador de Superfície	Porcentagem de células marcadas positivamente
CTMM29	HLA DR	1%	CTMM30	HLA DR	0,69%
CTMM30	CD29	99,78%	CTMM30	CD105	99,78%
CTMM30	CD90	100%	CTMT30	CD34	0,43%
CTMM30	CD73	99,50%	CTMT30	CD45	4%
CTMM9	CD34	0,34%	CTMM24	CD34	0%
CTMM9	CD45	4%	CTMM24	CD45	3%
CTMM9	CD31	1,50%	CTMM24	CD31	2,50%
CTMM9	HLA DR	0,75%	CTMM24	HLA DR	0,34%
CTMM9	CD29	99%	CTMM24	CD29	98%
CTMM9	CD90	99%	CTMM24	CD90	98%
CTMM9	CD73	97%	CTMM24	CD73	99%
CTMM9	CD105	100%	CTMM24	CD105	99,90%
CTMT25	CD34	0,20%	CTMT30	CD31	1,50%
CTMT25	CD45	3,40%	CTMT30	HLA DR	0,50%
CTMT25	CD31	1,20%	CTMT30	CD29	100%
CTMT25	HLA DR	0,28%	CTMT30	CD105	99,50%
CTMT30	CD90	98%	CTMT30	CD73	98%
CTMT9	CD34	0,21%	CTMT24	CD34	0,56%
CTMT9	CD45	5%	CTMT24	CD45	2,50%
CTMT9	CD31	1%	CTMT24	CD31	1,80%
CTMT9	HLA DR	0,10%	CTMT24	HLA DR	0,15%
CTMT9	CD29	98%	CTMT24	CD29	99,90%
CTMT9	CD90	99,50%	CTMT24	CD90	100,00%
CTMT9	CD73	99%	CTMT24	CD73	98%
CTMT9	CD105	99,80%	CTMT24	CD105	99,80%

Podemos observar que a imunofenotipagem das linhagens celulares foi homogênea para os marcadores de CTMs (marcação negativa para CD34, CD31, CD45 E HLA DR e positiva para CD29, CD90, CD73 e CD105).

2. Padronização da análise do secretoma de CTM por proteômica shotgun

2.1. Padronização da cultura para obtenção dos meios condicionados

Primeiramente, as células mantidas em cultura necessitam passar por um período de carenciamento, no qual não se utiliza soro fetal bovino (SFB) no meio de

cultura, para garantir que somente as proteínas por elas secretadas sejam obtidas para análise. Este período geralmente é de 24 horas para obtenção de quantidade protéica inicial satisfatória. Observou-se que durante as primeiras 8 horas de carenciamento havia muita morte celular, o que gera resíduos da membrana celular e liberação do conteúdo citoplasmático para o meio condicionado.

Desta forma, foi feita a avaliação do procedimento de carenciamento por proteômica *shotgun* e comparamos a porcentagem de proteínas identificadas secretadas do meio condicionado que foi carenciado de duas maneiras diferentes: carenciamento ininterrupto por 24 horas ou carenciamento prévio de 8 horas seguido de carenciamento de 20 horas. As proteínas foram identificadas como secretadas através da localização celular obtida pelo IPA (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação da porcentagem de proteínas secretadas utilizando carenciamento ininterrupto de 24 horas (SEM pré-carenciamento) ou pré-carenciamento de 8 horas acrescido de carenciamento de 20 horas (COM pré-carenciamento).

	Com pré-carenciamento	Sem pré-carenciamento
Porcentagem de proteínas secretadas	21,23%	10,88%

Assim sendo, foi observada maior quantidade de proteínas secretadas utilizando o protocolo com pré-carenciamento e, por este motivo, ele foi adotado para a obtenção do meio condicionado de todas as amostras.

2.2. Digestão

Dois protocolos de digestão em solução livre foram avaliados para verificar qual produziria o maior número de proteínas identificadas. O método assistido por filtro (FASP)(Wiśniewski et al., 2009), possui algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais: 1) O extrato digerido por FASP está livre de ácidos nucleicos e

outros componentes celulares; 2) O método pode ser aplicado em amostras contendo uma alta concentração de detergentes; 3) Não há precipitação e a concentração da amostra é mantida em níveis elevados. No entanto, esse protocolo exige quantidades maiores de proteínas. Foi feita a análise do perfil protéico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e comparamos o número de proteínas totais identificadas a partir de digestão utilizando o método FASP com um protocolo de digestão em solução livre assistido por RapiGest que é um detergente clivável e removido na última etapa do processamento (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação de número de proteínas totais obtidas pela digestão pelo método FASP ou assistida por RapiGest em solução.

	FASP	Solução
Proteínas totais	617	1360

Desta forma, foi possível observar que, apesar das vantagens do método FASP, devido às lavagens empregadas no protocolo, há muita perda protéica, desta forma, como trabalhamos com proteínas secretadas e solúveis, o método de digestão tradicional em solução demonstrou ser mais adequado para nossas amostras.

2.3. Fracionamento do extrato protéico

Na proteômica *shotgun* há a limitação dos equipamentos em relação ao intervalo dinâmico possível de ser atingido pelos analisadores de massas. Apenas os peptídeos mais abundantes eluídos em um determinado momento são selecionados para sequenciamento pelo espectrômetro de massas. O fracionamento protéico ou peptídico permite revelar peptídeos menos abundantes e conseqüentemente aumentar o número de proteínas identificadas. Por este motivo avaliamos um protocolo de fracionamento a nível protéico por eletroforese em gel unidimensional. Apesar de simples, o método é suscetível a

contaminações. Entretanto, a inserção de muitas etapas de manipulação pode aumentar a variabilidade na quantificação protéica livre de marcação.

Tabela 4. Comparação entre o número de proteínas totais encontradas em amostra submetida ao fracionamento (fracionada) ou não(não-fracionada).

	Fracionada	Não-Fracionada
Proteínas totais	1217	940

A comparação dos números de proteínas identificadas nas amostras submetidas ao fracionamento por eletroforese ou não (Tabela 4), indicou um pequeno acréscimo no primeiro protocolo. Entretanto, o pequeno ganho observado não justificaria a aplicação dessa estratégia por exigir maior manuseio das amostras e potencialmente aumentar a variabilidade dos resultados.

2.4. Isolamento de proteínas glicosiladas

Foi realizado o isolamento de proteínas glicosiladas pela afinidade por ConA e WGA, uma vez que a glicosilação protéica faz parte da via secretora. Assim sendo, foi feita a análise do perfil protéico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e comparamos a porcentagem de proteínas secretadas – obtidas pela localização celular através da ferramenta IPA (Ingenuity). A proporção de proteínas secretadas entre as análises de meios condicionados totais ou enriquecidos por afinidade (proteínas glicosiladas isoladas) é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Porcentagem de proteínas secretadas encontradas no meio condicionado total ou nas proteínas glicosiladas isoladas.

	Meio total	condicionado	Proteínas glicosiladas isoladas
Porcentagem de proteínas secretadas	1217		940

Observa-se que o percentual de proteínas secretadas a partir das proteínas glicosiladas isoladas é superior ao percentual de proteínas identificadas a partir do meio condicionado total.

3. Controle de qualidade de aquisição de dados

As amostras foram submetidas à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e os dados adquiridos foram analisados quanto ao erro de detecção de massas em partes por milhão (ppm), número de peptídeos inequívocos identificados, coeficiente de variação dos dados das concentrações protéicas obtidas e intervalo dinâmico das concentrações protéicas obtidas. Estes dados demonstram a qualidade da aquisição das amostras. A reprodutibilidade dos resultados foi confirmada observando as proteínas identificadas entre triplicatas de uma mesma amostra. Estas análises foram realizadas tanto para as aquisições das proteínas totais do meio condicionado quanto para as proteínas glicosiladas isoladas.

Para que os peptídeos sejam identificados adequadamente, o erro de massas entre a massa detectada e a massa teórica real dos peptídeos aceito deve ser o menor possível, como representado na figura 4.

Figura 4. Erro de massas dos peptídeos identificados em partes por milhão.

Foi possível observar que 74,42% dos peptídeos analisados obtiveram um erro de massas menor que 1 ppm, e o erro máximo encontrado foi de 4,38 ppm caracterizando alta qualidade dos dados obtidos.

3.1. Meio Condicionado Total

A identificação protéica é feita a partir de peptídeos únicos e peptídeos *razor* (peptídeos compartilhados por proteínas de um mesmo grupo). Quanto maior o número de peptídeos únicos em uma proteína, maior a probabilidade de esta proteína estar realmente presente na amostra e em abundância. Assim, podemos ver o número de peptídeos únicos por proteína identificada na figura 5.

Figura 5. Número de peptídeos únicos por proteína identificada.

Foi observado que 460 proteínas das 715 identificadas (64,33%) das proteínas identificadas possuem no mínimo 2 peptídeos únicos.

A identificação protéica realizada pelo método *label-free*, que não utiliza marcação isotópica, resulta em quantificações protéicas relativas. Desta forma, foram utilizados os padrões de digestão de maneira semelhante à quantificação absoluta baseada na intensidade dos íons precursores (iBAQ), com a finalidade de determinar as abundâncias das proteínas identificadas, o que permite a identificação da estequiometria aproximada destas (Arike et al., 2012; Schwanhäusser et al., 2011).

Desta forma, foi calculado o intervalo dinâmico atingido pelas quantidades protéicas (Figura 6).

Figura 6. Intervalo dinâmico das quantidades das proteínas identificadas.

Podemos observar que o intervalo dinâmico atingido abrangeu 4 ordens de grandeza.

Para acessar a reprodutibilidade dos resultados, verificamos a presença ou ausência de proteínas em diferentes replicatas técnicas (Figura7).

Figura 7. Porcentagem de proteínas presentes em menos que três replicatas ou presentes em três ou mais replicatas.

Podemos observar que mais que 80% das proteínas identificadas estão presentes em três ou mais replicatas.

3.2. Proteínas Glicosiladas

O número de peptídeos únicos por proteína glicosilada está identificado na figura 8.

Figura 8. Número de peptídeos únicos por proteína glicosilada identificada.

Foi possível observar que 386 das 664(58,13%) proteínas identificadas possuem no mínimo 2 peptídeos únicos.

Foi analisado o intervalo dinâmico das quantidades de cada proteína em triplicatas de uma mesma amostra (Figura 9).

Figura 9. Intervalo dinâmico das quantidades das proteínas identificadas.

.Podemos observar que o intervalo dinâmico atingido abrangeu 3ordens de grandeza.

Para acessar a reprodutibilidade dos resultados, verificamos a presença ou ausência de proteínas em diferentes replicatas técnicas (Figura 10).

Figura 10. Porcentagem de proteínas presentes somente em uma entre 3 replicatas técnicas e presentes em duas ou mais replicatas.

Podemos observar que mais que 80% das proteínas identificadas estão presentes em três ou mais replicatas.

4. Comparação do secretoma de células mesenquimais de diferentes fontes de obtenção de mesmos indivíduos

Após o cultivo das CTMs, foi obtido o meio condicionado de cada uma das linhagens. A viabilidade de cada linhagem no momento do carenciamento pode ser observada na tabela 6.

Tabela 6. Viabilidade celular das linhagens de CTMs analisadas.(CTMA= isoladas do tecido adiposo; CTMT= isoladas a partir de tubas uterinas e CTMM isoladas do tecidomuscular esquelético. Os números correspondem à identificação dos indivíduos doadores das CTMs).

Linhagem celular	Viabilidade celular
CTMA9	96%
CTMM9	98%
CTMT9	97%
CTMA24	98%
CTMM24	99%
CTMT24	97%
CTMA25	95%
CTMM25	98%
CTMT25	95%
CTMA29	96%
CTMM29	96%
CTMT29	99%
CTMA30	98%
CTMM30	99%
CTMT30	95%

Após a obtenção dos meios condicionados, eles foram submetidos à análise protéica por proteômica shotgun como descrito previamente. Desta maneira foram

identificadas 1002 proteínas diferentes a partir do meio condicionado total e 612 proteínas diferentes a partir das proteínas glicosiladas isoladas em todas as amostras experimentadas.

