MARCUS VINICIUS NAGHETINI DOS SANTOS

Efeito anti-fibrótico da proteína SPARC em fibroblastos cardíacos

(Potencial mediador dos benefícios associados ao transplante de células-tronco derivadas de tecido adiposo no miocárdio pós-infarto)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Marcus Vinicius Naghetini dos
Efeito anti-fibrótico da proteína SPARC em fibroblastos cardíacos (Potencial mediador dos benefícios associados ao transplante de células-tronco derivadas de tecido adiposo no miocárdio pós-infarto) / Marcus Vinicius Naghetini dos Santos. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Tecido adiposo 3.Proteômica 4.SPARC proteína, humana 5.Colágeno 6.Morte celular 7.Peróxido de hidrogênio

USP/FM/DBD-362/15

Ao meu pai, *Rubens* (*in memoriam*), que nunca desistiu de mim e que me fez persistir em busca de meu sonho; se não fosse por você, hoje não teria chegado aonde cheguei. Desculpe-me por não ter conseguido este título a tempo de te deixar ainda mais orgulhoso.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. *José Eduardo Krieger*, pela orientação, confiança, pela oportunidade de realizar esse trabalho no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor e pelos exemplos de dedicação e competência.

Ao *Rafael Dariolli*, *Leonardo Jensen*, *Camila Zogbi* e *Juliana Nakamuta*, por me receberem tão bem e terem me incluído no grupo de Terapia Celular. Muito obrigado pelos conselhos, pela ajuda nos mais diversos experimentos, correção de projetos e relatórios. Em especial, gostaria de agradecer ao *Rafael*, por me permitir acompanhar todos os experimentos com porcos e as cirurgias de células-tronco, o que me deixou ainda mais apaixonado pela cardiologia, e pelos ensinamentos na cultura celular.

Ao *Vinícius Bassaneze*, pelas análises de citometria de fluxo, discussões e ensinamentos que muito me ajudaram. À Dra. *Adriana Girardi* e aos seus alunos, *Gabriela Aragão*, *Renato Crajoinhas* e *Tiago Sales*, pela ajuda nos experimentos e na compreensão de resultados. Ao amigo *Daniel Arruda*, pela amizade, companheirismo e conhecimento compartilhado.

Ao grupo da Proteômica: *Gabriela*, *Pâmela*, *Bianca*, *Kallyandra* e *Tamiris*, pela ajuda com Western Blot e com tudo o que é relacionado a este mundo, além do empréstimo dos mais diversos reagentes e materiais. Em especial, gostaria de agradecer à *Gabriela Venturini*, pela ajuda com as análises de MetaCore, desenhos experimentais e, mais recentemente, a análise de metabolômica.

À *Ana Paula Carneiro*, pela paciência e amizade e por me ensinar que Western Blot não é um bicho de sete cabeças... mas apenas de três! Muito obrigado!

À *Elida Neri*, *Miriam Alaniz* e *Renata Carmona*, que muito me ajudaram nas extrações, experimentos e reuniões, além de alguns momentos de descontração.

Aos amigos que revisaram este trabalho, *Rafael Dariolli*, *Miriam Alaniz*, *Leonardo Jensen* e *Natália Sanchez*.

Agradeço a todos os funcionários do laboratório pela ajuda e apoio sempre que necessário: *Maria de Lourdes*, *Silvana*, *Rosangela*, *Luciana*, *Lucia*, *Ana Maria*, *Andréia*, *Brendo*, *Arruda*, *Mônica*, *Thiago* e *Mariliza*.

Ao *Vitor*, *Denise*, *Maria* e *Laura* do Laboratório de Biologia Vascular, pelas valiosas discussões, empréstimos de reagentes e equipamentos, dosagem de DHE, nitrito e nitrato. Agradeço à *Debora Levy*, do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular, pelas análises de HCS.

Ao *Márcio Chaves*, pela amizade, por toda a ajuda prestada e, principalmente, por ter me apresentado à Dra. *Lisete Teixeira* na hora em que mais precisava. A senhora é uma grande profissional, exemplo de mulher, médica e pesquisadora. Nunca terei como retribuir tudo o que a senhora fez!

Aos amigos *Leandro*, *Paulo*, *Andres*, *Camila*, *Cíntia*, *Juliana*, *Douglas*, *Gabriela* e *Graça*, por todas as horas de descontração fora do laboratório. Embora alguns já estejam mais distantes, espero reencontrá-los em breve!

Aos meus grandes e melhores amigos, *Rafael Dariolli* e *Leonardo Jensen*, que Deus me deu a graça de conhecê-los. Obrigado por toda a ajuda, pela iniciação na vida acadêmica, pela vida fora do laboratório e por poder compartilhar todos os momentos bons e ruins. A jornada não teria sido tão divertida sem vocês. Muito obrigado!

Aos meus tios, *Domingos* (*in memoriam*) e *Rosa*, que me acolheram em São Paulo. Muito obrigado por tudo, inclusive as noites de pizza! Agradeço também à *Sueli*, *Maria do Carmo* e *Osmar*, meus tios que sempre torceram e rezaram por mim.

Aos meus pais, *Rubens* (*in memoriam*) e *Graça*, pela educação e valores que levarei para a vida toda, por me incentivarem a fazer aquilo que gosto, pela fé, esperança, preocupação (às vezes um pouco demais) e confiança depositadas em mim. Ao meu irmão *Luiz Augusto*, pela força e por ter me apoiado em todas as etapas

vividas, além de ter amparado minha mãe nos longos períodos onde estive ausente fisicamente, mas presente em espírito.

A *Deus*, pelas conquistas conseguidas até o momento, pois sem Ele nada disso teria sido possível.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação Zerbini e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Sumário

Lista de Abreviações i

Lista de Símbolos iv

Lista de Tabelas v

Lista de Figuras vi

Resumo ix

Abstract xi

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Fisiopatologia e Epidemiologia do Infarto do Miocárdio 3

1.2. Terapia Celular: Uso de Células-Tronco 4

1.3. Terapia Celular: O Efeito Parácrino 7

1.4. A importância de modelos celulares 11

2. OBJETIVOS 13

2.1. Objetivo Geral 15

2.2. Objetivos Específicos 15

3. MATERIAIS E MÉTODOS 17

3.1. Análise do Secretoma 19

3.2. Extração e cultivo de fibroblasto cardíaco 20

3.3. Extração e cultivo de ASC 21

3.4. Extração e cultivo de cardiomiócito de neonato 22

3.5. Cultivo de células endoteliais 23

3.6. Indução de hipóxia *in vitro* 24

3.6.1. Fibroblastos cardíacos 24

3.6.2. Cardiomiócitos 24

3.7. Indução de morte celular por H_2O_2 25

3.7.1. Cardiomiócitos 25

3.7.2. Fibroblastos cardíacos 25

3.7.3. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) 25

3.8. Determinação do tempo mínimo de tratamento com H_2O_2 25

3.9. Tratamento das células com os fatores e o meio condicionado 26
3.10. Ensaio de viabilidade celular - MTT 26
3.11. Análise da viabilidade celular por Anexina V/iodeto de propídeo (PI) 27
3.12. Análise da viabilidade celular por ensaio de TUNEL 27
3.13. Modelo de angiogênese por formação de tubo (*capilar-like*) em matriz 28
3.14. Análise da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por Dihidroetídio 29
3.15. Análise da concentração de H_2O_2 por *Amplex Red* 30
3.16. Quantificação de colágeno solúvel 30
3.17. Quantificação de colágeno tipo I por Imunofluorescência por *High Content Screening* (HCS) 31
3.18. Preparação e concentração do meio de cultura condicionado para análise de proteínas por western-blot 32
3.19. Extração de proteínas e análise por Western blot 32
3.20. Real Time – PCR 34
3.20.1. Extração de RNA 34
3.20.2. Verificação da Integridade do RNA 35
3.20.3. Transcrição Reversa do RNA 35
3.20.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – RT-PCR 35
3.21. Análise Estatística 36
4. RESULTADOS 39
4.1. Análise do secretoma de mASC submetida a hipóxia e estiramento 41
4.2. Modelo de indução de morte celular: Hipóxia por baixa tensão de O_2 46
4.2.1. Hipóxia em fibroblastos cardíacos 46
4.2.2. Hipóxia em cardiomiócitos 49
4.3. Modelo de indução de morte celular por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 50
4.3.1. Padronização do modelo de morte em cardiomiócitos 50
4.3.2. Padronização do modelo de morte em fibroblastos cardíacos 52
4.3.3. Padronização do modelo de morte em células endoteliais 54
4.4. Análise da expressão de SPARC, MMP-3 e Osteopontina nas células tratadas com H_2O_2 56
4.4.1. Expressão basal 56
4.4.2. Cardiomiócitos 57

4.4.3. Fibroblastos cardíacos 61
4.4.3.1 Produção de colágeno 64
4.4.4. HUVECs 65
4.5. Determinação do tempo de degradação e do tempo mínimo de tratamento com H_2O_2 67
4.6. Efeito dos fatores e do meio condicionado na viabilidade celular 71
4.6.1. Cardiomiócitos 71
4.6.2. Fibroblastos Cardíacos 73
4.6.3. Células endoteliais 75
4.7. Efeito do MC rASC, SPARC e Osteopontina na secreção de colágeno 79
4.8. Efeito de SPARC na angiogênese 81
5. DISCUSSÃO 83
6. SUMÁRIO 101
7. CONCLUSÃO 105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109
9. ANEXOS 123
9.1. Anexo A. Cópia do parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 125
9.2. Anexo B. Cópia do parecer de aprovação para adição de subprojeto no processo 267/11 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais. 126
10. APÊNDICE 127
10.1. Apêndice A. Cópia da confirmação de submissão do artigo resultante desta dissertação na revista *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 129

Lista de Abreviações

ANOVA	- do inglês, Analysis of variance
ASC	- do inglês, Adipose Stem Cells
Av	- Anexina V
BCA	- do inglês, Bicinchoninic Acid
Bcl-2	- do inglês, B-cell lymphoma 2
bFGF	- do inglês, Basic Fibroblast Growth Factor
BrdU	- Bromodeoxiuridine
BSA	- do inglês, Bovine Serum Albumin
$CaCl_2$	- Cloreto de cálcio
CCN1	- do inglês, Cysteine-rich protein 61
CCN2	- do inglês, Connective Tissue Growth Factor
CD	- Cluster de diferenciação
cDNA	- DNA complementar
cIAP-2	- do inglês, Baculoviral IAP repeat-containing protein 3
CO_2	- Dióxido de carbono
$CoCl_2$	- Cloreto de cobalto
CPAEC	- do inglês, Calf Pulmonary Artery Endothelial Cells
DEPC	- do inglês, Diethylpyrocarbonate
DHE	- Dihidroetídio
DMEM	- do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- do inglês, Deoxyribonucleic acid
DNAse	- Desoxirribonuclease
dNTP’s	- do inglês, Deoxynucleotide Triphosphates
D-PBS	- do inglês, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTPA	- do inglês, Diethylene Triamine Pentaacetic Acid
DTT	- Ditiotreitol
dUTP	- do inglês, Deoxyuridine Triphosphate
EBM	- do inglês, Endothelial Basal Medium
ECL	- do inglês, Enhanced Chemiluminescence
EGF	- do inglês, Epidermal Growth Factor
EGM	- do inglês, Endothelial Growth Medium
EOH	- do inglês, 2-hydroxyethidium
EPM	- Erro Padrão da Média
FBS	- do inglês, Fetal Bovine Serum
GAPDH	- do inglês, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
G-CSF	- do inglês, Granulocyte colony-stimulating factor
H_2O_2	- Peróxido de hidrogênio
Hif-1α	- do inglês, Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HPLC	- do inglês, High Performance Liquide Chromatography

HRP	- do inglês, Horseradish peroxidase
HrS	- do inglês, Horse Serum
HSPs	- do inglês, Heat Shock Proteins
HUVEC	- do inglês, Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IFNy	- do inglês, Interferon gamma
IM	- Infarto do Miocárdio
InCor	- Instituto do Coração
KCl	- Cloreto de potássio
KH_2PO_4	- Fosfato monopotássico
mASC	- do inglês, mouse Adipose-derived Stem Cell
MC	- Meio Condicionado
MCP-3	- do inglês, Monocyte Chemotactic Protein-3
$MgCl_2$	- Cloreto de magnésio
MHC	- do inglês, Major Histocompatibility Complex
miR	- microRNA
MMLV	- do inglês, Moloney Murine Leukemia Virus
MMP	- Matriz Metaloproteinase
MSC	- do inglês, Mesenchymal Stem Cells
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
Na_2HPO_4	- Fosfato dissódico
NaCl	- Cloreto de sódio
NAD(P)H	- do inglês, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBCS	- do inglês, Newborn Calf Serum
NO	- Óxido nítrico
Nox	- NAD(P)H oxidase
O_2	- Oxigênio
OligodT	- do inglês, Single-stranded sequence of deoxythymidine
OSF-2	- do inglês, Osteoblast-Specific Factor 2
P/S	- do inglês, Penicillin/Streptomycin Solution
PAGE	- do inglês, Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	- do inglês, Phosphate-Buffered Saline
PCR	- do inglês, Polymerase Chain Reaction
PDGF	- do inglês, Platelet-derived Growth Factor
PFA	- Paraformaldeído
pH	- Potencial hidrogeniônico
PI	- do inglês, Propidium Iodide
PTEN	- do inglês, Phosphatase and tensin homolog
PVDF	- do inglês, Polyvinylidene Difluoride
rASC	- do inglês, rat Adipose-derived Stem Cell
RNA	- do inglês, Ribonucleic acid
RNAse	- Ribonuclease
RT-PCR	- do inglês, Real-Time Polymerase Chain Reaction
SDF	- do inglês, Stromal cell-derived factor

SDS	- do inglês, Sodium Dodecyl Sulphate
SPARC	- do inglês, Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
TBST	- do inglês, Tris-Buffered Saline and Tween 20
Tcp-10	- do inglês, T-complex protein 10
TGF-1β	- do inglês, Transforming Growth Factor beta 1
TIMP-1	- do inglês, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1
TNFα	- do inglês, Tumor Necrosis Factor alpha
TSP	- do inglês, Thrombospondin
Vat1	- do inglês, Vesicle Amine Transport 1
VEGF	- do inglês, Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	- do inglês, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Lista de Símbolos