4.1 Comparação do secretoma das CTMs em relação ao tecido de obtenção

a. Comparação quanto à presença ou ausência das proteínas entre diferentes tecidos de obtenção

Primeiramente comparamos as proteínas quanto à presença ou ausência entre os tecidos de obtenção das CTMs tanto no meio condicionado total quanto nas proteínas glicosiladas isoladas. Podemos notar na figura 11 o diagrama de Venn para o meio condicionado total e na figura 12 o diagrama de Venn para as proteínas glicosiladas isoladas.

Figura 11. Diagrama de Venn das proteínas do meio condicionado total entre as CTMs isoladas do tecido adiposo(CTM tecido adiposo), tubas uterinas (CTM tubas uterinas) e do tecido muscular esquelético (CTM músculo esquelético).

Observando o diagrama de Venn, podemos considerar que o conteúdo protéico do meio condicionado total das CTMs é muito semelhante em relação à presença ou ausência de proteínas, ou seja, há um grande número de proteínas em comum entre as fontes de obtenção das células. No entanto, dentre as proteínas identificadas como exclusivas de uma única fonte de obtenção, encontram-se proteínas secretadas que podem possuir relevância quando presentes no secretoma das células utilizadas na terapia celular para determinada doença. Na tabela 7 listamos as proteínas secretadas exclusivas de cada fonte (Chesler, Golde, Bersch, & Johnson, 1995; López-Alemany et al., 2003; Himmelfarb et al., 2004; Mukhina et al., 2000; Pennica et al., 1998; Pesson et al., 2014; Prunotto et al., 2013; Rose et al., 2013; Stefansson & Lawrence, 1996; Stief, Radtke, & Heimbürger, 1987; Wang et al., 2013; Xiong et al., 2012).

Tabela 7. Proteínas secretadas exclusivas observadas no meio condicionado total de CTMs de diferentes tecidos de obtenção, identificando: em qual tecido esta proteína é exclusiva (CTMA= isoladas do tecido adiposo; CTMT= isoladas a partir de tubas uterinas e CTMM isoladas do tecido muscular esquelético), o identificador protéico(ID), nome e funções anotadas.

Proteína exclusiva das células	ID da proteína	Nome da proteína	Funções
CTMM	O76076	WNT1-inducible-signaling pathway protein 2	Adesão celular, regulação do crescimento celular, inibição de morte celular
CTMM	P00749	Urokinase-type plasminogen activator	Quimiotaxia, adesão celular, proliferação, migração, reparo tecidual
CTMM	Q86UX2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5	Pode agir como supressor tumoral
CTMT	Q9NR99	Matrix-remodeling-associated protein 5	Já foi associada à câncer de pulmão
CTMT	Q7Z304	MAM domain-containing protein 2	Ligação à glicosaminoglicanos

Figura 12. Diagrama de Venn das proteínas glicosiladas isoladas entre as CTMs isoladas do tecido adiposo (CTM tecido adiposo), tubas uterinas (CTM tubas uterinas) e do tecido muscular esquelético (CTM músculo esquelético).

Observando o diagrama de Venn das proteínas glicosiladas isoladas, podemos considerar que o conteúdo protéico secretado pelas CTMs é muito semelhante em relação à presença ou ausência de proteínas, ou seja há um grande número de proteínas em comum entre as fontes de obtenção das células. Neste caso, dentre as proteínas identificados como exclusivas de uma única fonte de obtenção, encontram-se somente proteínas não caracterizadas ou não secretadas.

Em seguida, aprofundamos as comparações analisando a concentração das proteínas.

b. Comparação quantitativa do secretoma das CTMs entre diferentes tecidos de obtenção

i. Comparação quantitativa do meio condicionado total das CTMs entre diferentes tecidos de obtenção

Observamos no meio condicionado total 22 proteínas diferencialmente expressas significativamente entre os tecidos. Entre elas encontram-se proteínas intracelulares, proteínas que já foram encontradas em exossomos secretados em evidências experimentais que também utilizaram proteômica shotgun (www.nextprot.org).

Entre as proteínas descritas como secretadas que identificamos diferencialmente expressas observamos a proteína Periostina, a qual está ligada à adesão celular e também a mineralização (Coutu et al., 2008; Gillan et al., 2002; Shao et al., 2004). Pode ser observado (Figura 13) que as CTMs obtidas do tecido muscular esquelético são muito variáveis quanto à expressão desta proteína. Entretanto, notamos que as CTM do tecido adiposo tem aproximadamente duas vezes a expressão protéica da periostina das CTM das tubas uterinas.

Figura 13. Expressão da proteína POSTN (periostina) nos diferentes tecidos de obtenção das CTMs. (CTMA= isoladas do tecido adiposo; CTMT= isoladas a partir de tubas uterinas e CTMM isoladas do tecido muscular esquelético). ** $p < 0.01$.

Também foi identificada a expressão diferencial da proteína ADAMTS1 (*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1*), que está relacionada à regulação negativa da angiogênese e da proliferação celular (Batra et al., 2012; Chesler et al., 1995; S. Y. Lee et al., 2014; Opbroek, Kenney, & Brown, 1993; Ries, 2014; Sato et al., 1994; Toricelli, Melo, Peres, Silva, & Jasiulionis, 2013; Vázquez et al., 1999). Podemos observar que sua quantidade (Figura 14), apesar de variável, em média encontra-se aumentada aproximadamente cinco vezes em CTMs obtidas do tecido adiposo se comparadas à CTMs das tubas uterinas.

Figura 14. Expressão da proteína ADAMTS1 nos diferentes tecidos de obtenção das CTMs.(CTMA= isoladas do tecido adiposo; CTMT= isoladas a partir de tubas uterinas e CTMM isoladas do tecido muscular esquelético).** $p < 0.01$.

ii. Comparação quantitativa das proteínas glicosiladas isoladas das CTMs entre diferentes tecidos de obtenção

As proteínas já observadas como secretadas na literatura, tanto no meio extracelular quanto em exossomos que foram identificadas como significativamente diferencialmente expressas nas CTMs dos diferentes tecidos estão listadas na tabela 8.

Tabela 8. Proteínas possivelmente secretadas diferencialmente expressas nas proteínas glicosiladas isoladas de CTMs de diferentes tecidos de obtenção:identificador da proteína (ID),nome e funções anotadas.

ID da proteína	Nome	Funções
P06733	Alpha-enolase	Regulação negativa do crescimento celular, tolerância a hipóxia, pode ser um supressor tumoral
P10809	60 kDa heat shock protein	Regula apoptose, ativa linfócitos T e B, regula positivamente interferon- α e γ , IL-10, IL-12 e IL-6
O75095	EGF-like 3	Ligação a cálcio
P01024	Complement factor 3	Regula positivamente angiogênese, quimiotático para neutrófilos em inflamações crônicas, estimula adipogênese, remoção de células apoptóticas
P29279	Connective tissue growth factor	Regula angiogênese, diferenciação, proliferação, adesão e migração celular

Em seguida, analisamos qual tecido possui maior ou menor quantidade de cada uma destas proteínas (Figuras 15, 16, 17, 18 e 19).

Figura15. Expressão da proteína ENO 1 (*alpha-enolase*) nas CTMs obtidas de diferentes tecidos.(CTMA= isoladas do tecido adiposo; CTMT= isoladas a partir de tubas uterinas e CTMM isoladas do tecido muscular esquelético). ** $p < 0.01$.

Quanto à quantidade da proteína ENO 1 (*alpha-enolase*), que pode ser um supressor tumoral e está associada à diminuição do crescimento celular, podemos observar que CTMs oriundas do tecido adiposo possuem menor quantidade se comparadas à CTMs do tecido muscular esquelético (Bottermann, Reinartz, Barsoum, Kötter, & Gödecke, 2013; Kang, Jung, Kim, & Chung, 2008; López-Alemany et al., 2003; Pancholi, 2001).

Figura16. Expressão da proteína HSP60 (60KDa *Heat Shock Protein*) nas CTM obtidas de diferentes tecidos (CTMA= isoladas do tecido adiposo; CTMT= isoladas a partir de tubas uterinas e CTMM isoladas do tecido muscular esquelético). ** $p < 0.01$.

A proteína HSP60, está associada à regulação da apoptose, ativação de linfócitos T e B, regulação positiva de interferon- γ , interferon- α e interleucinas IL-10, IL-12 e IL-6, e é considerada uma ativadora do sistema imune e do processo da apoptose (Chandra, Choy, & Tang, 2007; Cohen-Sfady et al., 2005; Ghosh, Dohi, Kang, & Altieri, 2008; Magen et al., 2008; Osterloh, Kalinke, Weiss, Fleischer, & Breloer, 2007; Osterloh, Veit, Gessner, Fleischer, & Breloer, 2008). Podemos

observar que CTMs oriundas do tecido adiposo possuem menor quantidade se comparadas à CTMs do tecido muscular esquelético ou às CTMs das tubas uterinas.

Figura17. Expressão da proteína *EGF-like 3* nas CTMS obtidas de diferentes tecidos (CTMA= isoladas do tecido adiposo; CTMT= isoladas a partir de tubas uterinas e CTMM isoladas do tecido muscular esquelético). ** $p < 0.01$.

A proteína *EGF-like 3*, a qual se liga à cálcio, apresentou quantidades muito variáveis nas CTMs isoladas do tecido muscular (Imielinski et al., 2012; Kim et al., 2012). As CTMs oriundas do tecido adiposo possuem quantidade significativamente maior quando comparadas à CTMs das tubas uterinas, embora ambas as concentrações sejam muito baixas.

Figura 18. Expressão da proteína C3 nas CTMS obtidas de diferentes tecidos (CTMA= isoladas do tecido adiposo; CTMT= isoladas a partir de tubas uterinas e CTMM isoladas do tecido muscular esquelético). * $p < 0.05$.

A proteína C3, a qual regula positivamente a angiogênese, é um quimiotático para neutrófilos em inflamações crônicas, estimula adipogênese e a remoção de células apoptóticas (Onat, Hergenç, Can, Kaya, & Yüksel, 2010), apresentou um padrão semelhante ao encontrado para a proteína EGF-like 3: as CTMs isoladas do tecido muscular possuem quantidades desta proteína extremamente variáveis, as CTMs oriundas do tecido adiposo possuem maior quantidade significativamente quando comparadas à CTMs das tubas uterinas, embora ambas sejam muito baixas.

Figura 19. Expressão da proteína CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) nas CTMS obtidas de diferentes tecidos. (CTMA= isoladas do tecido adiposo; CTMT= isoladas a partir de tubas uterinas e CTMM isoladas do tecido muscular esquelético).
* $p < 0.05$.

Em relação à proteína CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*), a qual regula angiogênese, diferenciação de condrócitos, proliferação, adesão e migração celular (Ball, Rachfal, Kemper, & Brigstock, 2003; Hoshijima et al., 2006; Igarashi, Bradham, Okochi, & Grotendorst, 1992; Nakanishi et al., 2000), podemos observar que CTMs isoladas do tecido muscular possuem quantidades muito variáveis e que as CTMs oriundas do tecido adiposo possuem maior quantidade significativamente quando comparadas à CTMs das tubas uterinas.

Assim sendo, podemos considerar que há expressão diferencial de proteínas relacionadas a funções relevantes em possíveis terapias. As CTMs do tecido muscular apresentaram quantidades de algumas destas proteínas extremamente variáveis, desta maneira não apresentando uma diferença estatística significante.

4.2. Comparação do secretoma das CTMs de diferentes doadores

a. Comparação quanto à presença ou ausência das proteínas no secretoma das CTMs de diferentes doadores

Primeiramente comparamos as proteínas quanto à presença ou ausência entre as CTMs a depender de seus doadores tanto no meio condicionado total quanto nas proteínas glicosiladas isoladas. A figura 20 o diagrama de Venn das proteínas identificadas no meio condicionado total e na figura 21 o diagrama de Venn para as proteínas glicosiladas isoladas.

Figura 20. Diagrama de Venn das proteínas do meio condicionado total entre as CTMs isoladas dos três tecidos de obtenção dos cinco indivíduos doadores. Indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30(I30).

O diagrama de Venn mostra que o conteúdo proteico secretado pelas CTMs é muito semelhante, uma vez que existem muitas proteínas em comum entre o secretoma dos doadores. Dentre as proteínas identificadas como exclusivas de um único doador, encontram-se proteínas intracelulares ou que foram identificadas pelo ProteinProphet com probabilidade próxima a 0%, assim consideramos que a identificação destas proteínas foi pouco confiável e, portanto, elas foram desconsideradas nas análises subsequentes.

Figura 21. Diagrama de Venn das proteínas glicosiladas isoladas entre as CTMs isoladas dos três tecidos de obtenção dos cinco indivíduos doadores. Indivíduo 9 (I9), indivíduo 24 (I24), indivíduo 25 (I25), indivíduo 29 (I29) e indivíduo 30 (I30).

O diagrama de Venn mostra que o conteúdo protéico secretado pelas CTMs é muito semelhante, uma vez que existem muitas proteínas em comum entre o secretoma dos doadores. Dentre as proteínas identificadas como exclusivas de um único doador, encontram-se proteínas intracelulares ou que foram identificadas pelo

ProteinProphet com probabilidade próxima a 0%, assim consideramos que a identificação destas proteínas foi pouco confiável e, portanto, elas foram desconsideradas nas análises subseqüentes. Somente a proteína PTMA (*Prothymosin alpha*), encontrada somente no secretoma do indivíduo 24 foi identificada com 95 % de probabilidade (Protein Prophet). Ela já foi encontrada em estudos proteômicos de exossomos e é relacionada à proliferação de linfócitos t (Elizondo-Riojas, Chamow, Tuthill, Gorenstein, & Volk, 2011; Eschenfeldt & Berger, 1986; Eschenfeldt, Manrow, Krug, & Berger, 1989; Gómez-Márquez et al., 1989; Pan et al., 1986; Vareli, Frangou-Lazaridis, van der Kraan, Tsolas, & van Driel, 2000).

Em seguida analisamos a quantidade das proteínas nos diferentes doadores.

b. Comparação quantitativa do secretoma das CTMs de diferentes doadores

i. Comparação quantitativa do meio condicionado total das CTMs de diferentes doadores

Foram observadas no meio condicionado total 65 proteínas diferencialmente expressas significativamente entre os indivíduos. Entre elas encontram-se proteínas intracelulares, outras proteínas já foram encontradas em exossomos secretados em evidências experimentais de proteômica shotgun (www.nextprot.org).

As proteínas descritas como secretadas que foram identificadas diferencialmente expressas encontram-se listadas na tabela 9 (Batra et al., 2012; Chamberlain et al., 2008; Contente, Kenyon, Sriraman, Subramanyan, & Friedman, 1999; Grossman et al., 2010; Hämäläinen et al., 1991; Han et al., 2012; Imielinski et al., 2012; Itoh, Kimoto, Imaizumi, & Nakatsuka, 2007; Kim et al., 2012; Kimura, Yoshioka, Konishi, Miyake, & Itoh, 2005; G. W. Lee, Goodman, Lee, & Vilcek, 1994; S. Y. Lee et al., 2014; Lindahl et al., 2011; Malfait et al., 2006; Mantovani, Garlanda, & Bottazzi, 2003; Opbroek et al., 1993; Pollitt et al., 2006; Pomponio et al., 1997; Ries, 2014; Sánchez-Morgan, Kirsch, Trackman, & Sonenshein, 2011; Swango et al., 1998; Thorsen et al., 2013; Toricelli et al., 2013).

Tabela 9. Proteínas secretadas diferencialmente expressas no meio condicionado total de CTMs dos três tecidos de obtenção de diferentes doadores: identificador da proteína (ID), nome e funções anotadas.

ID	Nome	Função
Q9UMX5	<i>neudesin neurotrophic factor</i>	Envolvida na tumorigenese, fator neurotrófico, proliferação celular, neurogênese em progenitores neurais e inibição da diferenciação de astrócitos
P43251	<i>biotinidase</i>	Desenvolvimento do sistema nervoso central e da epiderme
P08123	<i>collagen, type I, alpha 2</i>	Organização da matriz extracelular, migração de leucócitos
P01033	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>	Eritropoiese, fator de crescimento, regula diferenciação, migração e morte celular
Q12805	<i>EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>	Adesão e migração celular, pode regular negativamente a diferenciação de condrócitos
P26022	<i>pentraxin 3, long</i>	Resposta imune inata, reações inflamatórias e fertilidade feminina
P28300	<i>lysyl oxidase</i>	Desenvolvimento de vaso sanguíneo, organização da matriz extracelular, cicatrização

A representação da quantidade de cada uma das proteínas secretadas diferencialmente pelas CTMs de cada doador encontra-se nas figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28.

Figura 22. Expressão da proteína Neudesin nos três tecidos de obtenção dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). *** $p < 0.0005$.

Figura 23. Expressão da proteína Biotinidase nos três tecidos de obtenção dos 5doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). * $p < 0.05$.

Figura 24. Expressão da proteína *Collagen tipo I* nos três tecidos de obtenção dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). *** $p < 0.0005$.

Figura 25. Expressão da proteína *TIMP Metalloproteinase Inhibitor 1* nos três tecidos de obtenção dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). * $p < 0.05$.

EGF Containing fibulin-like extracellular matrix protein 1

Figura 26. Expressão da proteína *EGF Containing fibulin-like extracellular matrix 1* nos três tecidos de obtenção dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). * $p < 0.05$.

Pentraxin 3

Figura 27. Expressão da proteína *Pentraxin* nos três tecidos de obtenção dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). * $p < 0.05$.

Figura 28. Expressão da proteína *Lysyl oxidase* nos três tecidos de obtenção dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). * $p < 0.05$.

É possível considerar para todas estas proteínas que as CTMs dos diferentes indivíduos possuem expressão bastante variada, que as quantidades protéicas oscilam em torno da média e que dois indivíduos se diferenciam entre si. Podemos notar, por exemplo, que o indivíduo I29 possui expressão diferenciada de outros doadores em diversas proteínas.

ii. Comparação quantitativa das proteínas glicosiladas isoladas das CTMs de diferentes doadores

O mesmo tipo de comparação foi realizado para as proteínas glicosiladas. A tabela 10 descreve as proteínas que foram descritas na literatura como secretadas,

seja no meio extracelular ou em exossomos, que foram identificadas diferencialmente expressas nas CTMs dos diferentes doadores (Dementiev, Dobó, & Gettins, 2006; Dente, Ciliberto, & Cortese, 1985; Dente, Rüther, Tripodi, Wagner, & Cortese, 1988; Gemelli et al., 2013; Itoh et al., 2007; Karanu et al., 2000; Le Friec et al., 2012; Lindner et al., 2001; Marques et al., 2013; Nickoloff et al., 2002; Schönfeld, Ravelli, Mueller, & Skerra, 2008; Stefansson & Lawrence, 1996; Treuheit, Costello, & Halsall, 1992; Winkler, Hendy, Coughlin, Horvath, & Lévesque, 2005; Wong et al., 2000; Yuasa et al., 1997; Zhu et al., 2002; Zimrin et al., 1996).

Tabela 10. Proteínas glicosiladas secretadas diferencialmente expressas no secretoma de CTMs de diferentes doadores: identificadores da proteína (ID), nome e funções anotadas.

ID	Nome	Função
P01009	<i>serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1</i>	Inibidora de protease, anti-tripsina
P02763	<i>orosomucoid 1</i>	Resposta inflamatória
P08123	<i>collagen, type I, alpha 2</i>	Coagulação sanguínea, organização da matriz extracelular, migração de leucócitos
P78504	<i>jagged 1</i>	Regula angiogênese, hematopoiese, proliferação, migração, diferenciação celular
Q92520	<i>family with sequence similarity 3, member C</i>	Envolvida na transição epitelial-mesenquimal

A representação da concentração de cada uma das proteínas secretadas diferencialmente pelas CTMs de cada doador encontra-se nas figuras 29, 30,31,32 e 33.

Figura 29. Expressão da proteína *Serpin Peptidase Inhibitor* nos três tecidos dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). * $p < 0.05$.

Figura 30. Expressão da proteína *Jagged 1* nos três tecidos dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). * $p < 0.05$, ** $p < 0,005$.

Figura 31. Expressão da proteína *Orosomucoid 1* nos três tecidos dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). ** $p < 0.005$.

Figura 32. Expressão da proteína COL1A2 (*CollagenType I*) nos três tecidos dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). * $p < 0.05$.

Family with sequence similarity 3, member C

Figura 33. Expressão da proteína FAM3C (*Family with sequence similarity 3, member C*) nos três tecidos dos 5 doadores das CTMs: indivíduo 9(I9), indivíduo 24(I24), indivíduo 25(I25), indivíduo 29(I29) e indivíduo 30 (I30). ** $p < 0.005$.

4.3. Agrupamento Hierárquico

Após estas averiguações, as amostras foram submetidas ao agrupamento hierárquico conforme as quantidades das proteínas identificadas, utilizando a distância Euclidiana e o *average linkage*. Na figura 34 consideramos as proteínas significativamente diferencialmente expressas do meio condicionado total e também das proteínas glicosiladas.

Figura 34. Agrupamento hierárquico baseado nas quantidades das proteínas identificadas no meio condicionado total e nas proteínas glicosiladas isoladas entre as CTMs isoladas do tecido adiposo (CTM.A), tubas uterinas (CTM.T) e do tecido muscular esquelético (CTM.M): indivíduo 9(9), indivíduo 24(24), indivíduo 25(25), indivíduo 29(29) e indivíduo 30 (30).

Em relação ao agrupamento hierárquico, podemos observar que as proximidades entre as linhagens celulares das CTMs são independentes tanto dos doadores como da origem dos tecidos.

4.4 Análise de vias enriquecidas

Em seguida, as proteínas em comum entre as diferentes CTMs foram analisadas quanto às suas vias enriquecidas com o auxílio da ferramenta de análise de sistemas biológicos do Ingenuity(IPA) (Tabela 11). A abordagem empregada baseada em proteômica *shotgun* revela uma fração da totalidade de proteínas secretadas pelas linhagens. Não obstante, por meio de enriquecimento funcional, informações acerca das funções biológicas das proteínas secretadas podem ser obtidas a partir desse subconjunto de dados (incluindo tanto aquelas que secretadas diferencialmente quanto às comuns a todas as fontes).

Tabela 11. Cinco principais funções biológicas enriquecidas nas proteínas glicosiladas isoladas(IPA)

Principais Funções Biológicas
Proliferação celular
Invasão celular
Movimento celular
Migração celular
Desenvolvimento do sistema cardiovascular

V. Discussão

1. Padronização de dados

Este projeto foi iniciado com o propósito de padronizar e analisar o secretoma de células multipotentes mesenquimais estromais humanas de várias fontes e diferentes doadores (CTMs). Uma vez que a técnica seja padronizada, ela poderá ser introduzida como forma de análise rotineira de linhagens celulares envolvidas em inúmeros projetos de pesquisa.

A análise dos dados mostrou que todas as etapas de preparo de amostra e de aquisição de dados foram padronizadas.

A análise do secretoma de quaisquer tipos de célula é de extremo interesse, pois pode revelar mecanismos de interação e sinalização celular importantes. Entretanto, para realizar-se uma análise criteriosa há grandes desafios. As CTMs necessitam ser cultivadas na presença de soro fetal bovino (SFB), o qual contém inúmeras proteínas em alta concentração, o que pode mascarar proteínas de interesse de fato secretadas pelas CTMs quando analisamos o meio condicionado destas células utilizando proteômica *shotgun*. Uma das estratégias para se evitar contaminação de proteínas do SFB é o cultivo das células por períodos de 12 a 48 horas em meio livre de soro, precedido por lavagens. Adicionalmente, a cultura celular é inevitavelmente acompanhada de morte celular. A ruptura das células promove a liberação do conteúdo citoplasmático para o meio de cultura, fato que pode ser agravado pelas etapas de lavagem e cultivo sem SFB. Dessa forma, as grandes quantidades de proteínas citoplasmáticas, liberadas para o sobrenadante, poderiam mascarar o sinal das moléculas secretadas (Zwickl et al., 2005).