%	- Porcentagem
ºC	- Graus Celsius
μg	- Microgramа
μL	- Microlitro
μM	- Micromolar
cm^2	- Centímetros Quadrados
g	- Gramas
Kg	- Quilogramas
M	- Molar
mA	- Miliampère
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
nm	- Nanômetro
nM	- Nanomolar
pg	- Picograma
RPM	- Rotações por minuto
U	- Unidades
UA	- Unidades Arbitrárias

Lista de Tabelas

Tabela 1: Primers para análise da expressão de SPARC, Osteopontina e MMP-3..... 36

Tabela 2: Fatores encontrados no secretoma de mASC submetida à hipóxia e estiramento por 24 horas 42

Tabela 3: Mecanismo e efeito de cada interação representada na Figura 2C. 46

Tabela 4: Efeito do H2O2 na expressão gênica e proteica..... 94

Lista de Figuras

Figura 1: Análise de enriquecimento e de interação do secretoma de mASC 43

Figura 2: Análise de enriquecimento dos fatores sub- e super-expressos no infarto do miocárdio. 45

Figura 3: Indução de morte celular em fibroblastos cardíacos submetidos à hipóxia 47

Figura 4: Indução de estresse oxidativo em fibroblastos cardíacos submetidos à hipóxia 48

Figura 5: Indução de morte celular em cardiomiócitos submetidos à hipóxia.. 49

Figura 6: Redução da viabilidade celular em cardiomiócitos tratados com H_2O_2 51

Figura 7: Indução de morte celular em fibroblastos cardíacos submetidos ao tratamento com H_2O_2 53

Figura 8: Indução de morte celular em HUVECs tratadas com H_2O_2 55

Figura 9: *Heatmap* da expressão gênica basal de SPARC, MMP-3 e Osteopontina nos três tipos celulares básicos que constituem o coração, cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e células endoteliais 56

Figura 10: Efeito do peróxido de hidrogênio na expressão proteica dos fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, em cardiomiócitos. 58

Figura 11: Expressão proteica dos fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, no lisado celular e no meio condicionado de cardiomiócitos 59

Figura 12: Efeito do peróxido de hidrogênio na expressão gênica dos fatores em cardiomiócitos. 60

Figura 13: Efeito do H_2O_2 na expressão proteica dos fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, em fibroblastos cardíacos 62

Figura 14: Expressão proteica dos fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, no meio condicionado de fibroblastos cardíacos 63

Figura 15: Efeito do peróxido de hidrogênio na expressão gênica dos fatores em fibroblastos cardíacos 64

Figura 16: Indução da produção de colágeno em fibroblastos cardíacos por H_2O_2 65

Figura 17: Efeito do peróxido de hidrogênio na expressão proteica dos fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, em HUVECs 66

Figura 18: Efeito do peróxido de hidrogênio na expressão gênica dos fatores em HUVECs 67

Figura 19: Avaliação do tempo de degradação do peróxido de hidrogênio 69

Figura 20: Determinação do tempo mínimo de tratamento com H_2O_2 em cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e células endoteliais 70

Figura 21: Efeito do tratamento com SPARC, Osteopontina, MMP-3 e MC na viabilidade celular de cardiomiócitos 72

Figura 22: Efeito do tratamento com SPARC, Osteopontina, MMP-3 e MC na viabilidade celular de fibroblastos cardíacos 74

Figura 23: Efeito do tratamento com SPARC, Osteopontina, MMP-3 e MC na viabilidade celular de HUVECs 76

Figura 24: Efeito do pré-tratamento com MC na viabilidade celular de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e HUVECs 78

Figura 25: Análise da produção de colágeno em fibroblastos cardíacos tratados com MC, Osteopontina e SPARC 80

Figura 26: Análise da expressão proteica endógena de colágeno tipo I em fibroblastos cardíacos tratados com SPARC..... 81

Figura 27: Efeito do tratamento com SPARC sobre o ensaio de formação de tubos por HUVECs. 82

Resumo

Santos MVN. **Efeito anti-fibrótico da proteína SPARC em fibroblastos cardíacos** (Potencial mediador dos benefícios associados ao transplante de células-tronco derivadas de tecido adiposo no miocárdio pós-infarto) [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O reparo cardíaco pós-infarto do miocárdio (IM) continua sendo um desafio, apesar do grande progresso no tratamento clínico e na redução da mortalidade. Nesse sentido, estudos com modelos pré-clínicos têm demonstrado que o transplante de células-tronco adultas, como as células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs), preserva a função ventricular após IM. Esta melhora não está relacionada à mecanismos de substituição tecidual, mas a ação parácrina através da liberação de moléculas bioativas pleiotrópicas. No presente estudo, nós procuramos identificar proteínas-alvo importantes relacionadas com a resposta pleiotrópica benéfica associada ao uso de ASC pós-IM. Foram realizadas análises de bioinformática do secretoma de mASC submetida à hipóxia e *stretch*, mimetizando o microambiente do IM, para encontrar novos alvos. Uma rede de interações incluindo três candidatos que interagem entre si: SPARC, MMP-3 e Osteopontina, foi gerada. Padronizamos o modelo de morte celular por H_2O_2 em cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e células endoteliais, os três tipos celulares principalmente encontrados no coração, e avaliamos a expressão desses fatores nessas células. Os dados mostram que o peróxido de hidrogênio altera a expressão desses fatores de forma heterogênea nessas células e induz a produção e secreção de colágeno em fibroblastos. Entretanto, o tratamento com SPARC, Osteopontina e MMP-3

não melhorou a viabilidade das células tratadas com H_2O_2 e nem modulou a resposta antigênica. No que se refere à produção de colágeno, a proteína SPARC conseguiu reduzir esta a níveis basais, semelhante ao que ocorreu com as células tratadas com o meio condicionado de ASC.

Em conjunto, os resultados mostram que a proteína SPARC reduz a produção de colágeno assim como o meio condicionado, consistente com a ideia de que a SPARC participa, pelo menos em parte, da resposta benéfica associada ao transplante de ASC pós-infarto do miocárdio.

Descritores: Células-tronco; Tecido adiposo; Proteômica; SPARC proteína, humana; Colágeno; Morte celular; Peróxido de Hidrogênio.

Abstract

Santos MVN. *Anti-fibrotic effect of SPARC protein in cardiac fibroblasts (Potential mediator of the benefits associated with stem cell transplantation derived from adipose tissue post-myocardial infarction)* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Cardiac repair post-myocardial infarction (MI) remains a challenge despite great progress in clinical management and mortality reduction. In this sense, studies with pre-clinical models have shown that the transplantation of adult stem cells, such as stem cells derived from adipose tissue (ASCs), preserves ventricular function after MI. This improvement is not related to mechanisms of tissue replacement and cell transdifferentiation, but the paracrine action through the release of pleiotropic bioactive molecules. In the present study we tried to identify key proteins related with the beneficial pleiotropic response associated with ASC transplantation post-MI. We perform bioinformatic analyses of the proteins released by mASC subjected to stretch and hypoxia, mimmiking the MI microenvironment, to find novel targets. The network of interactions includes three candidates that interact with each other: SPARC, MMP-3 and Osteopontin. We standardized the model of cell death by H_2O_2 in cardiomyocytes, cardiac fibroblasts and endothelial cells, the three major cell types that form the heart, and evaluate the expression of these factors. The data show that hydrogen peroxide alters the expression of these factors heterogeneously in these cells and induces collagen production and secretion in fibroblasts. However, treatment with SPARC, Osteopontin and MMP-3 did not improve the viability of cells treated with H_2O_2 and does not influence the angiogenic response. Concerning to the production of collagen, SPARC protein could reduce this to basal levels, similar to what happened with the cells treated with conditioned medium of ASC.

Together, these results showed that SPARC protein reduces collagen production similarly to the conditioned medium treatment, which is consistent with the idea that SPARC is responsible, at least in part, for the beneficial effects associated with the transplanted ASC post-MI.

Descriptors: Stem cells; Adipose tissue; Proteomics; SPARC protein, human; Collagen; Cell death; Hydrogen peroxide.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fisiopatologia e Epidemiologia do Infarto do Miocárdio

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo sendo que, em 2008, esta foi a causa da morte de 17,3 milhões de pessoas, representando 30% da população mundial. Desses óbitos, 7,3 milhões foram decorrentes de infarto do miocárdio (1). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, as doenças do aparelho circulatório somavam 31,88% das doenças causadoras de morte em 2007 sendo que desta porcentagem, 48,9% referem-se a doença isquêmica do coração (2). Isto é o reflexo do envelhecimento da população e da diminuição da mortalidade pelas doenças infecto-parasitárias (3).

O infarto do miocárdio é uma doença isquêmica caracterizada pela diminuição ou interrupção do aporte sanguíneo ao músculo cardíaco. O prejuízo da função cardíaca é definido entre outros fatores, pelo tempo de isquemia, extensão da área de miocárdio atingida e a capacidade de formação de circulação colateral, fatores estes os quais vão definir o estado do músculo cardíaco pós-lesão (4, 5). Após a interrupção do fluxo sanguíneo, há morte celular dos cardiomiócitos, decorrente da falta de oxigenação destes e inicia-se uma resposta inflamatória, que irá eliminar estas células. Nesse momento, os fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos produtores de colágeno, os quais apresentam alterações fenotípicas, como a expressão de α-actina de músculo liso. Estas células migram para a região isquêmica onde há deposição de colágeno, o qual irá compor um tecido fibroso sem capacidade contrátil resultando, no decorrer do processo, em uma desestabilização do órgão como um todo, o qual pode progredir para um quadro de insuficiência cardíaca. Entretanto, posteriormente a esta fase, se houver a revascularização da área

de músculo infartado, há regiões em que as células podem reverter progressivamente seu estado latente e tornar o miocárdio saudável. Tais regiões são denominadas de áreas de miocárdio hibernante (6).

Devido à alta morbidade e mortalidade causada pelo infarto do miocárdio, vários tratamentos tem sido desenvolvidos, como as já bem estabelecidas terapias medicamentosas, angioplastia e o uso de *stents,* além das revascularizações cirúrgicas do miocárdio. Estas abordagens, apesar de terem melhorado nos últimos anos e contemplarem grande número de pacientes, ainda apresentam custo muito elevado e nem todos os pacientes são completamente beneficiados (7). Na busca por terapias alternativas mais eficazes e/ou complementares, pesquisadores vêm desenvolvendo estudos com vetores virais e plasmidiais, células geneticamente modificadas e tratamento com células-tronco ou meio condicionado, entre outras abordagens, visando à recuperação do miocárdio afetado por doenças de origem isquêmica (8-13).

1.2. Terapia Celular: Uso de Células-Tronco

Células-tronco são células não especializadas com uma extraordinária capacidade de auto-renovação, capazes de se diferenciar em um ou mais tipos de células maduras que desempenham importante papel na homeostase e reparação tecidual, tornando este tipo celular muito atrativo para pesquisas no campo da medicina regenerativa e no desenvolvimento de terapias que visam restaurar a função de órgãos comprometidos. Estas células, de um modo geral, podem ser divididas em dois grandes grupos: as embrionárias e as adultas. No contexto da terapia celular, ambos os tipos celulares têm se mostrado bastante

promissores no sentido de evitar o remodelamento ventricular e a falência cardíaca pós-infarto. Porém, devido a questões éticas e religiosas, além da dificuldade para isolamento e elevado potencial de formação de teratomas e teratocarcinomas (14, 15), células-tronco embrionárias tem sido exploradas para fins terapêuticos apenas em condições muito específicas e ainda distantes da aplicação clínica.

Tentando contornar esse problema, pesquisadores tem utilizado células-tronco adultas, visto que estas estão presentes em quase todos os tecidos do organismo adulto, apresentam alto grau de plasticidade (16) e promovem a manutenção de células viáveis ou a regeneração de tecidos lesados (17, 18), além de apresentarem baixo índice de geração de tumores quando injetadas (8, 11, 19).

Dentre as células-tronco adultas mais utilizadas no contexto da reparação, encontram-se as células mesenquimais (do inglês, *Mesenchymal Stem Cells*, MSC) (20, 21), com capacidade de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens celulares, principalmente osteoblastos, condrócitos, adipócitos e músculos, além de serem de fácil isolamento, cultivo e de apresentarem alta viabilidade *in vitro* (22-24).

Outra característica que favorece o uso das MSCs, do ponto de vista imunológico, é que estas células expressam níveis intermediários de MHC1 (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) e podem ser induzidas a expressar MHC2 e Fas-ligante quando tratadas com IFN-γ (do inglês, *Interferon gamma*), mas não expressam moléculas co-estimulatórias B7-1, B7-2, CD40 (Cluster de diferenciação) e ligante CD40 e, por conseguinte, ativam menos ou até não ativam a resposta celular mediada por células T em dadas circunstâncias (25).

Portanto, MSC alogênicas, isoladas de humanos e de outros mamíferos potencialmente não provocariam uma resposta proliferativa de células T no organismo receptor. Na verdade, MSCs suprimem a proliferação de células T de uma maneira MHC-dependente, além de limitar, ou mesmo inibir, a resposta inflamatória e promover vias anti-inflamatórias (25-31).

Muitos estudos pioneiros na área de terapia celular usaram MSCs derivadas da medula óssea, demonstrando que a administração dessas células melhorava a função cardíaca em modelos animais de infarto agudo do miocárdio e melhorava também a perfusão cardíaca em modelos crônicos de isquemia em porcos (32). Entretanto, algumas pesquisas demonstraram que as MSC derivadas da medula óssea apresentam algumas limitações, ou seja, são muito heterogêneas e sua manutenção em cultura não é simples, além de serem pobres em quantidade fazendo com que sua extração apresente baixo rendimento. No que se refere à sua obtenção, encontra-se outro ponto negativo, pois causam desconforto e dor aos pacientes (33-35). Tendo em vista todas essas dificuldades, outras fontes como o tecido adiposo, têm sido exploradas.