Além disso, a porcentagem de proteínas secretadas obtidas em meios condicionados, geralmente estão pouco representadas, consistindo de 8 a 20% das proteínas totais identificadas (Kulasingam & Diamandis, 2007). Para contornar esse problema, as células foram submetidas ao carenciamento de SFB quando estavam

aproximadamente com 80% de confluência, momento no qual todas as linhagens utilizadas apresentavam uma viabilidade maior que 90%. O procedimento do pré-carenciamento de oito horas anterior à coleta do meio condicionado permitiu elevar a porcentagem de proteínas secretadas de 10,88% para 21,23%.

A digestão das amostras também foi padronizada, em solução utilizando o RapiGest como agente surfactante, pois este tipo de digestão apresentou um número maior de proteínas totais identificadas em comparação ao método de digestão assistida por filtro (FASP)(Wiśniewski, Zougman, Nagaraj, & Mann, 2009b).

Além disso, concluímos que com o fracionamento do conteúdo protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS não se obteve o aumento esperado no número total de proteínas identificadas. Este método consiste na aplicação do conteúdo protéico no gel de poliacrilamida e após a eletroforese, no corte manual de seus segmentos, isto adiciona grande variabilidade ao método. Para a aplicação deste fracionamento de forma quantitativa, o ideal seria utilizar um padrão interno com muitas proteínas de vários pesos moleculares diferentes. Uma vez que não dispomos deste tipo de padrão interno, o grande manuseio das amostras faz com que estes resultados sejam adequadamente utilizados somente de maneira qualitativa, portanto, o mesmo não constitui a técnica ideal de enriquecimento protéico buscada neste trabalho (Ludwig, Claassen, Schmidt, & Aebersold, 2012; Nesvizhskii, 2007)

Uma vez que o interesse deste trabalho são as proteínas secretadas, direcionamos os experimentos para promover o enriquecimento desse grupo de proteínas. A modificação pós-traducional mais comum na via de secreção é a glicosilação em resíduos de asparagina (N glicosilação) ou à resíduos de serina ou treonina (O glicosiladas), entretanto existem outros tipos de glicosilação, como a C glicosilação, que consiste na ligação covalente de um resíduo de manose a um resíduo de triptofano (Magnelli, Bielik, & Guthrie, 2011). Desta forma, o enriquecimento de proteínas glicosiladas pela purificação de proteínas N e O glicosiladas foi utilizado. Pudemos observar que esta estratégia aumentou aproximadamente em duas vezes o número de proteínas identificadas como secretadas (Tabela 6).

Vários parâmetros relacionados ao controle de qualidade das aquisições por proteômica shotgun foram avaliados. Quanto mais próximo o valor de massa obtido pelo equipamento do valor de massa real teórico das substâncias, menor seu erro e, portanto, maior confiança nas identificações realizadas. Comparando-se a qualidade dos dados obtidos com aqueles publicados na literatura (Liu, Bonner, & Emili, 2004; Tabb et al., 2010), podemos concluir que os dados adquiridos possuem erros de massa menores que erros obtidos com aquisições consideradas de alta acurácia (menor que 5 ppm) (“Dealing With the Masses: A Tutorial on Accurate Masses, Mass 32 Uncertainties, and Mass Defects | Spectroscopy,” n.d.).

Não há consenso quanto ao número mínimo de peptídeos únicos necessários para uma identificação proteica correta. A identificação baseada em vários peptídeos únicos aumenta a confiabilidade da identificação desta proteína. Entretanto, identificações baseadas em um peptídeo único não podem ser descartadas, visto que a identificação depende da confiabilidade da identificação dos peptídeos (Rohrbough, Brechi, Merchant, Miller, & Haynes, 2006; Swanson & Washburn, 2005). Sendo assim, vários autores observaram que a utilização de diferentes algoritmos de identificação tem mérito considerável em termos de níveis de confiança de identificação de proteínas (Domon & Aebersold, 2006; Pedrioli et al., 2004; Searle & Searle, 2002). Portanto, independente do número de peptídeos únicos, o desenho experimental deste trabalho inclui a identificação proteica e validação da identificação proteica através por duas plataformas que utilizam algoritmos diferentes. Um deles é o Andromeda que utiliza o método target-decoy (Elias & Gygi, 2007). Esta abordagem toma como base a correspondência entre as seqüências obtidas e uma base de dados de seqüências que são sabidamente incorretas. Isso permite calcular a taxa de falsas descobertas (FDR - do inglês False Discovery Rate) evitando considerar uma seqüência aleatória como um resultado correto na análise. A outra plataforma utiliza o PeptideProphet e ProteinProphet no ambiente PPT, que utiliza uma abordagem probabilística para identificação de proteínas. Utilizando o algoritmo de maximização da expectativa, a plataforma aprende a distinguir os resultados da busca corretos e incorretos, computando probabilidades que atribuem peptídeos para espectros baseados no score da busca e no número de resíduos tripticos (Keller, Nesvizhskii, Kolker, & Aebersold, 2002).

O método de descoberta *shotgun* leva à identificação de centenas à milhares de proteínas com intervalo dinâmico de 4 a 5 ordens de grandeza em um lisado celular completo. Entretanto, ele apresenta viés em relação à sensibilidade e reprodutibilidade. Normalmente, não é possível cobertura completa de proteínas e complexos envolvidos em uma mesma via de sinalização ou pertencentes à mesma família funcional. Espera-se uma a reprodutibilidade entre replicatas técnicas entre 30 e 60% na proteômica *shotgun* com quantificação livre de marcação (Liu et al., 2004; Tabb et al., 2010). Nossa padronização permitiu aumentar a reprodutibilidade técnica, pois foi possível identificar 83% das proteínas em ao menos 4 de 6 replicatas técnicas nos experimentos com meio condicionado total e 81% das proteínas em ao menos 2 das 3 replicatas técnicas nos experimentos onde o meio condicionado foi submetido ao enriquecimento de glicoproteínas.

Após estas considerações, é necessário também refletirmos sobre o tratamento dos resultados. A análise do secretoma por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas resulta em uma lista de proteínas e suas respectivas abundâncias. A tecnologia tem avançado para permitir a análise de um secretoma completo. Entretanto, atualmente, são necessárias ferramentas que possibilitem o entendimento destas listas protéicas a fim de traduzi-las em informações funcionais sobre a biologia subjacente à condição estudada. Uma das maneiras de se simplificar esta análise é a tentativa do agrupamento de proteínas individuais relacionadas, como o agrupamento das proteínas envolvidas em uma mesma via de sinalização (Glazko & Emmert-Streib, 2009). Para isto, utilizamos a plataforma para análise de vias enriquecidas IPA (version 9.0) baseado na “Ingenuity Knowledge Base”. Nele, as possíveis interações entre as proteínas incluem ligação, ativação, inibição e algumas outras descritas na literatura. Atualmente a análise de vias enriquecidas apresenta dificuldades. Existe a dependência das análises dos bancos de dados utilizados, sendo que muitos são incompletos e não devidamente revisados e atualizados. Encontram-se também problemas metodológicos, uma vez que estes bancos de dados não utilizam condições ou células específicas para a previsão das vias enriquecidas, pois, a maioria deles é construída baseada em experimentos realizados em diferentes tipos celulares, em diferentes tempos sob diferentes condições (Khatri, Sirota, & Butte, 2012).

2. Comparação do secretoma das CTMs

As células mesenquimais constituem uma população heterogênea de células, contendo inúmeras subpopulações (A.I. Caplan & Correa, 2012). Foi sugerido que a presença de certos marcadores de superfície celular pode denotar determinada função para àquela população de células. Por este motivo, com a variação da porcentagem e até mesmo da presença ou ausência de determinada população dentro das CTMs, o potencial modulatório e o perfil secretório das CTMs pode variar. Um exemplo disso foi relatado por Marble e col. (2014). Foram separadas dentre as CTMs, uma população positiva para fosfatase alcalina e outra negativa, sendo que a população que expressa esta molécula possui maior capacidade de diferenciação osteogênica (Marble et al., 2014). Uma vez que nosso grupo e inúmeros pesquisadores utilizam a população total das CTMs em diversas pesquisas pré-clínicas (Al-Nbaheen et al., 2013; Fischer et al., 2009; J. K. Lee et al., 2010; Pinheiro et al., 2012; Polacek et al., 2011; Romanov, Svintsitskaya, & Smirnov, 2003; Trounson et al., 2011; N. M. Vieira et al., 2012; Yu, Jun, Bae, & Jung, 2008; Zucconi et al., 2011) a abordagem inicial deste trabalho foi analisar o secretoma da população total heterogênea das CTMs, entretanto, devemos levar em consideração a possibilidade da variação do secretoma de acordo com as subpopulações presentes nas CTMs estudadas.

Assim sendo, dentre as proteínas identificadas, observamos um grande número de proteínas em comum nas três fontes de isolamento das CTMs. Nas quais foram identificadas vias enriquecidas relacionadas à migração, invasão e proliferação celular e desenvolvimento do sistema cardiovascular. Em relação a moléculas específicas, observamos a presença de grande quantidade de colágenos, lamininas, e inibidores de metaloproteinases, todas moléculas relacionadas à matriz extracelular. Também identificamos alguns fatores de crescimento como LTBP (*latent transforming growth factor binding proteins*) e elementos relacionados ao sistema imune e também à coagulação, como as SERPIN (*serpin peptidase inhibitors*).

Após a análise das moléculas compartilhadas pelas CTMs, foram realizadas análises com a finalidade de identificar as proteínas exclusivas ou diferencialmente

expressas entre os diferentes tecidos ou entre os doadores das CTMs, como resumido abaixo.

2.1. Comparação entre os tecidos de obtenção das CTMs

Análise da do meio condicionado total e das proteínas glicosiladas isoladas mostrou que o conteúdo protéico secretado pelas CTMs é muito semelhante em relação à presença ou ausência de proteínas. No entanto, dentre aquelas identificadas como tecido-específicas encontram-se proteínas secretadas que podem possuir relevância quando presentes no secretoma das células utilizadas na terapia celular para determinada doença.

Por exemplo, dentre as proteínas exclusivas, identificamos a ITIH5 (*Inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain*) somente nas CTMs isoladas do tecido muscular esquelético e a MXRA5 (*matrix-remodeling-associated protein 5*) exclusivamente nas CTMs das tubas uterinas. A ITIH5 é uma proteína que pode agir como supressor tumoral (Rose et al., 2013), enquanto a MXRA5 foi identificada como um novo biomarcador de câncer colorretal (Pesson et al., 2014; Wang et al., 2013).

Pesquisas com CTMs em câncer mostraram resultados contraditórios. Em estudos pré-clínicos em modelos murinos foram observados resultados nos quais as CTMs podem suprimir a evolução do tumor ou estimular o crescimento tumoral. Zhang e colaboradores demonstraram que CTMs retiradas da medula óssea podem diminuir o desenvolvimento de tumores metastáticos modulando o sistema imune dos camundongos (Zhang et al., 2015). Por outro lado, Yu e colaboradores demonstraram que CTMs do tecido adiposo favorecem o crescimento tumoral também em modelo murino (Yu et al., 2008).

Entre outros fatores, como qual linhagem tumoral foi utilizada e via de injeção das CTMs, estes efeitos contraditórios podem ser resultado de diferentes proteínas secretadas por estas CTMs utilizadas (Hong, Lee, & Kang, 2014). Uma pesquisa recente do nosso grupo (Jazedje et al., 2015) mostrou que CTM de tuba uterina podem agir inibindo ou estimulando o crescimento de adenocarcinoma em modelo murino, de acordo com o protocolo de injeções. Isso demonstra que o microambiente que as células encontram quando transplantadas é relevante para a ação das

células. As proteínas ITIH5 e MXRA5 não fazem parte da mesma via de sinalização, entretanto, podem possuir funções antagônicas em relação ao crescimento tumoral, como citado previamente. Comparação quantitativa das concentrações protéicas

A análise quantitativa demonstrou proteínas diferencialmente expressas entre os tecidos. Entre as proteínas secretadas diferencialmente expressas observamos, por exemplo, a proteína Periostina, a qual está ligada à adesão celular e também a mineralização. Podemos observar (Figura 19) que as CTMs obtidas do tecido muscular esquelético são muito variáveis quanto à expressão desta proteína. Entretanto, podemos notar que a expressão protéica nas CTM do tecido adiposo é aproximadamente duas vezes a expressão das CTM das tubas uterinas. Logo, em terapias para doenças degenerativas com comprometimento ósseo é possível que as CTMs do tecido adiposo sejam mais adequadas.