De fato, as células-tronco oriundas do tecido adiposo têm sido muito utilizadas em trabalhos deste laboratório e também da literatura (11, 24, 36). Deste tecido é possível isolar uma população homogênea e abundante de células-tronco mesenquimais (do inglês, *Adipose Stem Cells*, ASC) com elevado potencial terapêutico, através de procedimentos menos desconfortáveis e menos dolorosos (16, 33, 37). Estas células são mantidas em cultura por longos períodos sem perda de estabilidade do dobramento populacional, além de apresentarem alta capacidade de diferenciação em

várias linhagens celulares (16, 35). Além disso, alguns estudos comparativos entre ASCs e MSCs de medula óssea, demonstraram que o padrão fenotípico dessas células são semelhantes (38). Além disso, análises de expressão gênica demonstraram que menos de 1% dos genes dessas células são expressos diferencialmente (39).

Quando se refere ao tratamento do infarto do miocárdio com as células-tronco derivadas do tecido adiposo, o seu efeito benéfico já foi demonstrado por inúmeros trabalhos da literatura (40-42) e também por trabalhos deste laboratório, seja com roedores (8) ou com suínos (*Dariolli et al*., dados não publicados). Sendo assim, somadas as características biológicas e de manipulação, justifica-se a importância dos investimentos em estudos para o uso de ASC no tratamento de doenças como o infarto do miocárdio.

1.3. Terapia Celular: O Efeito Parácrino

Entretanto, apesar de muitos estudos pré-clínicos utilizando células-tronco de diferentes fontes terem apresentado melhora da função cardiovascular, evidências sugerem que esta melhora não está diretamente vinculada a mecanismos de transdiferenciação e substituição tecidual (8, 11, 43, 44), mas provavelmente a ação parácrina, principalmente, através da secreção de proteínas e citocinas pró-angiogênicas, anti-apoptóticas e de proliferação celular por essas células, importantes no contexto do reparo cardíaco pós-infarto (8, 11, 19).

Apesar da importância das proteínas secretadas por células-tronco, somente nos últimos anos, através dos avanços tecnológicos, experimentos cada vez mais apurados nesta área tem se tornado viáveis. As análises do

conjunto completo de proteínas secretadas - também conhecidas como "secretoma" - têm sido relatados em vários organismos e tipos celulares, sendo que o estudo da composição deste secretoma pode permitir a identificação de proteínas liberadas, que podem interagir entre si ou com outras proteínas de interesse, e podem ser candidatos para a utilização no desenvolvimento de novos tratamentos em doenças e distúrbios (45, 46).

Em nosso laboratório temos estudado o perfil secretório de células-tronco do tecido adiposo de diferentes espécies e em diferentes contextos. Dentre os fatores secretados por ASC humanas, são encontrados fatores pró-angiogênicos como as interleucinas, lFNγ, TGF-1β (do inglês, *Transforming Growth Factor beta 1*), TNFα (do inglês, *Tumor Necrosis Factor alpha*), EGF (do inglês, *Epidermal Growth Factor*), VEGF (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*), MCP-3 (do inglês, *Monocyte Chemotactic Protein-3*), TIMP-1 (do inglês, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1*), bFGF (do inglês, *Basic Fibroblast Growth Factor*), G-CSF (do inglês, *Granulocyte colony-stimulating fator*), GM-CSF, MMP-1, MMP-9, angiopoietina, endostatina e outras (47). Interessantemente, o secretoma de ASC de camundongos, submetidas à isquemia *in vitro* e estiramento, revela a presença de proteínas de diversas classes funcionais destacando-se metaloproteinases (MMPs), *heat shock proteins* (HSPs), fatores de mobilização de células como o SDF-3, pró-colágenos, SPARC (do inglês, *Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*), periostina, osteopontina, glicoproteína sulfatada, folistatina, aczonina, proliferina, Tcp-10 (do inglês, *T-complex protein 10*), Vat1 (do inglês, *Vesicle Amine Transport 1*) (*Nakamuta et al.,* dados não publicados), além de encontrar também TSP-1,-2 e -4, CCN1 e CCN2 (48). Essas proteínas são reguladas

positivamente durante a injúria e remodelamento cardíaco, e apresentam um importante papel na modulação de vias inflamatórias, reparadoras, fibróticas e angiogênicas. Outros estudos mostraram que, quando se submetem ASCs humanas (49) e de porcos (*Dariolli et al*., dados não publicados) ao *shear stress*, observa-se uma regulação positiva de VEGF e NO secretados por essas células. Contudo, pode-se correlacionar a ampla gama de fatores observados no secretoma das células-tronco do tecido adiposo a processos de interesse no contexto da isquemia cardíaca, tais como:

- **Remodelamento cardíaco** – Estudos demonstraram que a inibição de proteases da família das metaloproteinases (MMPs) e proteínas estruturais da matriz extracelular melhoram a função cardiovascular (50, 51).

- **Apoptose** – As células-tronco atuam, de forma parácrina, minimizando ou prevenindo a morte de cardiomiócitos durante a isquemia, contribuindo assim para a preservação da função cardíaca. Este efeito foi demonstrado com diferentes populações de células-tronco em modelos animais de isquemia cardíaca (52).

- **Angiogênese** – Durante o evento isquêmico, o fator induzido por hipóxia (Hif-1α) aumenta a expressão de VEGF, citocina envolvida na neoangiogênese e vasculogênese reparativas, estimulando assim a formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes. Isso ocorre através de mecanismos de proliferação de células endoteliais e reorganização da lâmina basal vascular e da formação *de novo* de vasos por células progenitoras endoteliais e precursoras hematopoiéticas. Além disso, o VEGF previne a apoptose durante a hipoperfusão tanto de cardiomiócitos quanto de células endoteliais (53, 54). Portanto, o desenvolvimento do aporte vascular colateral

pós-lesão contribui para a recuperação do miocárdio infartado e é um mecanismo de adaptação natural e essencial (55, 56).

- **Produção de colágeno** – Células mesequimais secretam alguns fatores que podem regular a produção e secreção de colágeno por fibroblastos, sendo a proteína SPARC uma das responsáveis por esse efeito (57, 58). Além disso, outros estudos demonstraram que a injeção de ASC no coração infartado aumenta a quantidade de fibras de colágeno mais maleáveis, em relação às mais resistentes, contribuindo assim para a melhora da função cardíaca (*Dariolli et al*., dados não publicados).

A variedade de citocinas, proteínas e fatores de crescimento secretados pelas células-tronco colaboram para a melhora da função e geometria cardíaca durante a isquemia (44, 59). Em relação a esses fatores, estudos revelam que utilizando o meio de cultura condicionado (MC) destas células, e injetando-se esse meio no coração infartado, observa-se um efeito protetor sobre a deterioração da função cardíaca, sobre o progresso da necrose de membro inferior isquêmico e sobre a isquemia cerebral (59-63). Esses efeitos podem ser aumentados após modificações genéticas ou submetendo estas células previamente a cultivo em condição de hipóxia (60).

Portanto, do ponto de vista da modulação de processos envolvidos na evolução da disfunção cardíaca, a exploração dos efeitos da terapia com células-tronco derivadas do tecido adiposo pode ser fundamentada na liberação de proteínas e citocinas bioativas, sendo estas importantes para a construção da cicatriz pós-lesão e para a formação de vasos. Isto é crucial para determinar a evolução funcional do órgão pós-lesão. Nesse sentido, estudos

que visam avaliar a cinética concentração-resposta de tais fatores são fundamentais para a aplicação na rotina clínica desse tratamento.

Apesar disso, ainda não se sabe quais fatores são responsáveis pela melhora observada, se são apenas alguns ou todos em conjunto.

1.4. A importância de modelos celulares

Apesar de estudos com animais na área de terapia celular e, principalmente, infarto do miocárdio serem de grande relevância para a ciência, os modelos celulares são ferramentas importantes para o desenvolvimento de estudos mais centrados, buscando entender a relevância dos dados obtidos nos modelos *in vivo*.

De fato, os modelos experimentais *in vitro* permitem ao pesquisador estudar um sistema biológico, mantendo um elevado nível de controle sobre os parâmetros experimentais. Esses modelos são necessários tanto para entender melhor alguns mecanismos biológicos como para desenvolver abordagens terapêuticas para, por exemplo, regenerar e restaurar a função cardíaca pós-injúria. Por isso, um modelo ideal deve ser de baixo custo, facilmente manipulado e reproduzível, além de recapitular a fisiopatologia de interesse (64).

Visto isso, trabalhos utilizando modelos celulares para encontrar alvos, que possam substituir e/ou colaborar para o beneficio do uso da terapia com células-tronco no cenário da isquemia miocárdica, são importantes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Considerando a natureza interativa dos fatores secretados por ASC que pode explicar o efeito parácrino do transplante das células-tronco, o objetivo do estudo é testar a hipótese, por meio de utilização de modelos *in vitro*, de que os fatores MMP-3, SPARC e Osteopontina influenciam favoravelmente o remodelamento cardíaco após isquemia.

2.2. Objetivos Específicos

a) Utilizar abordagens "*in silico*" para análises de enriquecimento e de interação para os fatores encontrados no secretoma de mASC;

b) Estabelecer modelo de morte celular;

c) Avaliar a expressão de proteínas-alvo derivadas do secretoma de mASC nos diferentes tipos celulares;

d) Avaliar o efeito das proteínas-alvo sobre a viabilidade celular, produção de colágeno e angiogênese.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análise do Secretoma

Os dados obtidos por este laboratório (*Nakamuta et al*., dados não publicados) a partir do secretoma de mASC submetidas ao estiramento mecânico (*stretch*) e hipóxia durante 24 horas, foram analisados utilizando o software *GeneGo MetaCore* (v 6.8 build 30387; Thomson Reuters, St Joseph, MI). O *MetaCore* é um banco de dados de conhecimentos integrados com um software para análise de dados experimentais, sendo alimentado manualmente com informações, dentre outras, de interação de proteína-proteína, vias metabólicas e de sinalização.

O número de acesso das proteínas foi importado para o *MetaCore* e as análises de enriquecimento e de interação foram realizadas. A análise de enriquecimento foi feita para obter os principais processos, de acordo com o *p* valor, relacionados às proteínas do secretoma e também às três proteínas de interesse (SPARC, Osteopontina e MMP-3). Uma revisão da literatura para trabalhos científicos que apresentaram dados de expressão de genes e/ou de proteínas do tecido cardíaco isquêmico também foi realizada. Com o software *MetaCore*, foram obtidos os principais processos relacionados com os fatores sub- e super-expressos no tecido cardíaco pós-infarto.

A análise de interação foi utilizada para as principais proteínas secretadas por mASC e também para os fatores mais representativos no IM, sub- e super-expressos, com as três proteínas de interesse.

3.2. Extração e cultivo de fibroblasto cardíaco

Os fibroblastos cardíacos foram extraídos de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos adultos (1 a 2 animais em cada extração). Os animais foram mantidos no biotério de manutenção do Instituto do Coração (InCor) a temperatura ambiente entre 22-28ºC, luz controlada em ciclo de 12 horas (claro-escuro) e com livre acesso à comida e água. Os procedimentos experimentais seguiram as normas institucionais para o cuidado e uso de animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo #085/14).

Os animais foram mortos por "*overdose*" de pentobarbital sódico (80 mg/kg), através de injeção intraperitoneal. Após constatação da parada cardíaca, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, foi realizada a tricotomia e antissepsia e uma incisão cutânea transversal foi feita estendendo-se por todo tórax do animal. O coração foi removido cirurgicamente, com auxílio de pinça e tesoura esterilizadas, e transferido para um tubo plástico contendo tampão fosfato salino gelado (140mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10mM de Na_2HPO_4 e 1,8mM de KH_2PO_4 - PBS). Os corações foram transferidos para Placa de Petri dentro do fluxo laminar e seccionados. O tecido seccionado foi transferido para tubo plástico contendo 5mL de solução de colagenase e tripsina tipo 2 (50mg de colagenase tipo 2 – Worthington, USA; 50mg de tripsina de pâncreas suíno tipo 2 – Sigma-Aldrich; 7,5mg de BSA – Sigma-Aldrich; e 100mL de PBS com 1% P/S) e mantido sob agitação a 37°C por períodos de quinze minutos até completa dissociação do tecido cardíaco. As duas primeiras digestões foram desprezadas. Após cada período de incubação

o sobrenadante foi recuperado e acrescido de 1mL de soro fetal bovino (Gibco – FBS) para inibição da ação da colagenase. Esta suspensão de células foi submetida à centrifugação (1.500rpm por 5 minutos a 4ºC) e o *pellet* obtido de cada etapa foi ressuspendido em DMEM *High* acrescido de 10% de FBS e 1% de P/S e posteriormente transferido para garrafa de 75cm^2 que foi mantida em atmosfera úmida contendo 5% de CO^2 a 37°C. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por DMEM *High* suplementado com 10% de FBS e 1% de P/S.

As células foram repicadas sempre que atingiam 80% de confluência. Estas foram soltas da superfície utilizando solução de tripsina por aproximadamente 3 minutos a 37ºC. A tripsina foi inativada com FBS. As células foram submetidas a contagem em Câmara de Neubauer sob coloração com *Trypan Blue*. Para os experimentos, as células foram utilizadas entre a terceira e quinta passagem, sendo plaqueadas na concentração de 2x10^4/cm^2.

3.3. Extração e cultivo de ASC

As células-tronco mesenquimais foram obtidas do tecido adiposo branco localizado na região inguinal de ratos Wistar (machos) com peso entre 250 e 300g. Resumidamente, os animais foram mortos por "*overdose*" de pentobarbital sódico (80 mg/kg), através de injeção intraperitoneal. Foi feita a tricotomia e antissepsia dos membros inferiores. A gordura inguinal foi removida cirurgicamente e armazenada em PBS a 4°C. O tecido foi digerido mecanicamente e posteriormente submetido à digestão enzimática em solução de colagenase tipo 1A a 37ºC por 45 minutos. O material digerido foi

centrifugado a 1.200rpm por cinco minutos à 4°C e o *pellet* obtido foi ressuspendido em DMEM *Low* suplementado com 10% de FBS, 1% P/S. As células foram plaqueadas e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C.

As células foram repicadas sempre que atingiam 80% de confluência. Estas foram soltas da superfície utilizando solução de tripsina por aproximadamente 3 minutos a 37ºC. A tripsina foi inativada com FBS. As células foram submetidas a contagem em Câmara de Neubauer sob coloração com *Trypan Blue*.