Também foi observada a diferença da expressão de ENO 1 entre as CTMs obtidas de diferentes tecidos. Esta proteína pode ser um supressor tumoral e está associada à diminuição do crescimento celular. É possível notar que CTMs oriundas do tecido adiposo possuem menor quantidade se comparadas à CTMs do tecido muscular esquelético. Neste contexto, caso fosse sugerida uma terapia para neoplasias, possivelmente as CTMs de origem do tecido muscular fossem mais adequadas.

2.2. Comparação do secretoma das CTMs em relação ao doador

O conteúdo protéico secretado pelas CTMs é muito semelhante em relação à presença ou ausência de proteínas em diferentes doadores. Dentre as proteínas identificadas como exclusivas de um único doador, somente a proteína PTMA (*Prothymosin alpha*) foi identificada com 95 % de probabilidade (ProteinProphet) e foi encontrada em exossomos por estudos proteômicos. Ela está relacionada à resistência a infecções oportunistas, o que pode refletir diferenças no genoma dos indivíduos.

As proteínas diferencialmente expressas de acordo com os doadores das CTMs estão relacionadas à funções biológicas como migração e proliferação celular,

fatores neurotróficos, migração de linfócitos, eritropoiese, desenvolvimento de vasos sanguíneos e cicatrização

Observamos que as CTMs dos diferentes indivíduos possuem proteínas cuja expressão difere significativamente entre os doadores.

Por exemplo, o indivíduo I29 possui expressão diferenciada em diversas proteínas. Uma das proteínas diferencialmente expressas, *jagged 1*, é ligante de múltiplos receptores de *Notch*. Está envolvida no desenvolvimento cardiovascular e aumenta a angiogênese (Cordle et al., 2008; Le Friec et al., 2012; Nickoloff et al., 2002; Zimrin et al., 1996). Foi observado que sua expressão está significativamente aumentada em dois cães GRMD (golden retriever muscular dystrophy) que apresentam um quadro relativamente benigno (Zatz et al., 2015).

Ao analisar os agrupamentos hierárquicos podemos considerar que não houve maior proximidade entre as linhagens de CTMs de acordo com o tecido de origem ou de acordo com os doadores. Isto sugere que o secretoma das CTMs é muito semelhante, que as CTMs isoladas de quaisquer tecidos ou indivíduos são capazes de secretar moléculas que possivelmente exercem benefícios em determinado tratamento. Porém, estes benefícios podem ser exacerbados ou suprimidos pelas moléculas diferencialmente expressas, as quais são dependentes tanto dos tecidos quanto dos indivíduos dos quais as CTMs foram obtidas.

Portanto, a realização de análises funcionais, como o co-cultivo de células conjuntamente a estes meios condicionados será de grande interesse. Embora existam proteínas diferencialmente expressas significativamente, as análises funcionais são imprescindíveis também para verificação se as diferenças nas concentrações protéicas são biologicamente relevantes. É importante ressaltar que o secretoma destas células foi obtido em uma situação estressante, uma vez que foi necessário o careciamento das CTMs por 28 horas. Assim sendo, é possível que as células liberem outros tipos de moléculas quando submetidas a outros ambientes. Por exemplo, Xing e col. (2014) mostraram que CTMs de medula óssea cultivadas na presença de um ambiente que mimetizava inflamação (com a adição de fatores pró-inflamatórios IL-1 β , IL-6 e TNF- α) secretavam mais citocinas relacionadas à migração celular.

Além disso, é possível que as células liberem fatores específicos somente quando expostas ao ambiente *in vivo*. Uma questão importante é verificar se o efeito das CTMs “*in vivo*” depende da presença das próprias CTMs ou somente de seu secretoma. Em um modelo de ratos com lesão aguda do pulmão, (Chailakhyan et al., 2014) os pesquisadores concluíram que eficiência do tratamento foi maior quando utilizadas as próprias CTMs e não somente suas moléculas secretadas. Outras pesquisas mostraram resultados contraditórios “*in vivo*” quando compararam o uso de CTMs ou do secretoma. Pereira et al., 2014, comparou o efeito de CTMs isoladas do cordão umbilical e o meio condicionado (sem o carenciamento de SFB das células) em um modelo de miectomia de rato. Os autores concluíram que a cicatrização muscular entre os grupos tratados com células ou com seu meio condicionado foi semelhante, sendo que o tratamento a longo prazo com o meio condicionado apresentou, inclusive, resultados melhores em relação aos grupos tratados com as CTMs obtidas do cordão umbilical.

Esses resultados mostram a importância de continuar esses estudos e analisar o secretoma das CTMs expostas à diferentes estímulos.

3. Implicações terapêuticas

Nosso grupo vem estudando o potencial terapêutico das CTMs para terapia em distrofias musculares e já comparou o efeito de CTMs obtidas de diferentes fontes em vários modelos murinos e canino. (Secco et al., 2008, 2009; Valadares et al., 2014; N. M. Vieira et al., 2010, 2012; Natássia M Vieira et al., 2008; Zucconi et al., 2011). No início acreditava-se que as CTMs tinham o potencial de diferenciarem-se em células musculares quando injetadas nesses modelos. Entretanto, hoje a hipótese é de que o efeito benéfico dessas células se dá predominantemente por pela produção de fatores tróficos, citocinas e substâncias antioxidantes, com capacidade de modular a resposta imune. Estudos mostram, em diferentes modelos, recuperação funcional mesmo sem uma diferenciação significativa das células, o que pode ser atribuído à secreção de fatores anti-inflamatórios, neurotróficos, angiogênicos, imunomodulatórios e/ou anti-fibróticos (A.I. Caplan & Correa, 2012;

English et al., 2010; Gang et al., 2009; Gharaibeh et al., 2011; Lavasani et al., 2012; Pinheiro et al., 2012). Nas pesquisas *in vivo* realizadas por nossa equipe observamos melhoras no fenótipo dos animais, porém, as células injetadas não foram encontradas diferenciadas em músculo. Assim sendo, os mecanismos que conduziram a esta melhora necessitam ser esclarecidos e a identificação dos fatores liberados pelas CTMs demonstra-se de grande importância.

Atualmente existem 281 estudos clínicos utilizando CTMs em andamento. Sendo que estes estudos incluem transplante de células autólogo ou alogeneico e tecidos de obtenção variados, como medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical (www.clinicaltrial.gov "Search of: mesenchymal stem cells - List Results - ClinicalTrials.gov," n.d.). A escolha das células utilizadas se dá principalmente pela facilidade de obtenção e abundância. Entretanto, nossos resultados indicam que as CTMs podem possuir moléculas que diferenciam os potenciais de cada linhagem de CTM, a depender de seu tecido de origem e doador. Desta forma, é extremamente relevante caracterizar as células multipotentes mesenquimais estromais - principalmente àquelas empregadas em estudos clínicos - quanto às moléculas por elas secretadas, não somente quanto ao seu potencial de diferenciação *in vitro* e marcadores de superfície clássicos, como o que é determinado atualmente. O conhecimento das moléculas secretadas faz com que seja possível a predição dos efeitos exercidos por elas e, portanto, permite a escolha da melhor célula para uso na terapia em uma patologia específica.

Nosso grupo de pesquisa tem como um de seus objetivos a formulação de terapias para DMPs, almejando inclusive uma melhor qualidade de vida para os pacientes. Nesse sentido, é possível que seja mais adequado o emprego de CTMs que secretam maiores quantidades de fatores de crescimento, que estimulam a angiogênese e a migração celular e quantidades menores de proteínas que regulam a proliferação celular negativamente e que estimulam resposta imune. Foram encontradas proteínas diferencialmente expressas relacionadas à estas funções, sendo que ENO 1 regula negativamente proliferação, HSP60 (60kDa *heat shock protein*) ativa resposta imune e CTGF (*connective tissue growth factor*) estimula angiogênese, diferenciação, proliferação e migração. Desta maneira, conforme as

expressões de cada uma destas proteínas (Figuras 15, 16 e 19), podemos considerar que possivelmente as CTMs obtidas do tecido adiposo sejam mais adequadas.

Deste modo podemos considerar que existem moléculas exclusivas e diferencialmente expressas entre os tecidos de obtenção e também entre os doadores das CTMs que podem ser responsáveis por respostas mais benéficas ou prejudiciais de tratamentos utilizando estas células. Por este motivo, previamente à aplicação de qualquer linhagem de CTMs na clínica, as CTMs necessitam ser caracterizada quanto à seus fatores secretados, com o objetivo de possibilitar a previsão de resultados e mecanismos pelos quais foram obtidos.

VI. Conclusões

1. A técnica de análise do meio condicionado das CTMs foi estabelecida
2. Os fatores liberados pelas CTMs foram identificados
3. A comparação do proteoma das células multipotentes mesenquimais estromais de tecido adiposo, tubas uterinas e músculo esquelético obtidos das mesmas doadoras permitiu concluir que o secretoma das CTMs é muito semelhante, as CTMs isoladas de quaisquer tecidos ou indivíduos são capazes de secretar moléculas que possivelmente exercem benefícios em determinado tratamento. Porém, estes benefícios podem ser exacerbados ou suprimidos pelas moléculas exclusivas ou diferencialmente expressas, as quais são dependentes tanto dos tecidos quanto dos indivíduos dos quais as CTMs foram obtidas. A relevância biológica das moléculas diferencialmente expressas necessita de validação por ensaios funcionais

VII. Bibliografia

- Al-Nbaheen, M., Vishnubalaji, R., Ali, D., Bouslimi, A., Al-Jassir, F., Megges, M., ... Aldahmash, A. (2013). Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9, 32–43. doi:10.1007/s12015-012-9365-8
- Arike, L., Valgepea, K., Peil, L., Nahku, R., Adamberg, K., & Vilu, R. (2012). Comparison and applications of label-free absolute proteome quantification methods on *Escherichia coli*. *Journal of Proteomics*, 75(17), 5437–5448. doi:10.1016/j.jprot.2012.06.020
- Ball, D. K., Rachfal, A. W., Kemper, S. A., & Brigstock, D. R. (2003). The heparin-binding 10 kDa fragment of connective tissue growth factor (CTGF) containing module 4 alone stimulates cell adhesion. *The Journal of Endocrinology*, 176(2), R1–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553878>
- Batra, J., Robinson, J., Soares, A. S., Fields, A. P., Radisky, D. C., & Radisky, E. S. (2012). Matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) interaction with tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2: binding studies and crystal structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15935–46. doi:10.1074/jbc.M112.341156
- Bibber, B., Sinha, G., Lobba, A. R. M., Greco, S. J., & Rameshwar, P. (2013). A review of stem cell translation and potential confounds by cancer stem cells. *Stem Cells International*, 2013, 241048. doi:10.1155/2013/241048
- Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.-M., Messi, M. L., Enikolopov, G. N., Mintz, A., & Delbono, O. (2013). Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation. *Stem Cells and Development*, 22(16), 2298–314. doi:10.1089/scd.2012.0647
- Blaber, S. P., Webster, R. a, Hill, C. J., Breen, E. J., Kuah, D., Vesey, G., & Herbert, B. R. (2012). Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 172. doi:10.1186/1479-5876-10-172
- Bottermann, K., Reinartz, M., Barsoum, M., Kötter, S., & Gödecke, A. (2013). Systematic Analysis Reveals Elongation Factor 2 and α -Enolase as Novel Interaction Partners of AKT2. *PloS One*, 8(6), e66045. doi:10.1371/journal.pone.0066045