Para os experimentos com o meio condicionado de ASC, as células foram utilizadas entre a terceira e quarta passagem, sendo plaqueadas na concentração de $2x10^4/cm^2$ durante 24 horas. Após esse período, foi realizado o *starving overnight* e, no outro dia, o meio foi novamente trocado por meio sem soro e as células cultivadas por mais 24 horas. Ao final das 24h, o meio foi coletado, centrifugado a 1.500rpm por 5 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi aliquotado e armazenado a -20ºC. Nos experimentos com meio condicionado, foi utilizado o tratamento das células (cardiomiócitos, fibroblastos e endoteliais) com 50% do meio de ASC e 50% do respectivo meio de cada célula.

3.4. Extração e cultivo de cardiomiócito de neonato

Em cada extração de cardiomiócitos de neonatos foram utilizados de 10 a 20 ratos Wistar (*Rattus norvegicus)*, com 24 a 48 horas de nascidos, os quais foram mortos por decapitação. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e uma incisão cutânea transversal foi feita estendendo-se por todo tórax

do animal; os corações foram retirados e transferidos para placa de petri contendo ADS 1X. O tecido foi então seccionado e transferido para tubo plástico contendo 3mL de solução de colagenase tipo 2 e pancreatina (18mg de pancreatina – Sigma-Aldrich; 36mg de colagenase tipo 2 – Worthington, USA; 90mL de ADS 1X) e mantido sob agitação a 37°C por períodos de quinze minutos. Após cada período de incubação o sobrenadante foi recuperado e acrescido de 1ml de NBCS (*Newborn Calf Serum*). Esta suspensão de células foi submetida à centrifugação a 1.100rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram feitas um total de 5 digestões. O precipitado obtido de cada etapa foi ressuspendido em meio DMEM *Low*/Meio 199 (4:1) e plaqueados em garrafas T75 por 45 minutos para a adesão de fibroblastos (*preplating*). Após isso, o meio foi retirado e centrifugado a 1.100rpm por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em DMEM *Low*/Meio 199 (4:1) com HrS (*Horse Serum*) (10%), NBCS (5%) e Bromodeoxiuridine (BrdU – 1%), para evitar o crescimento de fibroblastos. As células foram plaqueadas na concentração de $10^6/cm^2$ em placas cobertas com laminina. Após 72 horas, o meio de cultura foi trocado por DMEM *Low*/Meio 199 com 1% de NBCS e sem BrdU.

3.5. Cultivo de células endoteliais

Foram utilizadas células endoteliais derivadas de veia umbilical humana (hUVEC) fornecidas pela empresa LONZA (Lonza, Walkersville, MD USA, nº de catálogo: CC-2519). Estas células foram cultivadas em placas com gelatina e em meio EGM (*Endothelial Cell Growth Medium*; Lonza, Walkersville, MD

USA), mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO^2 a 37°C e utilizadas entre a terceira e a oitava passagens.

As células foram repicadas sempre que atingiam 80% de confluência. Estas foram soltas da superfície utilizando solução de tripsina por aproximadamente 3 minutos a 37ºC. A tripsina foi inativada com FBS. As células foram submetidas a contagem em Câmara de Neubauer sob coloração com *Trypan Blue*. Para os experimentos, as células foram utilizadas entre a terceira e oitava passagem, sendo plaqueadas na concentração de $2x10^4/cm^2$.

3.6. Indução de hipóxia *in vitro*

3.6.1. Fibroblastos cardíacos

Vinte e quatro horas após as células serem plaqueadas, o meio de cultura foi substituído por meio sem soro (*starving*) por um período de 16 horas. Após esse período, o meio foi novamente substituído por meio sem soro e as células foram mantidas durante o tempo de indução de *stress* em estufa (Thermo Fisher) com controle das tensões de oxigênio (1% O_2) e gás carbônico (5% CO_2) por um período de 24 horas.

3.6.2. Cardiomiócitos

Setenta e duas horas após a extração, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM *Low*/Meio 199 (4:1) com 1% de NBCS. Após uma hora em meio sem soro (*starving*), o meio foi novamente trocado e as células foram mantidas por 24 horas em hipóxia por baixa concentração de oxigênio. Ao final desse período, foi realizado o ensaio de viabilidade celular.

3.7. Indução de morte celular por H_2O_2

3.7.1. Cardiomiócitos

Setenta e duas horas após a extração, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM *Low*/Meio 199 (4:1) com 1% de NBCS. Após uma hora (*starving*), o meio foi novamente trocado, a solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - Sigma-Aldrich) em diferentes concentrações foi adicionada e as células foram incubadas por 3, 6 ou 12 horas.

3.7.2. Fibroblastos cardíacos

Vinte e quatro horas após serem plaqueados, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM *High* sem soro durante 16 horas (*starving*). Após esse período, o meio foi trocado, a solução de H_2O_2 (200 e 300µM) foi adicionada e as células foram incubadas por 6 horas.

3.7.3. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

Vinte e quatro horas após serem plaqueados, o meio de cultura foi trocado por meio EBM, sem soro e sem fatores de crescimento, a solução de H_2O_2 em diferentes concentrações foi adicionada e as células foram incubadas por 6 horas.

3.8. Determinação do tempo mínimo de tratamento com H_2O_2

Cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e HUVECs foram tratados com peróxido de hidrogênio por 10, 20, 30, 40 e 60 minutos. Após esse período, o meio de cultura foi trocado por meio de cultura fresco e livre de H_2O_2 e o experimento realizado até completar 6 horas. Ao final, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT.

3.9. Tratamento das células com os fatores e o meio condicionado

Cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos foram tratados com 200µM de H_2O_2 e as HUVECs com 800uM de H_2O_2, por 60 minutos. Após esse período, o meio de cultura foi trocado por meio de cultura fresco, livre de peróxido de hidrogênio, com os fatores SPARC, MMP-3 e Osteopontina ou com meio condicionado de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo por mais 5 horas. Ao final, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT.

3.10. Ensaio de viabilidade celular - MTT

Para avaliar a viabilidade celular, o método utilizado foi o colorimétrico pelo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), que é baseado na análise da redução do reagente MTT em *formazan*, pela ação de desidrogenases mitocondriais, sendo que a presença destas enzimas ativas é um indicativo de viabilidade celular.

Fibroblastos cardíacos, cardiomiócitos e HUVECs foram plaqueadas em placas de 96 poços. As células foram tratadas com diferentes concentrações de H_2O_2 e cultivadas a 37°C. Três horas antes do final do experimento, adicionou-se 20uL da solução de MTT (Sigma-Aldrich, 5mg/mL) em cada poço. Ao final do experimento, o sobrenadante foi removido e os cristais de *formazan* foram dissolvidos com 200uL de DMSO (Sigma-Aldrich). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 490nm (Wallac VICTOR 2). A viabilidade dos controles foi calculada através da absorbância de cada controle em relação à absorbância média de todos os controles e multiplicada por 100. A viabilidade dos tratamentos foi calculada pela absorbância das células

tratadas em relação ao seu respectivo controle e multiplicada por 100.e os resultados são expressos como porcentagem do controle.

3.11. Análise da viabilidade celular por Anexina V/iodeto de propídeo (PI)

A citometria de fluxo foi utilizada para caracterizar a viabilidade das células em hipóxia e normóxia, através da marcação com Anexina V e PI (Iodeto de propídio) (BD Biosciences). Ao final do experimento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 1.500rpm por 5 minutos a 4ºC e o *pellet* foi re-suspendido em 1mL de *Binding Buffer* (10mM de Hepes, 140mM de NaCl, 2,5mM de $CaCl_2$, pH 7,4). As células foram contadas em câmara de Neubauer e alíquotas contendo $1x10^5$ células foram preparadas. Cada alíquota foi lavada duas vezes com PBS gelado e centrifugado a 1.500rpm por 5 minutos a 4ºC. Após a última lavagem, foram adicionados 100uL de *Binding Buffer* em cada alíquota, juntamente com 5uL de Anexina V e 5uL de PI. As células foram encubadas à temperatura ambiente e no escuro por 15 minutos. Ao final desse período, adicionou-se 400uL de *Binding Buffer* em cada tubo e um total de 10.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur e o software *Cell Quest* (BD Biosciences) foi utilizado para a análise dos dados obtidos.

3.12. Análise da viabilidade celular por ensaio de TUNEL

O TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-mediated dUDP-biotin nick-end labeling*) foi usado em associação com uma enzima para

marcar DNA fragmentado e indicar apoptose. A marcação com TUNEL foi utilizada para estudar a extensão da morte celular nas células tratadas com H_2O_2.

HUVECs foram tratadas por 6 horas e, ao final desse período, foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA) por uma hora, lavadas com PBS novamente, permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 por 2 minutos no gelo e incubadas com fluoresceína dUTP na presença da enzima *terminal deoxynucleotidyl transferase* (Roche) por 60 minutos a 37ºC. As células foram lavadas três vezes com PBS e fotografadas por microscopia de fluorescência (excitação 488 nm e detecção 560 nm).

3.13. Modelo de angiogênese por formação de tubo (*capilar-like*) em matriz

Foram adicionados 40 μL de Geltrex com concentração reduzida de fator de crescimento (Life Technologies) em cada poço da placa de 96 poços e incubados por 30 minutos a 37ºC para a polimerização. HUVECs entre a segunda e quinta passagem e com uma densidade de $1{,}0x10^4$ células/poço foram plaqueadas em duplicata em meio EBM com 0,5% de soro e sem fatores de crescimento. As placas foram incubadas por 10 horas a 37ºC e fotografadas com um microscópio invertido, com objetiva de 4x. As redes foram quantificadas utilizando o programa ImageJ e o *plugin Angiogenesis Analyzer*, sendo que os critérios utilizados foram o número de tubos formados, a área média desses tubos e o número de ramificações.

3.14. Análise da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por Dihidroetídio (DHE)

Após 24 horas de incubação em normóxia ou hipóxia, as células foram retiradas da incubadora, lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas com PBS/DTPA (0,5mL) com uma concentração final de DHE (Life Technologies) de 50µM (2,5uL da solução estoque de DHE 10mM) por 30 minutos em normóxia ou hipóxia, respectivamente. Ao final desse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X, lisadas em presença de acetonitrila (0,5mL) e centrifugadas (12.000rpm por 10 minutos a 4°C) para a retirada de restos celulares. O sobrenadante foi drenado utilizando Speed Vac (Thermo Savant) e os *pellets* mantidos no escuro a -80°C até a análise. No dia da análise, as amostras foram ressuspendidas em 120uL de PBS/DTPA e injetadas no sistema HPLC (cromatografia líquida de alta performance - Espectrofotômetro Beckman DU-640) para a detecção de DHE e seus derivados. DHE foi monitorado por absorção na região UV a 245nm, enquanto que os compostos fluorescentes EOH e etídio foram monitorados por detecção por fluorescência (excitação 510nm, emissão 595nm). Durante a separação cromatográfica, a quantificação de DHE remanescente foi utilizada como controle interno da extração. Sendo assim, os dados foram expressos como EOH por DHE consumido (EOH/DHE) e etídio por DHE consumido (E/DHE). O DHE consumido foi calculado como a diferença entre a concentração inicial adicionada às células e o DHE remanescente no extrato celular quantificada por HPLC.

3.15. Análise da concentração de H_2O_2 por *Amplex Red*

A quantificação do peróxido de hidrogênio remanescente no meio de cultura das células tratadas foi realizada pelo ensaio de fluorescência com *Amplex Red* (Life Technologies). O *Amplex Red* (10-acetil-3,7-diidroxifenoxazina), na presença de peroxidase de raiz forte (HRP) reage com H_2O_2, em uma proporção de 1:1, para produzir resorufina, um composto vermelho, estável e fluorescente.

Para esse experimento, os fibroblastos cardíacos foram plaqueados em DMEM High sem *fenol red* e sem soro. Após o tratamento com o peróxido de hidrogênio, 1µL do meio foi diluído em 999µL de tampão de fosfato de sódio (0,05M, pH 7,4). As amostras foram pipetadas (50µL), em triplicata, em uma placa de 96 poços com a lateral e o fundo preto. Para cada poço foram adicionados 50uL de solução de *Amplex Red* (0,5uL de *Amplex Red* 10mM, 1µL de HRP 10U/mL e 48,5µL de tampão fosfato de sódio 0,05M). A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após esse tempo, a leitura foi realizada por fluorescência com o SpectraMax M5 (Molecular Devices) (excitação 550nm / emissão 590nm).

3.16. Quantificação de colágeno solúvel

Para a quantificação de colágeno solúvel, utilizou-se o kit Sircol (Biocolor). Ao final do experimento, 100uL do meio de cultura dos fibroblastos (placa de 60mm) foi aliquotado e adicionou-se 0,25mL de "*Sircol Dye Reagent*". Os tubos foram fechados, misturados por inversão e colocados em agitador orbital por 30 minutos a 4ºC. Após esse período, os tubos foram centrifugados

(10 minutos, 12.000rpm e temperatura ambiente) e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 0,4mL de "*Ice-cold Acid-Salt Wash Reagent*" e os tubos foram novamente centrifugados (10 minutos, 12.000rpm e temperatura ambiente) . Após descartar o sobrenadante, adicionou-se 0,25mL de "*Alkali Reagent*" em todos os tubos. Os tubos foram fechados e misturados utilizando um vórtex. Transferiu-se 0,2mL de cada amostra para uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida utilizando filtro de 555 nm.

3.17. Quantificação de colágeno tipo I por Imunofluorescência por *High Content Screening* (HCS)

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados em placas de 96 poços com lateral escura e fundo transparente. A quantificação de colágeno tipo I foi realizada em fibroblastos cardíacos tratados com H_2O_2 e SPARC. Após o experimento, a placa foi centrifugada a 1.200rpm por 5 minutos, o meio foi retirado e a placa lavada duas vezes com D-PBS (0,9mM $CaCl_2$, 0,49mM $MgCl_2$, 2,66mM KCl, 1,47mM KH_2PO4, 137,9mM NaCl, 8,05mM Na_2HPO4). Após as lavagens, a placa foi fixada com PFA 4% por 60 minutos à temperatura ambiente, sendo seguida de mais duas lavagens com D-PBS. Para a permeabilização, utilizou-se o Triton 0,1% por 15 minutos a 4ºC, sendo seguido novamente por duas lavagens com D-PBS. O bloqueio foi feito com BSA 5% por 60 minutos à temperatura ambiente. Ao final desse período, os poços foram incubados com 60µL de anticorpo primário anti-colágeno tipo I (Abcam, Cambridge MA – diluição 1:500) diluído em BSA 2% e incubado overnight a 4ºC.