- Caplan, A. I., & Correa, D. (2012). The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*, 9(1), 11–15. doi:10.1016/j.stem.2011.06.008.THE
- Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98, 1076–1084. doi:10.1002/jcb.20886
- Chailakhyan, R. K., Aver, A. V., Zabozaev, F. G., Sobolev, P. A., Sorokina, A. V., Akul, D. A., & Gerasimov, Y. V. (2014). Comparison of the Efficiency of Transplantation of Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Cultured under Normoxic and Hypoxic Conditions and Their Conditioned Media on the Model of Acute Lung Injury, (1), 138–142.
- Chamberlain, J. R., Deyle, D. R., Schwarze, U., Wang, P., Hirata, R. K., Li, Y., ... Russell, D. W. (2008). Gene targeting of mutant COL1A2 alleles in mesenchymal stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(1), 187–93. doi:10.1038/sj.mt.6300339
- Chan, C. Y. X., Masui, O., Krakovska, O., Belozarov, V. E., Voisin, S., Ghanny, S., ... Siu, K. W. M. (2011). Identification of differentially regulated secretome components during skeletal myogenesis. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 10(5), M110.004804. doi:10.1074/mcp.M110.004804
- Chan, J. L., Tang, K. C., Patel, A. P., Bonilla, L. M., Pierobon, N., Ponzio, N. M., & Rameshwar, P. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*, 107(12), 4817–24. doi:10.1182/blood-2006-01-0057
- Chandra, D., Choy, G., & Tang, D. G. (2007). Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31289–301. doi:10.1074/jbc.M702777200
- Chen, J., Park, H.-C., Addabbo, F., Ni, J., Pelger, E., Li, H., ... Goligorsky, M. S. (2008). Kidney-derived mesenchymal stem cells contribute to vasculogenesis, angiogenesis and endothelial repair. *Kidney International*, 74(7), 879–89. doi:10.1038/ki.2008.304
- Chesler, L., Golde, D. W., Bersch, N., & Johnson, M. D. (1995). Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood*, 86(12), 4506–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8541540>
- Cohen-Sfady, M., Nussbaum, G., Pevsner-Fischer, M., Mor, F., Carmi, P., Zanin-Zhorov, A., ... Cohen, I. R. (2005). Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *Journal of Immunology (Baltimore)*,

- Md.* : 1950), 175(6), 3594–602. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148103>
- Collino, F., Deregibus, M. C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., ... Camussi, G. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS ONE*, 5(7). doi:10.1371/journal.pone.0011803
- Contente, S., Kenyon, K., Sriraman, P., Subramanyan, S., & Friedman, R. M. (1999). Epigenetic inhibition of lysyl oxidase transcription after transformation by ras oncogene. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 194(1-2), 79–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10391127>
- Cordle, J., Johnson, S., Tay, J. Z. Y., Roversi, P., Wilkin, M. B., de Madrid, B. H., ... Handford, P. A. (2008). A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(8), 849–57. doi:10.1038/nsmb.1457
- Coutu, D. L., Wu, J. H., Monette, A., Rivard, G.-E., Blostein, M. D., & Galipeau, J. (2008). Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 17991–8001. doi:10.1074/jbc.M708029200
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1367–72. doi:10.1038/nbt.1511
- Dealing With the Masses: A Tutorial on Accurate Masses, Mass 32 Uncertainties, and Mass Defects | Spectroscopy. (n.d.). Retrieved June 14, 2015, from <http://www.spectroscopyonline.com/dealing-masses-tutorial-accurate-masses-mass-32-uncertainties-and-mass-defects?id=&sk=&date=&pageID=4>
- Deans, R. J., & Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, 28(8), 875–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989188>
- Dementiev, A., Dobó, J., & Gettins, P. G. W. (2006). Active site distortion is sufficient for proteinase inhibition by serpins: structure of the covalent complex of alpha1-proteinase inhibitor with porcine pancreatic elastase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3452–7. doi:10.1074/jbc.M510564200
- Dente, L., Ciliberto, G., & Cortese, R. (1985). Structure of the human alpha 1-acid glycoprotein gene: sequence homology with other human acute phase protein genes. *Nucleic Acids Research*, 13(11), 3941–52. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=341288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Dente, L., Rüther, U., Tripodi, M., Wagner, E. F., & Cortese, R. (1988). Expression of human alpha 1-acid glycoprotein genes in cultured cells and in transgenic mice. *Genes & Development*, 2(2), 259–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3360326>
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., ... Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986244>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. doi:10.1080/14653240600855905
- Eggenhofer, E., Benseler, V., Kroemer, A., Popp, F. C., Geissler, E. K., Schlitt, H. J., ... Hoogduijn, M. J. (2012). Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Frontiers in Immunology*, 3, 297. doi:10.3389/fimmu.2012.00297
- Elizondo-Riojas, M.-A., Chamow, S. M., Tuthill, C. W., Gorenstein, D. G., & Volk, D. E. (2011). NMR structure of human thymosin alpha-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 416(3-4), 356–61. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.041
- Emery, A. E. H. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet*, 359(9307), 687–695. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430573>
- English, K., French, A., & Wood, K. J. (2010). Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell*, 7(4), 431–42. doi:10.1016/j.stem.2010.09.009
- Eschenfeldt, W. H., & Berger, S. L. (1986). The human prothymosin alpha gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: evidence using a cloned cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(24), 9403–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=387146&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Eschenfeldt, W. H., Manrow, R. E., Krug, M. S., & Berger, S. L. (1989). Isolation and partial sequencing of the human prothymosin alpha gene family. Evidence against export of the gene products. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(13), 7546–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2708378>

- Estrada, R., Li, N., Sarojini, H., An, J., Lee, M.-J., & Wang, E. (2009). Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *Journal of Cellular Physiology*, 219(3), 563–71. doi:10.1002/jcp.21701
- Fischer, U. M., Harting, M. T., Jimenez, F., Monzon-Posadas, W. O., Xue, H., Savitz, S. I., ... Cox, C. S. (2009). Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells and Development*, 18(5), 683–692. doi:10.1089/scd.2008.0253
- Gang, E. J., Darabi, R., Bosnakovski, D., Xu, Z., Kamm, K. E., Kyba, M., & Perlingeiro, R. C. (2009). Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. *Experimental Cell Research*, 310(15), 2624–2636.
- Gemelli, C., Martello, A., Montanari, M., Zanocco Marani, T., Salsi, V., Zappavigna, V., ... Grande, A. (2013). The Orosomucoid 1 protein is involved in the vitamin D - mediated macrophage de-activation process. *Experimental Cell Research*, 319(20), 3201–13. doi:10.1016/j.yexcr.2013.08.017
- Gharaibeh, B., Lavasani, M., Cummins, J. H., & Huard, J. (2011). Terminal differentiation is not a major determinant for the success of stem cell therapy - cross-talk between muscle-derived stem cells and host cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 2(4), 31.
- Ghosh, J. C., Dohi, T., Kang, B. H., & Altieri, D. C. (2008). Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 5188–94. doi:10.1074/jbc.M705904200
- Gillan, L., Matei, D., Fishman, D. A., Gerbin, C. S., Karlan, B. Y., & Chang, D. D. (2002). Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Research*, 62(18), 5358–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235007>
- Glazko, G. V., & Emmert-Streib, F. (2009). Unite and conquer: Univariate and multivariate approaches for finding differentially expressed gene sets. *Bioinformatics*, 25(18), 2348–2354. doi:10.1093/bioinformatics/btp406
- Gnecchi, M., Danieli, P., & Cervio, E. (2012). Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascular Pharmacology*, 57(1), 48–55. doi:10.1016/j.vph.2012.04.002
- Gómez-Márquez, J., Segade, F., Dosil, M., Pichel, J. G., Bustelo, X. R., & Freire, M. (1989). The expression of prothymosin alpha gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(15), 8451–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2785990>

- Grossman, M., Tworowski, D., Dym, O., Lee, M.-H., Levy, Y., Murphy, G., & Sagi, I. (2010). The intrinsic protein flexibility of endogenous protease inhibitor TIMP-1 controls its binding interface and affects its function. *Biochemistry*, 49(29), 6184–92. doi:10.1021/bi902141x
- Hämäläinen, E. R., Jones, T. A., Sheer, D., Taskinen, K., Pihlajaniemi, T., & Kivirikko, K. I. (1991). Molecular cloning of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5q23.3-31.2. *Genomics*, 11(3), 508–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1685472>
- Han, K.-H., Lee, S.-H., Ha, S.-A., Kim, H. K., Lee, C., Kim, D.-H., ... Kim, J. W. (2012). The functional and structural characterization of a novel oncogene GIG47 involved in the breast tumorigenesis. *BMC Cancer*, 12(1), 274. doi:10.1186/1471-2407-12-274
- Himmelfarb, M., Klopocki, E., Grube, S., Staub, E., Klamann, I., Hinzmann, B., ... Dahl, E. (2004). ITIH5, a novel member of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer. *Cancer Letters*, 204(1), 69–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744536>
- Hong, I.-S., Lee, H.-Y., & Kang, K.-S. (2014). Mesenchymal stem cells and cancer: Friends or enemies? *Mutation Research*, 768, 1–9. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.01.006
- Hoshijima, M., Hattori, T., Inoue, M., Araki, D., Hanagata, H., Miyauchi, A., & Takigawa, M. (2006). CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin alpha5beta1. *FEBS Letters*, 580(5), 1376–82. doi:10.1016/j.febslet.2006.01.061
- Huang, W.-H., Chang, M.-C., Tsai, K.-S., Hung, M.-C., Chen, H.-L., & Hung, S.-C. (2013). Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice. *Oncogene*, 32(37), 4343–54. doi:10.1038/onc.2012.458
- Igarashi, A., Bradham, D. M., Okochi, H., & Grotendorst, G. R. (1992). Connective tissue growth factor. *The Journal of Dermatology*, 19(11), 642–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1293144>
- Imielinski, M., Berger, A. H., Hammerman, P. S., Hernandez, B., Pugh, T. J., Hodis, E., ... Meyerson, M. (2012). Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*, 150(6), 1107–20. doi:10.1016/j.cell.2012.08.029
- Itoh, Y., Kimoto, K., Imaizumi, M., & Nakatsuka, K. (2007). Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of type I collagen induced by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*, 84(3), 464–72. doi:10.1016/j.exer.2006.10.017

- Jazedje, T., Ribeiro, A. L., Pellati, M., de Siqueira Bueno, H. M., Nagata, G., Trierweiler, M., ... Zatz, M. (2015). Human Mesenchymal Stromal Cells Transplantation May Enhance or Inhibit 4T1 Murine Breast Adenocarcinoma through Different Approaches. *Stem Cells International*, 2015, 796215. doi:10.1155/2015/796215
- Kang, H. J., Jung, S.-K., Kim, S. J., & Chung, S. J. (2008). Structure of human alpha-enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 64(Pt 6), 651–7. doi:10.1107/S0907444908008561
- Karanu, F. N., Murdoch, B., Gallacher, L., Wu, D. M., Koremoto, M., Sakano, S., & Bhatia, M. (2000). The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(9), 1365–72. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193352&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Katsuda, T., Kosaka, N., Takeshita, F., & Ochiya, T. (2013). The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*, 13(10-11), 1637–53. doi:10.1002/pmic.201200373
- Khatri, P., Sirota, M., & Butte, A. J. (2012). Ten years of pathway analysis: Current approaches and outstanding challenges. *PLoS Computational Biology*, 8(2). doi:10.1371/journal.pcbi.1002375
- Kim, H.-S., Choi, D.-Y., Yun, S. J., Choi, S.-M., Kang, J. W., Jung, J. W., ... Kim, D.-W. (2012). Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *Journal of Proteome Research*, 11(2), 839–49. doi:10.1021/pr200682z
- Kimura, I., Yoshioka, M., Konishi, M., Miyake, A., & Itoh, N. (2005). Neudesin, a novel secreted protein with a unique primary structure and neurotrophic activity. *Journal of Neuroscience Research*, 79(3), 287–94. doi:10.1002/jnr.20356
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., & Epstein, S. E. (2004). Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circulation Research*, 95(4), 354–63. doi:10.1161/01.RES.0000137878.26174.66
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Shou, M., Lee, C. W., Barr, S., ... Epstein, S. E. (2004). Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, 109(12), 1543–9. doi:10.1161/01.CIR.0000124062.31102.57
- Kulasingam, V., & Diamandis, E. P. (2007). Proteomics analysis of conditioned media from three breast cancer cell lines: a mine for biomarkers and