No outro dia foi realizada a lavagem duas vezes com D-PBS e os poços incubados com 60µL de anticorpo secundário (Alexa 488;1:500) e DAPI (1:100) (Life Technologies) por uma hora em temperatura ambiente e protegido da luz. Após esse período, os poços foram lavados novamente com D-PBS duas vezes, a leitura foi realizada e as imagens foram obtidas no aparelho *ImageXpress Micro Widefield High-Content Imaging System* (Molecular Devices).

.

3.18. Preparação e concentração do meio de cultura condicionado para análise de proteínas por western-blot

Após 6 horas de tratamento com H_2O_2, 2mL do meio condicionado de fibroblastos cardíacos foram centrifugados a 4.000rpm utilizando o sistema de filtro Millipore Amicon Ultra, por 45 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, o tubo foi esvaziado e adicionou-se 2mL de PBS para um ciclo de lavagem. A quantificação de proteína foi feita utilizando o kit BCA (Pierce Company).

3.19. Extração de proteínas e análise por Western blot

Para analisar a expressão de proteínas após tratamento com H_2O_2 ou incubação em hipóxia, o homogenato do lisado celular de cada grupo experimental foi extraído. Para análise de proteínas apoptóticas, após o estímulo, o meio de cultura foi coletado, centrifugado a 1.500rpm por cinco minutos a 4ºC e o *pellet* foi coletado em 20µL de tampão SDS (SDS a 2%, 5% de glicerol, Tris 60 mM, pH 6,8). Esta etapa é importante para recolher células

que estão em processo de morte celular e que tenham se soltado da placa. As placas foram lavadas com PBS duas vezes e as células lisadas, através de raspagem mecânica, com 80µL de tampão SDS. O material lisado foi incubado a 100ºC por 10 minutos e centrifugado a 12.000rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. A concentração de proteínas foi dosada pelo kit BCA (Pierce Company), de acordo com as especificações do fabricante.

Para a realização da eletroforese, 25µg de proteínas totais com 50mM de ditiotreitol (DTT) foram aplicadas nos géis de SDS-PAGE de bis-acrilamida. Ao final da corrida e, consequentemente, da separação das proteínas, as mesmas foram transferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare Life Sciences) em um sistema semiúmido (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell – Biorad) por 60 minutos. As membranas foram bloqueadas com BSA a 5% em TBS com 0,1% de Tween 20 (TBST 0,1%) por 60 minutos.

Ao final do bloqueio, a membrana foi incubada por 16 horas (*overnight*) a 4ºC, sob agitação, com anticorpos primários específicos contra: SPARC (Abcam, Cambridge, MA), MMP-3 (Santa Cruz Biotechnology), Osteopontina (Abcam, Cambridge, MA) e caspase-3 (Abcam, Cambridge, MA), diluídos em 5% de BSA em TBS-T 0,1%. As membranas foram também incubadas com um anticorpo monoclonal para GAPDH ou b-actina (Abcam, Cambridge, MA) como um controle interno. Após incubação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Invitrogen), as proteínas ligadas foram detectadas usando quimioluminescência (ECL) (GE Healthcare, Piscataway, NJ). As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o software ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

3.20. Real Time – PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real foi utilizada para analisar e quantificar a expressão gênica dos transcritos dos genes SPARC, Osteopontina e MMP-3 de cardiomiócitos, fibroblastos e HUVECs submetidos ou não ao tratamento com H_2O_2.

3.20.1. Extração de RNA

As células foram lisadas das placas de cultura utilizando 1mL de TRizol e centrifugadas a 12.000rpm por 10 minutos a 4ºC para retirada de material insolúvel. Essa solução foi incubada por cinco minutos à temperatura ambiente, permitindo assim a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após esse período, foi adicionado 0,2mL de clorofórmio, homogeneizado e incubado novamente à temperatura ambiente, por três minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000rpm por 15 minutos a 4ºC e a fase aquosa foi descartada. O RNA foi precipitado com 0,5mL de isopropanol durante dez minutos à temperatura ambiente, sendo centrifugado novamente a 12.000rpm por dez minutos a 4ºC.

O sedimento de RNA foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugado a 7.500rpm por cinco minutos a 4ºC. Após a retirada do sobrenadante, o *pellet* de RNA foi seco em temperatura ambiente, durante cinco minutos, sendo então dissolvido em água destilada livre de DNAse e RNAse, Para inativar qualquer resíduo de RNAse, as amostras foram incubadas por dez minutos a 60ºC e armazenadas à -80ºC.

3.20.2. Verificação da Integridade do RNA

O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260nm, usando-se Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific), sendo que a razão entre 260 e 280nm foi utilizada para estimar a qualidade da extração. A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, sendo realizada com corrente constante de 70mA por 45 minutos. Terminada a eletroforese, o gel foi corado com Brometo de Etídio (Invitrogen).

3.20.3. Transcrição Reversa do RNA

A transcrição reversa do RNA das células foi realizada utilizando o kit de síntese de cDNA SuperScript II (Invitrogen), segundo manual do fabricante. Esse processo converte as moléculas de RNA em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). Para as amostras contendo 1µg de RNA total foram adicionados 1µL de OligodT (0,5ug/uL), 1µL de dNTP's (10mM) e um volume de H_2O DEPC totalizando 12µL de volume final, sendo que esta solução foi incubada por 5 minutos a 65ºC. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 minuto a 4ºC e então foi adicionado 4µL de tampão de transcriptase reversa (*MMLV reverse transcriptase* 5x buffer), 2µL de DTT 0,1M e 1µL de *RNAseOut* 40U/µL, seguido de incubação por 2 minutos a 42ºC. Após isso, 1µL de transcriptase reversa (200U/µL) foi adicionado à mistura e cada amostra foi incubada por 50 minutos a 42ºC, seguido por um período de 15 minutos a 70ºC. No final, todas as amostras foram armazenadas a -20ºC.

3.20.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas em um sistema ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), utilizando o kit SYBR Green

PCR Master Mix-PE (Applied Biosystems), sendo todas as amostras dosadas em duplicata. O gene da ciclofilina foi utilizado como gene controle para normalização dos dados obtidos.

O volume reacional de 20µL contendo 1µL de cDNA foi utilizado, sendo que cada amostra foi colocada em um mix para a realização da PCR contendo 200nM de cada *primer*, 10µL de 2x SYBR Green PCR Master Mix (composta de AmpliTaq DNA Polimerase, SYBR Green Buffer, SYBR Green I, dNTP's e ROX) e 7,96µL de água DEPC. Esse mix foi submetido a 95ºC por dez minutos para a ativação da Taq DNA Polimerase, seguido de 95ºC por 15 segundos repetidamente por 50 ciclos e então a 60ºC por 60 segundos como período de extensão, sendo esta a etapa de coleta do sinal de fluorescência.

Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 1 e foram sintetizados comercialmente.

Tabela 1: Primers para análise da expressão de SPARC, Osteopontina e MMP-3

Gene	Organismo	*Forward Primer*	*Reverse Primer*
SPARC	Rato	TTGAAAAGGTGTGCAGCAA	TTCGGTCAGCTCAGAATCC
	Humano	TAGGTTTCCCTCCAACCGTG	TGGGTCAAACTCCAACTGTGA
Osteopontina	Rato	GCCAAGGACCAACTACAACC	TGAGATGGGTCAGGCTTCAG
	Humano	TCACCTGTGCCATACCAGTT	TACTTGGAAGGGTCTGTGGG
MMP-3	Rato	CACTTTCCCTGCATTTGGAT	GAGAACTTTCCAGGCATTGG
	Humano	CCTCTGATGGCCCAGAATTGA	GAAATTGGCCACTCCCTGGGT

3.21. Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Diferenças estatisticamente significantes foram analisadas

pelo teste t de *Studant* não pareado entre duas medidas, e análise de variância (ANOVA) quando mais de duas variáveis foram consideradas. O grau de significância foi definido com $p<0,05$. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o Software GraphPad Prism 6 (GraphPad Softwares Inc., CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Análise do secretoma de mASC submetida a hipóxia e estiramento

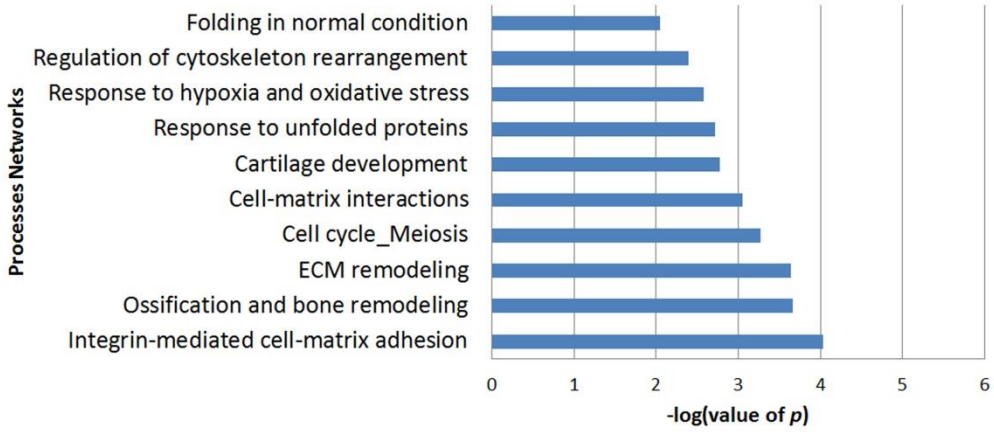
As análises de proteínas secretadas por células-tronco derivadas de tecido adiposo de camundongo (mASC) submetidas à hipóxia e ao estresse por estiramento mecânico (*stretch*) por 24 horas, realizadas previamente por este laboratório (*Nakamuta et al*., dados não publicados) , geraram uma lista com 39 fatores diferencialmente expressos (Tabela 2). Por meio de análises de enriquecimento realizadas através de ferramenta de bioinformática (*GeneGo MetaCore*), estes fatores foram listados conforme seus processos biológicos relevantes. Os 10 processos mais expressivos, de acordo com o *p* valor, estão listados na Figura 1A e se relacionam, principalmente, com respostas ao estresse oxidativo e hipóxia, adesão celular, remodelamento de matriz e estrutura (*folding*) de proteínas.

De acordo com essa classificação, uma segunda lista foi gerada. Nesta, os fatores que são normalmente secretados por mASC foram apresentados: OSF-2/periostina, osteonectina/SPARC, Osteopontina, peroxiredoxina 1, superóxido dismutase e matriz metaloproteinase 3 (MMP-3). Em seguida, uma análise de interação utilizando o software *GeneGo MetaCore* foi realizada com os seis fatores, mostrando que três destes interagiam entre si (Figura 1B). Na interação sugerida, a Osteopontina é clivada e ativada por MMP-3, que também cliva e inativa a SPARC. Através de nova análise de enriquecimento para as três proteínas, foram obtidos os principais processos relacionados a elas (Figura 1C), com destaque para o crescimento celular e proliferação, adesão e migração celular, resposta imune e angiogênese.

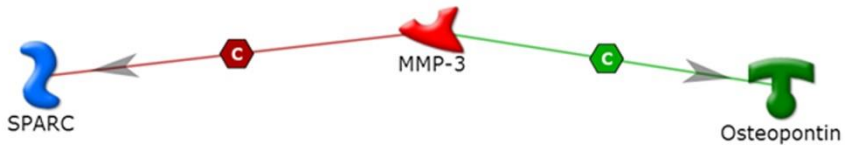
Tabela 2: Fatores encontrados no secretoma de mASC submetida à hipóxia e estiramento por 24 horas (*Nakamuta et al.* – dados não publicados).

Entry	Protein Name	Entry	Protein Name
P63101	14-3-3 zeta	Q9D0F3	Lectin, mannose-binding, 1
Q8BFZ3	Actin, beta-like 2	P28862	Matrix metalloproteinase-3
P57780	Actinin alpha 4	O88737	mKIAA0434 protein
Q9QYX7	Aczonin	Q05DL4	Mpa2l protein
Q61275	Alpha-actin (AA 27-375)	Q9Z2C9	Myotubularin related protein 7
Q61272	Alpha-actin (AA 40-375)	P07214	Osteonectin, SPARC
P68033	Alpha-cardiac actin	P10923	Osteopontin
Q8K314	Atp2b1 protein	Q62009	Periostin, OSF-2
P60710	Beta-actin (AA 27-375)	P35700	Peroxiredoxin 1
A2AQ07	Beta-tubulin	O08807	Peroxiredoxin 4
P28653	Biglycan	Q9JIG4	Ppp1r3f protein
Q8CGM1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 2	Q01149	Pro-alpha-2(I) collagen
P11087	Collagen pro-alpha-1 type I chain	P04768	Proliferin-3
P08228	Cu/Zn-superoxide dismutase	Q60665	Proto-oncogene, DE3 isoform
Q8BUR4	DOCK180	Q99KG3	RNA binding protein
Q8R1A4	DOCK7	P97298	SDF3
Q9QXC1	Fetuin	Q61207	Sulfated glycoprotein
Q62356	Follistatin-like protein	Q62183	Tcp-10
Q61699	Heat shock- related protein	Q32NZ6	Tmc5 protein
Q61696	HSP70A1		

A.



B.



C.

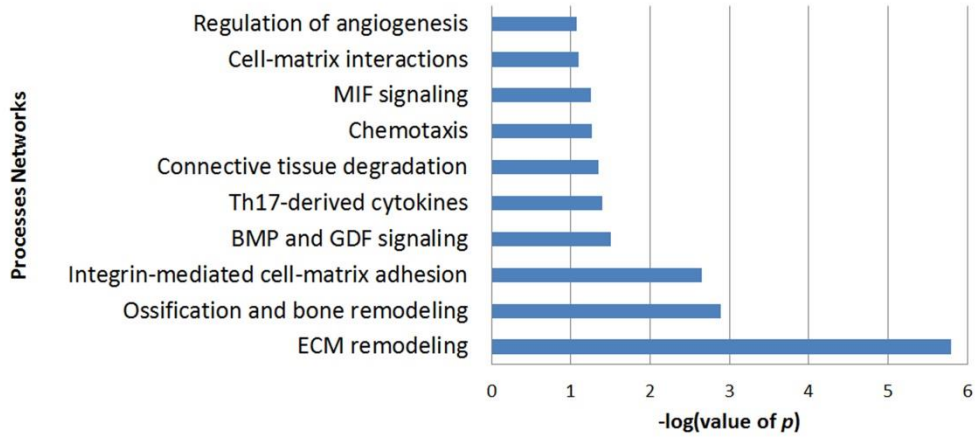


Figura 1: Análise de enriquecimento e de interação do secretoma de mASC. O secretoma obtido a partir de mASC submetida à hipóxia e estresse por estiramento foi avaliado pelo software *GeneGo Metacore*. (A) Análise de enriquecimento do secretoma apresentou processos relacionados ao estresse oxidativo e hipóxia, adesão celular, remodelamento de matriz e *folding* de proteínas. (B) A análise de interação dos fatores que são normalmente secretados revelou a interação de três proteínas. Nesta, a Osteopontina é clivada e ativada por MMP-3, que também cliva e inativa a SPARC. (C) Análise de enriquecimento para os três fatores, com destaque para

crescimento celular e proliferação, adesão e migração celular, resposta imune e angiogênese.

Com o objetivo de verificar se há uma relação entre as três proteínas supracitadas e os fatores encontrados no coração infartado, foram analisados trabalhos da literatura que tinham como objetivo avaliar a expressão gênica e/ou proteica de tecido cardíaco isquêmico/infartado (65-70). Observou-se a presença de 308 fatores expressos diferencialmente dos quais, 231 são super-expressos, 80 são sub-expressos e 3 são não-concordantes. Realizada a análise de enriquecimento pelo software *GeneGo Metacore*, para os fatores sub-expressos, foram observados processos referentes principalmente à metabolismo e desenvolvimento (Figura 2A), sendo que 34 fatores apresentaram-se mais representativos. Ao repetir a mesma análise para os fatores super-expressos, processos referentes à resposta imune, apoptose e remodelamento (Figura 2B) foram encontrados, sendo que 45 destes fatores foram mais representativos. Cruzando-se os fatores mais representativos, sub e super-expressos, com os três fatores encontrados no secretoma (Figura 1B), novas interações foram obtidas ao se relacionar as três proteínas com VEGF e Caspase-8 (Figura 2C). Os mecanismos e efeitos de cada interação estão detalhados na Tabela 3.

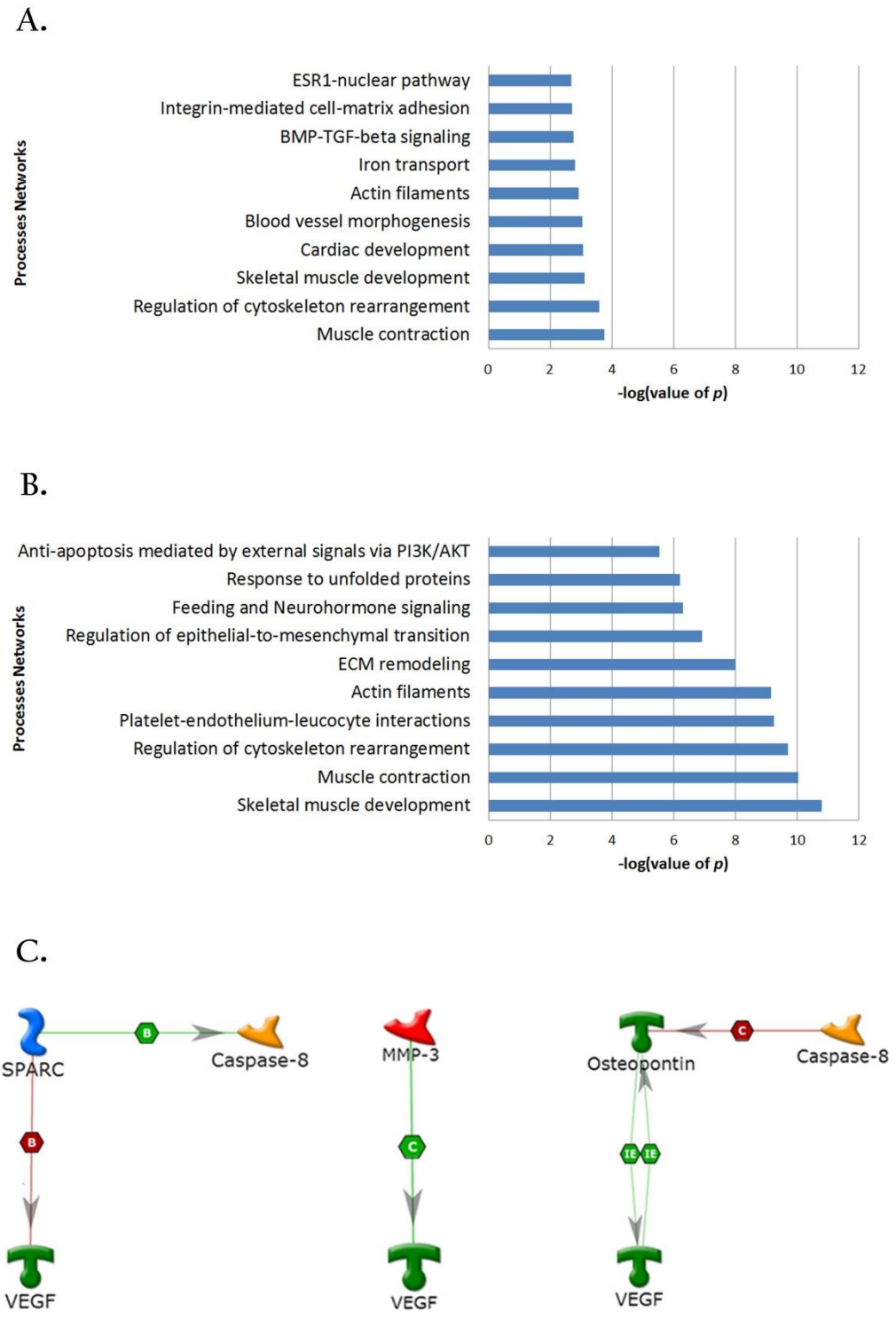


Figura 2: Análise de enriquecimento dos fatores sub- e super-expressos no infarto do miocárdio. Através da análise de trabalhos da literatura que tinham como objetivo avaliar a expressão gênica e/ou proteica de tecido cardíaco isquêmico/infartado, obteve-se uma lista de 308 fatores expressos diferencialmente dos quais, 231 são super-expressos e 80 são sub-expressos. (A) Na análise de enriquecimento para os fatores sub-expressos, observou-se processos referentes principalmente à metabolismo e desenvolvimento. (B) Já para a análise dos fatores

super-expressos observou-se processos referentes à resposta imune, apoptose e remodelamento. (C) Cruzando-se os fatores mais representativos, sub e super-expressos, com os três fatores encontrados no secretoma, novas interações foram obtidas relacionando as três proteínas com VEGF e Caspase-8 (Tabela 3).

Tabela 3: Mecanismo e efeito de cada interação representada na Figura 2C.

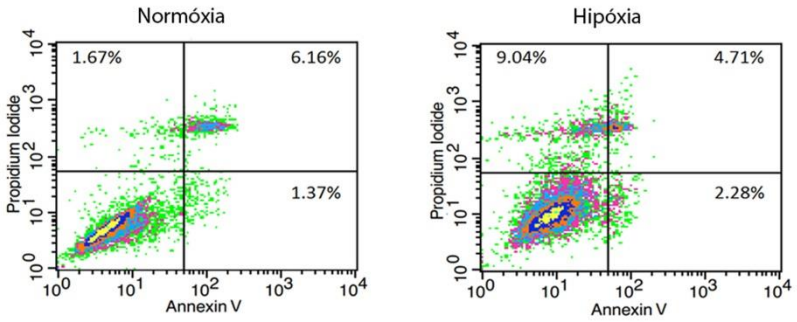
Upstream	Downstream	Mecanismo	Efeito
MMP-3	VEGF	Clivagem	Ativação
SPARC	Caspase-8	Ligação	Ativação
SPARC	VEGF	Ligação	Inibição
Osteopontina	VEGF	Influência na Expressão	Ativação
VEGF	Osteopontina	Influência na Expressão	Ativação
Caspase-8	Osteopontina	Clivagem	Inibição

4.2. Modelo de indução de morte celular: Hipóxia por baixa tensão de O_2

4.2.1. Hipóxia em fibroblastos cardíacos

Com o objetivo de simular uma condição de isquemia, o modelo de hipóxia por baixa tensão de oxigênio foi testado primeiramente em fibroblastos cardíacos. As células submetidas a esta condição incubadas por 24 horas, não apresentaram taxas de mortalidade significativas quando medidas pelo ensaio de Anexina V/Iodeto de Propídio (PI), em comparação com as células controle, em normóxia (AV + / PI - 2,330 ± 1,386 vs. 1,545 ± 0,376; AV + / PI + 10,045 ± 6,314 vs. 7,612 ± 1,841; AV- / PI + 10,283 ± 5,519 vs. 3,940 ± 1,599, para hipóxia e normóxia, respectivamente) (Figura 3A). Além disso, a ativação de caspase-3, avaliada por meio da expressão proteica relativa entre a porção clivada (ativa) e a proteína total, não apresentou diferença estatística em fibroblastos submetidos à hipóxia quando comparados com os controles em normóxia (Figura 3B).

A.



B.

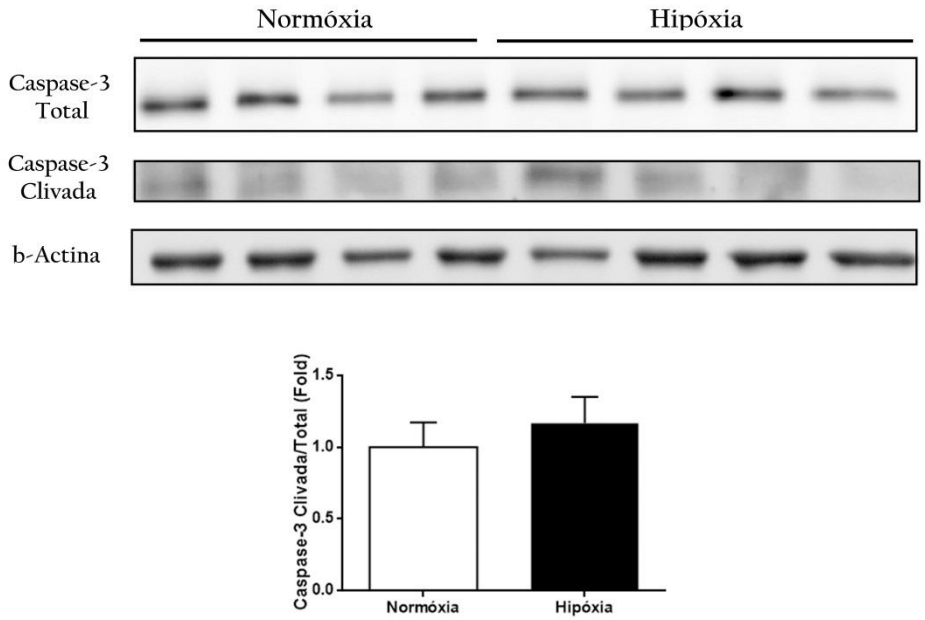


Figura 3: Indução de morte celular em fibroblastos cardíacos submetidos à hipóxia. As células foram cultivadas em hipóxia (1% O_2) ou normóxia (21% O_2) por 24 horas. (A) Avaliou-se a indução de morte celular por Anexina V/PI, mas as células em hipóxia não apresentaram taxas de mortalidade significativas ($p>0.05$ vs. Normóxia, n=4). (B) A avaliação da clivagem da caspase-3 também não apresentou alteração significativa ($p=0.5337$ vs. Normóxia, n=4).

A capacidade de induzir estresse oxidativo através da hipóxia por baixa tensão de oxigênio foi foi avaliada pela análise da oxidação do dihidroetídio (DHE). Os resultados do ensaio não indicaram mudanças significativas no consumo de DHE entre as células submetidas à hipóxia *versus* seus controles em normóxia (Figura 4A). Além disso, não houve nenhuma alteração na formação total de superóxidos (Figura 4B) ou de oxidantes totais (Figura 4C) entre os grupos de células.