- therapeutic targets. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 6, 1997–2011. doi:10.1074/mcp.M600465-MCP200
- Lai, R., McDonnell, T. J., O'Connor, S. L., Medeiros, L. J., Oudat, R., Keating, M., ... Ford, R. J. (2002). Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino. *Leukemia Research*, 26(9), 849–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12127561>
- Lavasani, M., Robinson, A. R., Lu, A., Song, M., Feduska, J. M., Ahani, B., ... Huard, J. (2012). Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nature Communications*, 3, 608. doi:10.1038/ncomms1611
- Le Friec, G., Sheppard, D., Whiteman, P., Karsten, C. M., Shamoun, S. A.-T., Laing, A., ... Kemper, C. (2012). The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity. *Nature Immunology*, 13(12), 1213–21. doi:10.1038/ni.2454
- Lee, G. W., Goodman, A. R., Lee, T. H., & Vilcek, J. (1994). Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(8), 3700–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523502>
- Lee, J. K., Jin, H. K., Endo, S., Schuchman, E. H., Carter, J. E., & Bae, J. S. (2010). Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses. *Stem Cells*, 28, 329–343. doi:10.1002/stem.277
- Lee, S. Y., Kim, J. M., Cho, S. Y., Kim, H. S., Shin, H. S., Jeon, J. Y., ... Lee, M. A. (2014). TIMP-1 modulates chemotaxis of human neural stem cells through CD63 and integrin signalling. *The Biochemical Journal*, 459(3), 565–76. doi:10.1042/BJ20131119
- Lindahl, K., Barnes, A. M., Fratzl-Zelman, N., Whyte, M. P., Hefferan, T. E., Makareeva, E., ... Marini, J. C. (2011). COL1 C-propeptide cleavage site mutations cause high bone mass osteogenesis imperfecta. *Human Mutation*, 32(6), 598–609. doi:10.1002/humu.21475
- Lindner, V., Booth, C., Prudovsky, I., Small, D., Maciag, T., & Liaw, L. (2001). Members of the Jagged/Notch gene families are expressed in injured arteries and regulate cell phenotype via alterations in cell matrix and cell-cell interaction. *The American Journal of Pathology*, 159(3), 875–83. doi:10.1016/S0002-9440(10)61763-4
- Liu, H., Bonner, A. J., & Emili, A. (2004). Modeling protein tandem mass spectrometry data with an extended linear regression strategy. *Conference Proceedings: ... Annual International Conference of the IEEE Engineering*

- in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, 4, 3055–9. doi:10.1109/IEMBS.2004.1403864
- López-Alemaný, R., Longstaff, C., Hawley, S., Mirshahi, M., Fábregas, P., Jardí, M., ... Félez, J. (2003). Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against alpha-Enolase. *American Journal of Hematology*, 72(4), 234–42. doi:10.1002/ajh.10299
- Lu, Y., Yuan, Y., Wang, X., Wei, L., Chen, Y., Cong, C., ... Cheng, J. (2008). The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy*, 7(2), 245–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059192>
- Ludwig, C., Claassen, M., Schmidt, A., & Aebersold, R. (2012). Estimation of absolute protein quantities of unlabeled samples by selected reaction monitoring mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 11(3), M111.013987. doi:10.1074/mcp.M111.013987
- Magen, D., Georgopoulos, C., Bross, P., Ang, D., Segev, Y., Goldsher, D., ... Mandel, H. (2008). Mitochondrial hsp60 chaperonopathy causes an autosomal-recessive neurodegenerative disorder linked to brain hypomyelination and leukodystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 83(1), 30–42. doi:10.1016/j.ajhg.2008.05.016
- Magnelli, P. E., Bielik, A. M., & Guthrie, E. P. (2011). Identification and characterization of protein glycosylation using specific endo- and exoglycosidases. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (58), e3749. doi:10.3791/3749
- Malfait, F., Symoens, S., Coucke, P., Nunes, L., De Almeida, S., & De Paepe, A. (2006). Total absence of the alpha2(I) chain of collagen type I causes a rare form of Ehlers-Danlos syndrome with hypermobility and propensity to cardiac valvular problems. *Journal of Medical Genetics*, 43(7), e36. doi:10.1136/jmg.2005.038224
- Mantovani, A., Garlanda, C., & Bottazzi, B. (2003). Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. *Vaccine*, 21 Suppl 2, S43–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763682>
- Marques, P. I., Ferreira, Z., Martins, M., Figueiredo, J., Silva, D. I., Castro, P., ... Seixas, S. (2013). SERPINA2 is a novel gene with a divergent function from SERPINA1. *PloS One*, 8(6), e66889. doi:10.1371/journal.pone.0066889
- Mukhina, S., Stepanova, V., Traktouev, D., Poliakov, A., Beabealashvilly, R., Gursky, Y., ... Tkachuk, V. (2000). The chemotactic action of urokinase on smooth muscle cells is dependent on its kringle domain. Characterization of

- interactions and contribution to chemotaxis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16450–8. doi:10.1074/jbc.M909080199
- Nakanishi, T., Nishida, T., Shimo, T., Kobayashi, K., Kubo, T., Tamatani, T., ... Takigawa, M. (2000). Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology*, 141(1), 264–73. doi:10.1210/endo.141.1.7267
- Nesvizhskii, A. I. (2007). Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 367, 87–119. doi:10.1385/1-59745-275-0:87
- Nickoloff, B. J., Qin, J.-Z., Chaturvedi, V., Denning, M. F., Bonish, B., & Miele, L. (2002). Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death and Differentiation*, 9(8), 842–55. doi:10.1038/sj.cdd.4401036
- Onat, A., Hergenç, G., Can, G., Kaya, Z., & Yüksel, H. (2010). Serum complement C3: a determinant of cardiometabolic risk, additive to the metabolic syndrome, in middle-aged population. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 59(5), 628–34. doi:10.1016/j.metabol.2009.09.006
- Opbroek, A., Kenney, M. C., & Brown, D. (1993). Characterization of a human corneal metalloproteinase inhibitor (TIMP-1). *Current Eye Research*, 12(10), 877–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507419>
- Osterloh, A., Kalinke, U., Weiss, S., Fleischer, B., & Breloer, M. (2007). Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4669–80. doi:10.1074/jbc.M608666200
- Osterloh, A., Veit, A., Gessner, A., Fleischer, B., & Breloer, M. (2008). Hsp60-mediated T cell stimulation is independent of TLR4 and IL-12. *International Immunology*, 20(3), 433–43. doi:10.1093/intimm/dxn003
- Pan, L. X., Haritos, A. A., Wideman, J., Komiyama, T., Chang, M., Stein, S., ... Horecker, B. L. (1986). Human prothymosin alpha: amino acid sequence and immunologic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 250(1), 197–201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3532956>
- Pancholi, V. (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 58(7), 902–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11497239>

- Paquet, J., Deschepper, M., Moya, A., Logeart-Avramoglou, D., Boisson-Vidal, C., & Petite, H. (2015). Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. *Stem Cells Translational Medicine*. doi:10.5966/sctm.2014-0180
- Pennica, D., Swanson, T. A., Welsh, J. W., Roy, M. A., Lawrence, D. A., Lee, J., ... Levine, A. J. (1998). WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14717–22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24515&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Pereira, T., Armada-da Silva, P. A. S., Amorim, I., Rêma, A., Caseiro, A. R., Gärtner, A., ... Maurício, A. C. (2014). Effects of Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord and Conditioned Media on Skeletal Muscle Regeneration Using a Myectomy Model. *Stem Cells International*, 2014, 376918. doi:10.1155/2014/376918
- Pesson, M., Volant, A., Uguen, A., Trillet, K., De La Grange, P., Aubry, M., ... Corcos, L. (2014). A gene expression and pre-mRNA splicing signature that marks the adenoma-adenocarcinoma progression in colorectal cancer. *PLoS ONE*, 9(2). doi:10.1371/journal.pone.0087761
- Pinheiro, C. H., de Queiroz, J. C., Guimarães-Ferreira, L., Vitzel, K. F., Nachbar, R. T., de Sousa, L. G., ... Curi, R. (2012). Local injections of adipose-derived mesenchymal stem cells modulate inflammation and increase angiogenesis ameliorating the dystrophic phenotype in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(2), 363–374.
- Polacek, M., Bruun, J.-A., Elvenes, J., Figenschau, Y., & Martinez, I. (2011). The secretory profiles of cultured human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells: implications for autologous cell transplantation strategies. *Cell Transplantation*, 20(9), 1381–93. doi:10.3727/096368910X550215
- Pollitt, R., McMahon, R., Nunn, J., Bamford, R., Afifi, A., Bishop, N., & Dalton, A. (2006). Mutation analysis of COL1A1 and COL1A2 in patients diagnosed with osteogenesis imperfecta type I-IV. *Human Mutation*, 27(7), 716. doi:10.1002/humu.9430
- Pomponio, R. J., Norrgard, K. J., Hymes, J., Reynolds, T. R., Buck, G. A., Baumgartner, R., ... Wolf, B. (1997). Arg538 to Cys mutation in a CpG dinucleotide of the human biotinidase gene is the second most common cause of profound biotinidase deficiency in symptomatic children. *Human Genetics*, 99(4), 506–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9099842>

- Prunotto, M., Farina, A., Lane, L., Pernin, A., Schifferli, J., Hochstrasser, D. F., ... Moll, S. (2013). Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine. *Journal of Proteomics*, 82, 193–229. doi:10.1016/j.jprot.2013.01.012
- Ribeiro, C. a, Fraga, J. S., Grãos, M., Neves, N. M., Reis, R. L., Gimble, J. M., ... Salgado, A. J. (2012). The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. *Stem Cell Research & Therapy*, 3(3), 18. doi:10.1186/scri109
- Ries, C. (2014). Cytokine functions of TIMP-1. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(4), 659–72. doi:10.1007/s00018-013-1457-3
- Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381), 295–305. doi:10.1038/nature10761
- Romanov, Y. A., Svintsitskaya, V. A., & Smirnov, V. N. (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 21(1), 105–110. doi:10.1634/stemcells.21-1-105
- Rose, M., Gaisa, N. T., Antony, P., Fiedler, D., Heidenreich, a., Otto, W., ... Dahl, E. (2013). Epigenetic inactivation of ITIH5 promotes bladder cancer progression and predicts early relapse of pT1 high-grade urothelial tumours. *Carcinogenesis*, 35(3), 727–736. doi:10.1093/carcin/bgt375
- Ryan, J. M., Barry, F. P., Murphy, J. M., & Mahon, B. P. (2005). Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation (London, England)*, 2, 8. doi:10.1186/1476-9255-2-8
- Sánchez-Morgan, N., Kirsch, K. H., Trackman, P. C., & Sonenshein, G. E. (2011). The lysyl oxidase propeptide interacts with the receptor-type protein tyrosine phosphatase kappa and inhibits β -catenin transcriptional activity in lung cancer cells. *Molecular and Cellular Biology*, 31(16), 3286–97. doi:10.1128/MCB.01426-10
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, a, Yamamoto, E., & Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*. doi:10.1038/370061a0
- Schönfeld, D. L., Ravelli, R. B. G., Mueller, U., & Skerra, A. (2008). The 1.8-Å crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. *Journal of Molecular Biology*, 384(2), 393–405. doi:10.1016/j.jmb.2008.09.020

- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., ... Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473, 337–342. doi:10.1038/nature10098
- Search of: mesenchymal stem cells - List Results - ClinicalTrials.gov. (n.d.). Retrieved July 18, 2015, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mesenchymal+stem+cells>
- Secco, M., Moreira, Y. B., Zucconi, E., Vieira, N. M., Jazedje, T., Muotri, A. R., ... Zatz, M. (2009). Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units: Cord is different from blood. *Stem Cell Reviews and Reports*, 5, 387–401. doi:10.1007/s12015-009-9098-5
- Secco, M., Zucconi, E., Vieira, N. M., Fogaça, L. L. Q., Cerqueira, A., Carvalho, M. D. F., ... Zatz, M. (2008). Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*, 26(1), 146–150. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932423>
- Shao, R., Bao, S., Bai, X., Blanchette, C., Anderson, R. M., Dang, T., ... Wang, X.-F. (2004). Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression. *Molecular and Cellular Biology*, 24(9), 3992–4003. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=387763&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shen, Q., Chen, B., Xiao, Z., Zhao, L., Xu, X., Wan, X., ... Dai, H. (2015). Paracrine factors from mesenchymal stem cells attenuate epithelial injury and lung fibrosis. *Molecular Medicine Reports*, 11(4), 2831–7. doi:10.3892/mmr.2014.3092
- Song, P., Xie, Z., Guo, L., Wang, C., Xie, W., & Wu, Y. (2012). Human genome-specific real-time PCR method for sensitive detection and reproducible quantitation of human cells in mice. *Stem Cell Reviews*, 8(4), 1155–62. doi:10.1007/s12015-012-9406-3
- Stefansson, S., & Lawrence, D. A. (1996). The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature*, 383(6599), 441–3. doi:10.1038/383441a0
- Stephane Roche, G. D. L. A. G. T. B., & Sylvain Lehmann, C. N. M.-M. P. C. S. (2012). Comparative analysis of protein expression of three stem cell populations: Models of cytokine delivery system in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*. Retrieved from http://ac.els-cdn.com/S0378517311011719/1-s2.0-S0378517311011719-main.pdf?_tid=94902840-2715-11e4-b8ee-00000aacb35e&acdnat=1408393616_4608b07a1a747621062bdca4c369de60

- Stief, T. W., Radtke, K. P., & Heimbürger, N. (1987). Inhibition of urokinase by protein C-inhibitor (PCI). Evidence for identity of PCI and plasminogen activator inhibitor 3. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 368(10), 1427–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3501295>
- Suzuki, D. E., Nakahata, A. M., & Okamoto, O. K. (2014). Knockdown of E2F2 inhibits tumorigenicity, but preserves stemness of human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 23(11), 1266–74. doi:10.1089/scd.2013.0592
- Swango, K. L., Demirkol, M., Hüner, G., Pronicka, E., Sykut-Cegielska, J., Schulze, A., ... Wolf, B. (1998). Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene. *Human Genetics*, 102(5), 571–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9654207>
- Tabb, D. L., Vega-Montoto, L., Rudnick, P. A., Variyath, A. M., Ham, A.-J. L., Bunk, D. M., ... Spiegelman, C. (2010). Repeatability and reproducibility in proteomic identifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 9(2), 761–76. doi:10.1021/pr9006365
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035408>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Thomson, J. a. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
- Thorsen, S. B., Christensen, S. L., Würtz, S. O., Lundberg, M., Nielsen, B. S., Vinther, L., ... Stenvang, J. (2013). Plasma levels of the MMP-9:TIMP-1 complex as prognostic biomarker in breast cancer: a retrospective study. *BMC Cancer*, 13(1), 598. doi:10.1186/1471-2407-13-598
- Toma, C., Wagner, W. R., Bowry, S., Schwartz, A., & Villanueva, F. (2009). Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. *Circulation Research*, 104(3), 398–402. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.187724
- Toricelli, M., Melo, F. H. M., Peres, G. B., Silva, D. C. P., & Jasiulionis, M. G. (2013). Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. *Molecular Cancer*, 12(1), 22. doi:10.1186/1476-4598-12-22

- Treuheit, M. J., Costello, C. E., & Halsall, H. B. (1992). Analysis of the five glycosylation sites of human alpha 1-acid glycoprotein. *The Biochemical Journal*, 283 (Pt 1, 105–12. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1131000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Trounson, A., Thakar, R. G., Lomax, G., & Gibbons, D. (2011). Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Medicine*, 9, 52. doi:10.1186/1741-7015-9-52
- Valadares, M. C., Gomes, J. P., Castello, G., Assoni, a, Pellati, M., Bueno, C., ... Zatz, M. (2014). Human Adipose Tissue Derived Pericytes Increase Life Span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J Mice. *Stem Cell Reviews*. doi:10.1007/s12015-014-9537-9
- Van Vliet, C., Thomas, E. C., Merino-Trigo, A., Teasdale, R. D., & Gleeson, P. A. (2003). Intracellular sorting and transport of proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 83(1), 1–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757749>
- Vareli, K., Frangou-Lazaridis, M., van der Kraan, I., Tsolas, O., & van Driel, R. (2000). Nuclear distribution of prothymosin alpha and parathymosin: evidence that prothymosin alpha is associated with RNA synthesis processing and parathymosin with early DNA replication. *Experimental Cell Research*, 257(1), 152–61. doi:10.1006/excr.2000.4857
- Vázquez, F., Hastings, G., Ortega, M. A., Lane, T. F., Oikemus, S., Lombardo, M., & Iruela-Arispe, M. L. (1999). METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angiogenic-inhibitory activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 23349–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438512>
- Vieira, N. M., Bueno, C. R., Brandalise, V., Moraes, L. V, Zucconi, E., Secco, M., ... Zatz, M. (2008). SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells*, 26(9), 2391–2398. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18583542>
- Vieira, N. M., Valadares, M., Zucconi, E., Secco, M., Bueno Junior, C. R., Brandalise, V., ... Zatz, M. (2012). Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Injected Systemically Into GRMD Dogs Without Immunosuppression Are Able to Reach the Host Muscle and Express Human Dystrophin. *Cell Transplantation*, 21(7), 1407–1417.
- Vieira, N. M., Zucconi, E., Bueno Jr., C. R., Secco, M., Suzuki, M. F., Bartolini, P., ... Zatz, M. (2010). Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Distinct Sources Show Different In Vivo Potential to Differentiate into Muscle Cells When Injected in Dystrophic Mice. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6(4), 560–566. doi:10.1007/s12015-010-9187-5

- Villalta, S. A., Nguyen, H. X., Deng, B., Gotoh, T., & Tidball, J. G. (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 18(3), 482–96. doi:10.1093/hmg/ddn376
- Wang, G. H., Yao, L., Xu, H. W., Tang, W. T., Fu, J. H., Hu, X. F., ... Xu, X. M. (2013). Identification of MXRA5 as a novel biomarker in colorectal cancer. *Oncology Letters*, 5(2), 544–548. doi:10.3892/ol.2012.1038
- Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., & Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PloS One*, 5(4), e10088. doi:10.1371/journal.pone.0010088
- Winkler, I. G., Hendy, J., Coughlin, P., Horvath, A., & Lévesque, J.-P. (2005). Serine protease inhibitors serpin1 and serpin3 are down-regulated in bone marrow during hematopoietic progenitor mobilization. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(7), 1077–88. doi:10.1084/jem.20042299
- Wiśniewski, J. R., Hein, M. Y., Cox, J., & Mann, M. (2014). A “proteomic ruler” for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 13(12), 3497–506. doi:10.1074/mcp.M113.037309
- Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., & Mann, M. (2009a). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, 6(5), 359–362. doi:10.1038/nmeth.1322
- Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., & Mann, M. (2009b). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, 6(5), 359–62. doi:10.1038/nmeth.1322
- Wong, M. K., Prudovsky, I., Vary, C., Booth, C., Liaw, L., Mousa, S., ... Maciag, T. (2000). A non-transmembrane form of Jagged-1 regulates the formation of matrix-dependent chord-like structures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(3), 853–9. doi:10.1006/bbrc.2000.2173
- Xiong, D., Li, G., Li, K., Xu, Q., Pan, Z., Ding, F., ... You, M. (2012). Exome sequencing identifies MXRA5 as a novel cancer gene frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. *Carcinogenesis*, 33(9), 1797–1805. doi:10.1093/carcin/bgs210
- Yu, J. M., Jun, E. S., Bae, Y. C., & Jung, J. S. (2008). Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells and Development*, 17(3), 463–473. doi:10.1089/scd.2007.0181
- Yuasa, I., Umetsu, K., Vogt, U., Nakamura, H., Nanba, E., Tamaki, N., & Irizawa, Y. (1997). Human orosomucoid polymorphism: molecular basis of the three common ORM1 alleles, ORM1*F1, ORM1*F2, and ORM1*S.

- Human Genetics*, 99(3), 393–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9050929>
- Zatz, M., Vieira, N. M., Zucconi, E., Pelatti, M., Gomes, J., Vainzof, M., ... Andrade, T. (2015). A normal life without muscle dystrophin. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 25(5), 371–4. doi:10.1016/j.nmd.2015.02.007
- Zhang, L., Su, X. S., Ye, J. S., Wang, Y. Y., Guan, Z., & Yin, Y. F. (2015). Bone marrow mesenchymal stem cells suppress metastatic tumor development in mouse by modulating immune system. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 1–11. doi:10.1186/s13287-015-0039-8
- Zhu, Y., Xu, G., Patel, A., McLaughlin, M. M., Silverman, C., Knecht, K., ... Young, P. R. (2002). Cloning, expression, and initial characterization of a novel cytokine-like gene family. *Genomics*, 80(2), 144–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160727>
- Zimrin, A. B., Pepper, M. S., McMahon, G. A., Nguyen, F., Montesano, R., & Maciag, T. (1996). An antisense oligonucleotide to the notch ligand jagged enhances fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(51), 32499–502. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8955070>
- Zucconi, E., Vieira, N. M., Bueno, C. R., Secco, M., Jazedje, T., Costa Valadares, M., ... Zatz, M. (2011). Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 715251. doi:10.1155/2011/715251
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., ... Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304456>
- Zwickl, H., Traxler, E., Staettner, S., Parzefall, W., Grasl-Kraupp, B., Karner, J., ... Gerner, C. (2005). A novel technique to specifically analyze the secretome of cells and tissues. *Electrophoresis*, 26, 2779–2785. doi:10.1002/elps.200410387

VIII. Biografia

Amanda Faria Assoni é Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (2013). Atualmente é aluna de pós graduação (Mestrado) do departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (2015). Esta dissertação é apresentada para obtenção de Título de Mestre em Ciências na área de Biologia/Genética.

Publicações relevantes:

- Valadares, M. C., Gomes, J. P., Castello, G., **Assoni, a**, Pellati, M., Bueno, C., ... Zatz, M. (2014). Human Adipose Tissue Derived Pericytes Increase Life Span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J Mice. *Stem Cell Reviews*. doi:10.1007/s12015-014-9537-9
- Vieira, N. M., Valadares, M., Zucconi, E., Secco, M., Bueno Junior, C. R., Brandalise, V., **Assoni, A.**, ... Zatz, M. (2012). Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Injected Systemically Into GRMD Dogs Without Immunosuppression Are Able to Reach the Host Muscle and Express Human Dystrophin. *Cell Transplantation*, 21(7), 1407–1417.

Anexo I

Versão 2 de 17/10/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (maiores de 18 anos)

ESTUDO: “Avaliação do potencial miogênico de células-tronco mesenquimais adultas de diferentes fontes”

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Eu, _____, portador da Cédula de identidade, RG: _____ e inscrito no CPF/MF: _____ nascido(a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo “Avaliação do potencial miogênico de células-tronco mesenquimais adultas de diferentes fontes”, e esclareço que obtive todas as informações.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que possam descobrir o potencial de originar células musculares das células-tronco provenientes de tecido adiposo, muscular, trompa e endométrio;
- II) Serão coletados pedaços pequenos dos seguintes tecidos que me pertencem: músculo do abdômen, gordura e endométrio;
- III) A trompa, depois da histerectomia (retirada do útero), perde a função em meu corpo;
- IV) Após uma análise morfológica realizada a olho nu pelo médico da trompa, caso não seja notado nenhum problema nesta, será totalmente cedida para o estudo, tendo em vista que problemas que sejam invisíveis a esse tipo de análise são muito raros. Caso o médico perceba que existe algum problema com a trompa, essa deverá ser encaminhada para o anatomopatológico;