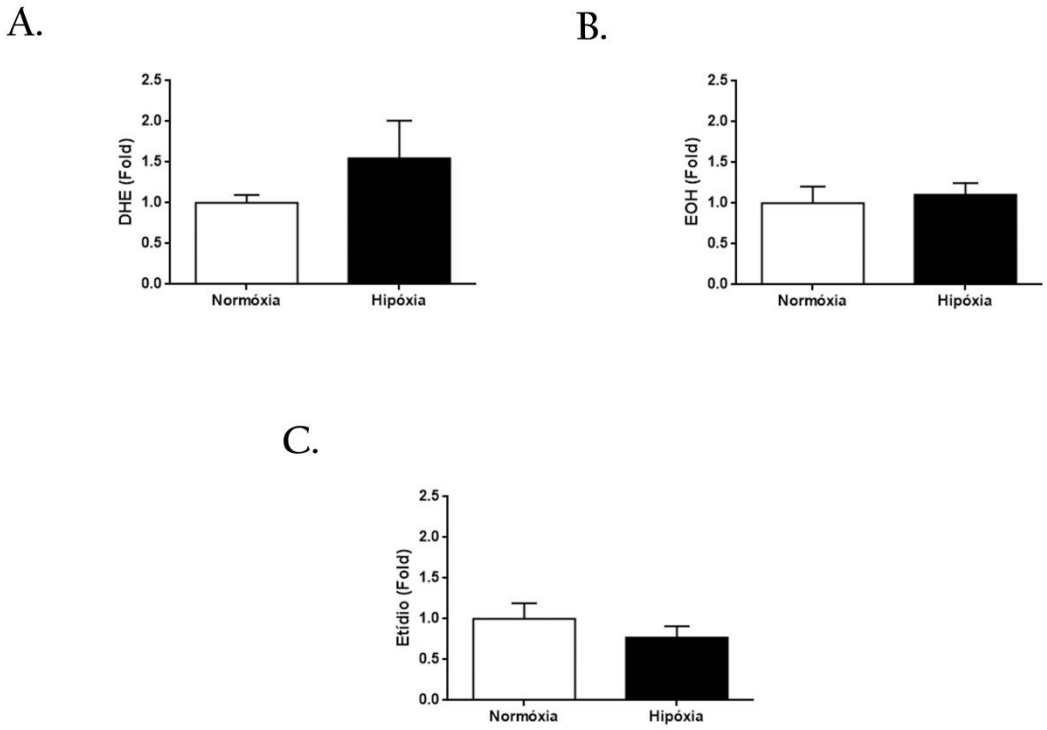


Figura 4: Indução de estresse oxidativo em fibroblastos cardíacos submetidos à hipóxia. As células foram cultivadas em hipóxia (1% O_2) ou normóxia (21% O_2) por 24 horas. (A) Não houve aumento no consumo de dihidroetídio (DHE) pelas células em hipóxia ($p>0.05$ vs. Normóxia, n=4). (B) De maneira semelhante, a quantificação da formação do ânion superóxido, através da análise de 2-hidroxietídio (EOH), também não apresentou diferença nas células mantidas em hipóxia ($p>0.05$ vs. Normóxia, n=4). (C) Já a análise de oxidantes totais, pela quantificação de etídio, não apresentou alteração significativa ($p>0.05$ vs. Normóxia, n=4).

4.2.2. Hipóxia em cardiomiócitos

Cardiomiócitos foram extraídos de corações de ratos neonatos com 24 a 48 horas de vida. Após 72 horas de plaqueamento, os cardiomiócitos foram submetidos à hipóxia por 24 horas e a viabilidade celular avaliada pelo ensaio de MTT (Figura 5). No primeiro experimento (n=2) foi observada uma diminuição na viabilidade celular de aproximadamente 70%, quando comparado ao controle (normóxia). Entretanto, nos experimentos seguintes, a estufa apresentou problemas técnicos e a realização de experimentos utilizando o modelo de hipóxia induzida pela a alteração nas concentrações de gases foi suspensa. Em seu lugar, utilizamos o modelo de indução de morte celular por peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

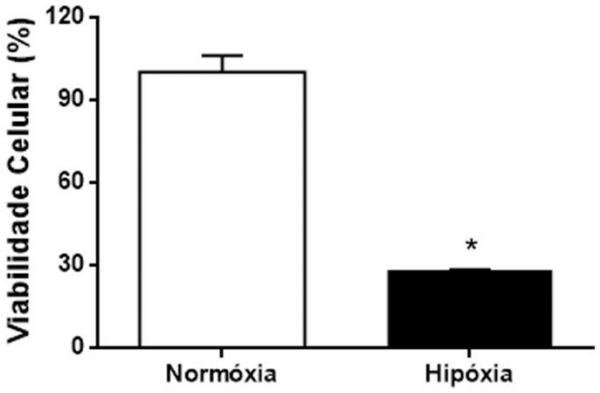


Figura 5: Indução de morte celular em cardiomiócitos submetidos à hipóxia. Os cardiomiócitos de ratos neonatos foram cultivados sob hipóxia (1% O_2) ou normóxia (21% O_2) por 24 horas. A viabilidade celular foi analisada através do ensaio de MTT e apresentou redução significativa nas células cultivadas em hipóxia (*p<0.004 vs. Normóxia, n=2).

4.3. Modelo de indução de morte celular por peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

4.3.1. Padronização do modelo de morte em cardiomiócitos

O tratamento de cardiomiócitos de ratos neonatos com diferentes concentrações de H_2O_2 foi realizado nos tempos de 3, 6 e 12 horas e promoveu diminuição da viabilidade celular tanto concentração como tempo-dependentes (Figura 6A). Esses resultados demonstraram que os cardiomiócitos foram sensíveis ao tratamento com H_2O_2. Com base nos dados apresentados na figura 6A, as concentrações de 100µM e 200µM e o tempo de 6 horas foram utilizados nos experimentos que seguem para este tipo celular.

A análise da clivagem de caspase-3 mostrou uma tendência de aumento de aproximadamente 50% nas células tratadas com 100µM de H_2O_2, quando comparado ao grupo controle (0µM) (Figura 6B). Entretanto, com a concentração de 200µM houve um aumento significativo de 150%, demonstrando que o tratamento com peróxido de hidrogênio foi capaz de ativar a via de morte celular por caspase-3.

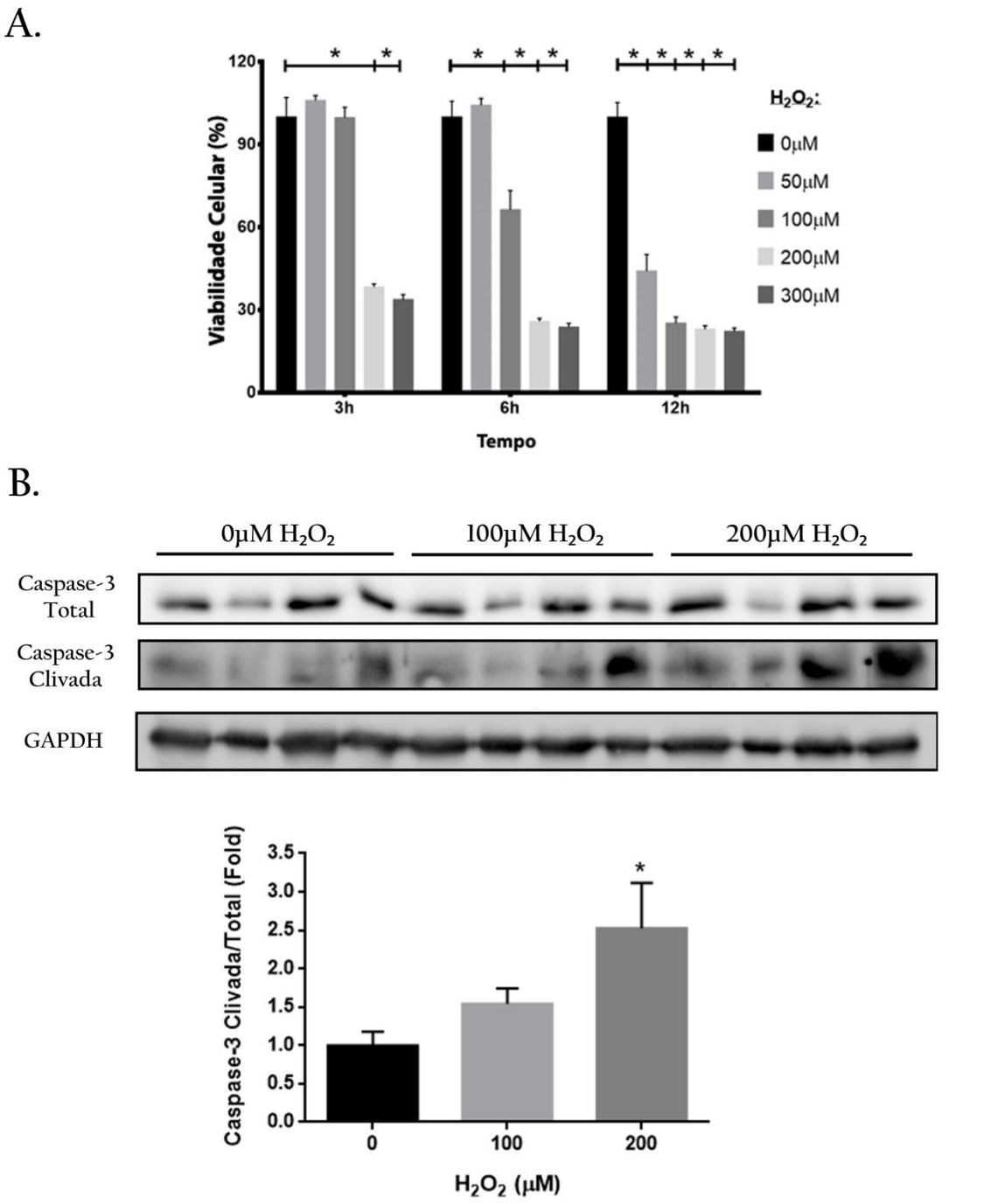
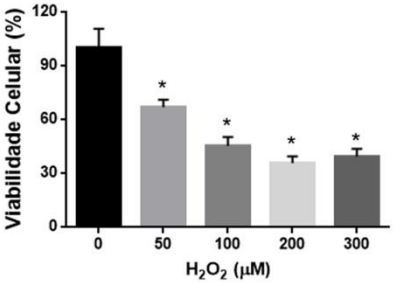


Figura 6: Redução da viabilidade celular em cardiomiócitos tratados com H_2O_2. (A) Os cardiomiócitos de ratos neonatos foram cultivados com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio por 3, 6 e 12 horas (*p<0.05 vs. 0µM, n=4). (B) Em seguida, utilizando-se as concentrações de 100 e 200µM de H_2O_2 por 6 horas, avaliou-se a clivagem da caspase-3. O tratamento com 200µM induz um aumento significativo na clivagem desta caspase (*p=0.0337 vs. 0µM, n=6).

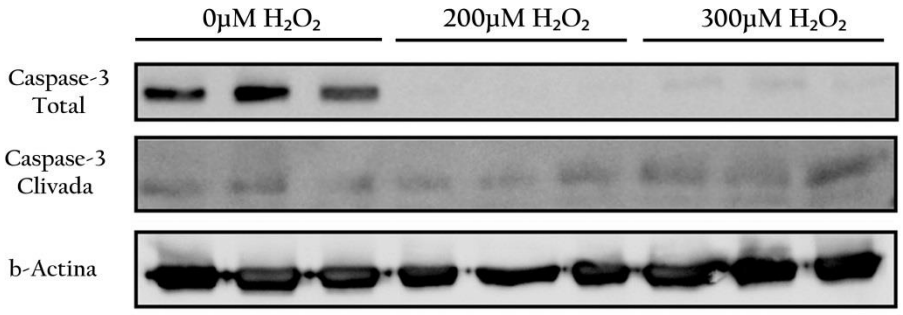
4.3.2. Padronização do modelo de morte em fibroblastos cardíacos

Embora os fibroblastos cardíacos não tenham apresentado redução da viabilidade celular quando submetidos a baixas tensões de oxigênio, essas células demonstraram ser sensíveis ao tratamento com H_2O_2. Os fibroblastos foram submetidos a tratamento por 6 horas com diferentes concentrações de H_2O_2 e apresentaram baixa viabilidade com concentrações acima de 50µM (aproximadamente 30% - Figura 7A). Com base nestes dados, as concentrações de 200 e 300µM foram usadas para os experimentos seguintes. Foi realizada a avaliação da clivagem da Caspase-3 (Figura 7B) e observou-se um aumento significativo deste parâmetro tanto nas células tratadas com 200 quanto com 300µM de H_2O_2.

A.



B.



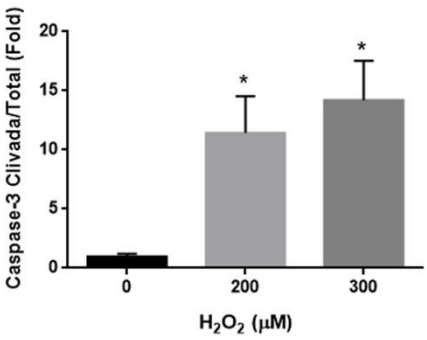


Figura 7: Indução de morte celular em fibroblastos cardíacos submetidos ao tratamento com H_2O_2. (A) Os fibroblastos cardíacos foram cultivados com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio por 6 horas (*p<0.05 vs. 0µM, n=5). (B) Em seguida, utilizando-se as concentrações de 200 e 300µM de H_2O_2, avaliou-se a clivagem da caspase-3. Ambos os tratamentos aumentam a clivagem desta caspase (*p<0.05 vs. 0µM, n=5).

4.3.3. Padronização do modelo de morte em células endoteliais

Ao contrário do que foi observado com os cardiomiócitos, as células HUVEC se mostraram mais resistentes contra a indução da morte por tratamento com H_2O_2. Após 6 horas de tratamento, apenas concentrações acima de 700µM reduziram a viabilidade destas células (Figura 8A). A partir de 1000µM de H_2O_2, a porcentagem de células mortas pelo tratamento atingiu seu valor máximo. Com base nestes dados, as concentrações de 800 e 1000µM foram usadas para os experimentos seguintes. Pela avaliação da caspase-3, não foi possível detectar o fragmento clivado (Figura 8B). Por isso, HUVECs tratadas com H_2O_2 foram submetidas ao ensaio de TUNEL (Figura 8C), apresentando uma marcação para apoptose compatível com os resultados de viabilidade celular anteriormente apresentados para 800 e 1000µM de H_2O_2.

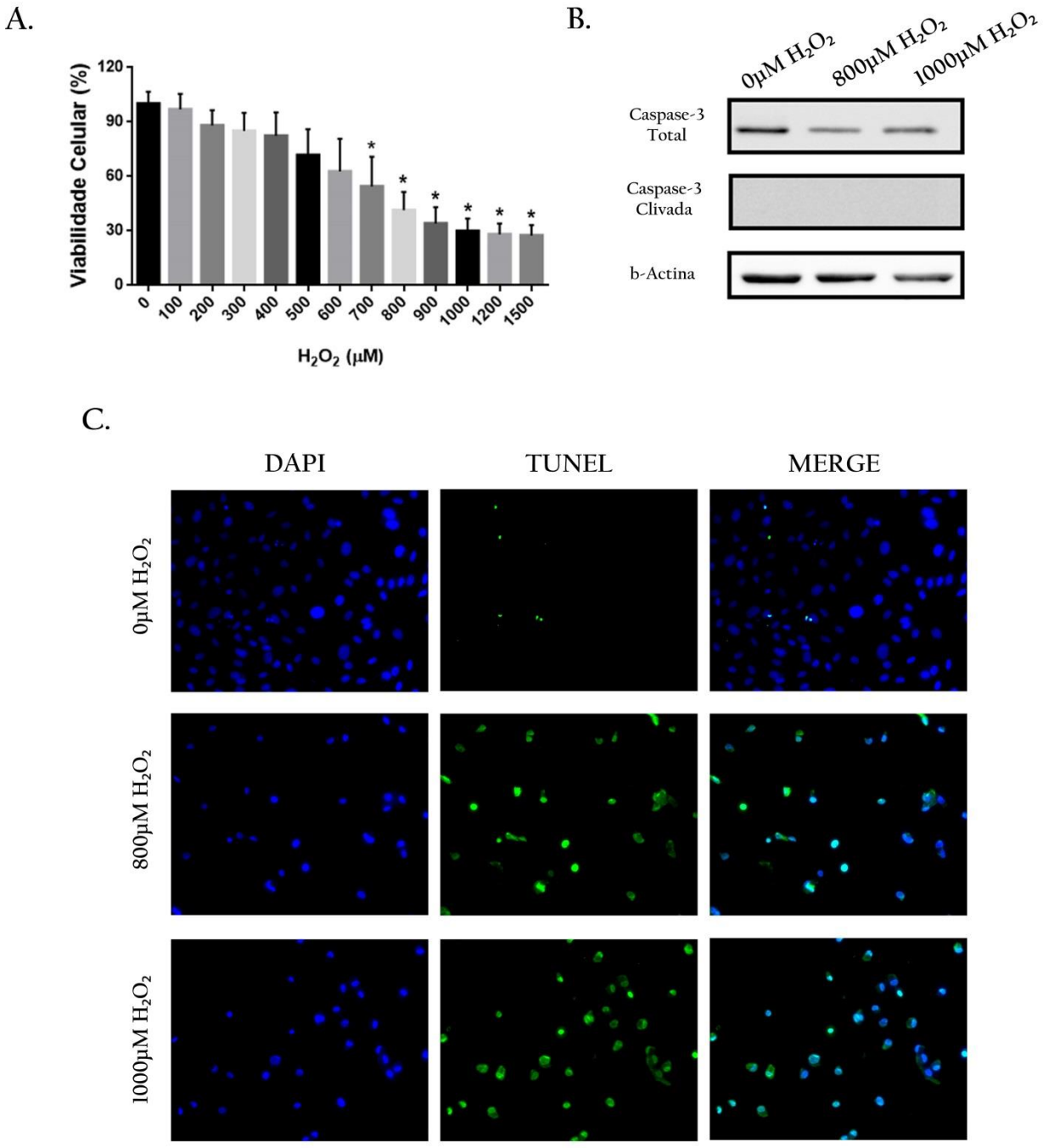


Figura 8: Indução de morte celular em HUVECs tratadas com H_2O_2. (A) As células endoteliais derivadas de veia umbilical humana foram cultivadas com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio por 6 horas (*p<0.05 vs. 0µM, n=4). Estas células mostraram-se muito resistentes ao tratamento, sendo que houve redução na viabilidade apenas com concentrações acima de 700µM. (B) Em seguida, utilizando-se as concentrações de 800 e 1000µM de H_2O_2, avaliou-se a clivagem da caspase-3. (C) Como não foi possível detectar a porção clivada da caspase-3, um ensaio de TUNEL foi realizado, apresentando uma marcação para apoptose (verde) compatível com os resultados de viabilidade celular.

4.4. Análise da expressão de SPARC, MMP-3 e Osteopontina nas células tratadas com H_2O_2

4.4.1. Expressão basal

A avaliação da expressão gênica basal dos três fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, nos três principais tipos celulares que compõem o coração, cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e células endoteliais (Figura 9), demonstrou que a SPARC apresenta alta expressão em cardiomiócitos ($2^{-\Delta CT}$ = 2,67) e fibroblastos ($2^{-\Delta CT}$ = 6,2), e expressão mediana em células endoteliais ($2^{-\Delta CT}$ = 0,06). Osteopontina apresenta expressão muito baixa em HUVECs ($2^{-\Delta CT}$ = $2{,}77 \times 10^{-6}$), mas expressão média em cardiomiócitos ($2^{-\Delta CT}$ = 0,19) e fibroblastos cardíacos ($2^{-\Delta CT}$ = 0,088). A MMP-3, por sua vez, apresenta baixa expressão nos três tipos celulares ($2^{-\Delta CT} < 3{,}4 \times 10^{-6}$).

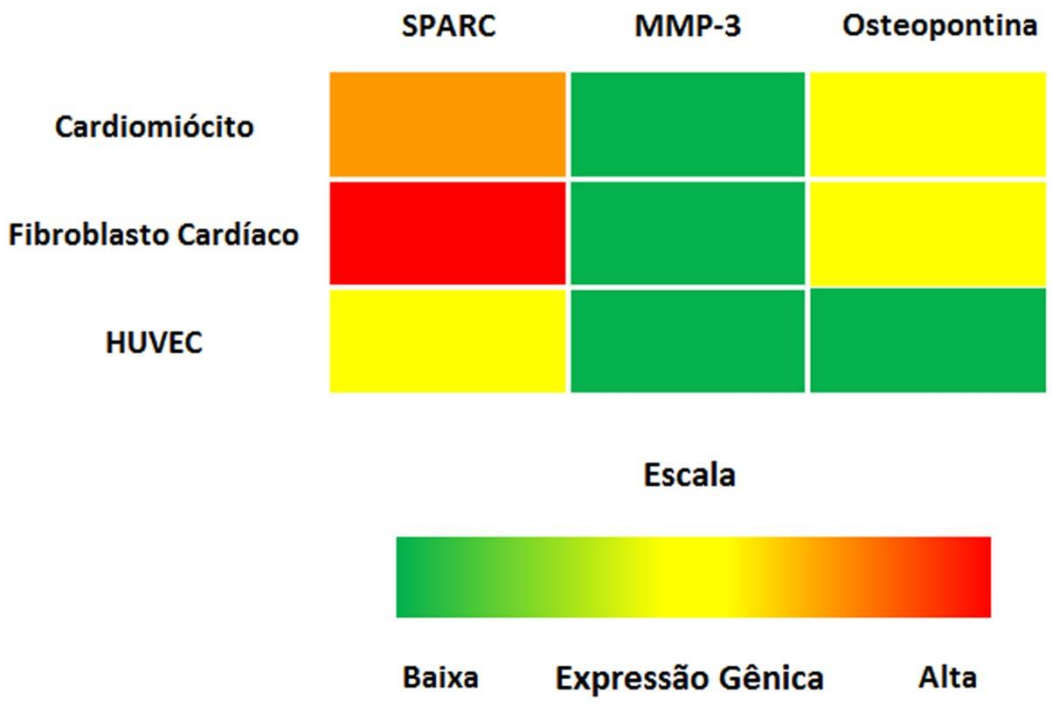


Figura 9: *Heatmap* da expressão gênica basal de SPARC, MMP-3 e Osteopontina nos três principais tipos celulares que constituem o coração, cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e células endoteliais. Esses dados foram obtidos através do cálculo de $2^{-\Delta CT}$. A expressão de SPARC é alta em cardiomiócitos ($2^{-\Delta CT}$ = 2,67) e fibroblastos ($2^{-\Delta CT}$ = 6,2), e mediana em células endoteliais ($2^{-\Delta CT}$ = 0,06). Osteopontina

apresenta expressão muito baixa em HUVECs ($2^{-\Delta CT}$ = 2,77x10^{-6}), mas expressão média em cardiomiócitos ($2^{-\Delta CT}$ = 0,19) e fibroblastos cardíacos ($2^{-\Delta CT}$ = 0,088). A MMP-3 apresenta baixa expressão nos três tipos celulares ($2^{-\Delta CT}$ < 3,4x10^{-6}).

4.4.2. Cardiomiócitos

A expressão proteica dos fatores SPARC, Osteopontina e MMP-3 foi avaliado em cada tipo de célula, com e sem tratamento de H_2O_2. O perfil da expressão proteica endógena em cardiomiócitos está demonstrado na Figura 10A. A expressão endógena de Osteopontina total em cardiomiócitos submetidos ao tratamento com H_2O_2 não apresentou diferenças estatísticas, independentemente da dose de H_2O_2 testada (Figura 10B). No entanto, a forma clivada da Osteopontina (sua forma ativa) diminuiu com o tratamento (Figura 10C). Apesar de não haver diferença estatística na comparação entre a concentração de 100µM com o controle, o tratamento com 200µM induziu a uma diminuição significativa (cerca de 90%) da expressão de Osteopontina clivada quando comparado com as células controle. A proteína SPARC apresentou decréscimo significativo em todas as condições (cerca de 50% e 90% para 100 e 200µM, respectivamente - Figura 10D). Nenhuma mudança foi observada nas taxas de MMP-3, independentemente dos tratamentos com H_2O_2 (Figura 10E).

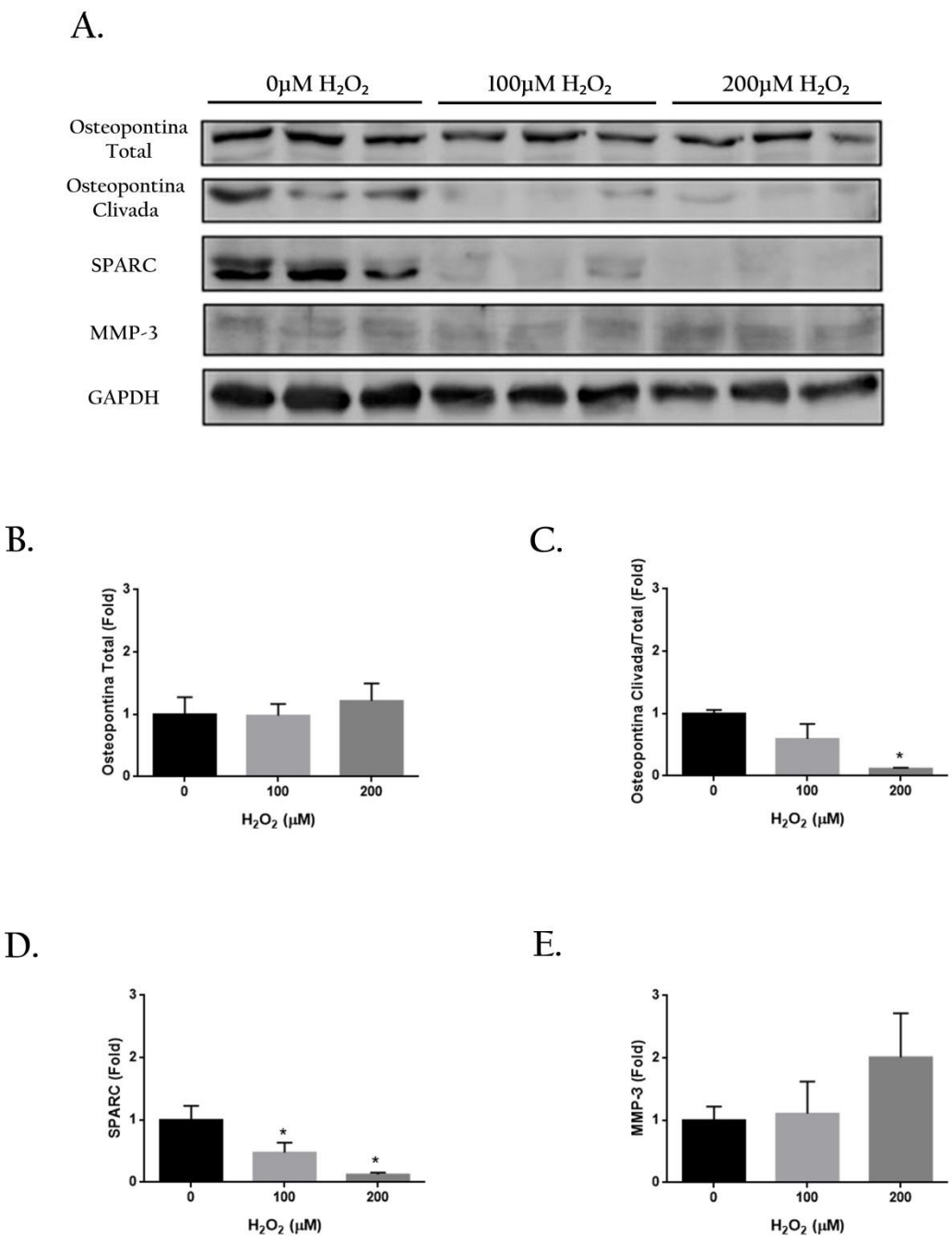


Figura 10: Efeito do peróxido de hidrogênio na expressão proteica dos fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, em cardiomiócitos. Cardiomiócitos de ratos neonatos foram tratados com H_2O_2 por 6 horas e após esse período avaliou-se a expressão proteica desses fatores. (A) *Western blot* representando a expressão dos três fatores. (B) A expressão de Osteopontina total não apresentou diferença significativa quando tratada com peróxido de hidrogênio (p=0.7693 vs. 0µM, n=6). Entretanto, o segmento clivado de Osteopontina (C), que representa sua forma ativa, apresentou redução significativa com o tratamento de 200µM de H_2O_2 (*p=0.0021 vs. 0µM, n=6). (D) A proteína SPARC apresentou uma redução significativa em todas as condições (*p<0.05 vs. 0µM, n=6). (E) A expressão de MMP-3 não apresentou mudança significativa com os tratamentos (p=0.3451 vs. 0µM, n=6).

Considerando a redução na expressão das proteínas SPARC e Osteopontina em células tratadas com peróxido de hidrogénio, realizou-se a análise para verificar se estas proteínas poderiam ter sido secretadas. Para isso, o meio de cultura das células foi recolhido e concentrado depois de seis horas de tratamento com H_2O_2, para avaliação por *Western blot* (Figura 11). Os dados demonstram ausência completa de SPARC no meio de cultura em todas as condições. No entanto, observou-se uma pequena quantidade de Osteopontina clivada em células tratadas com 200µM de H_2O_2.

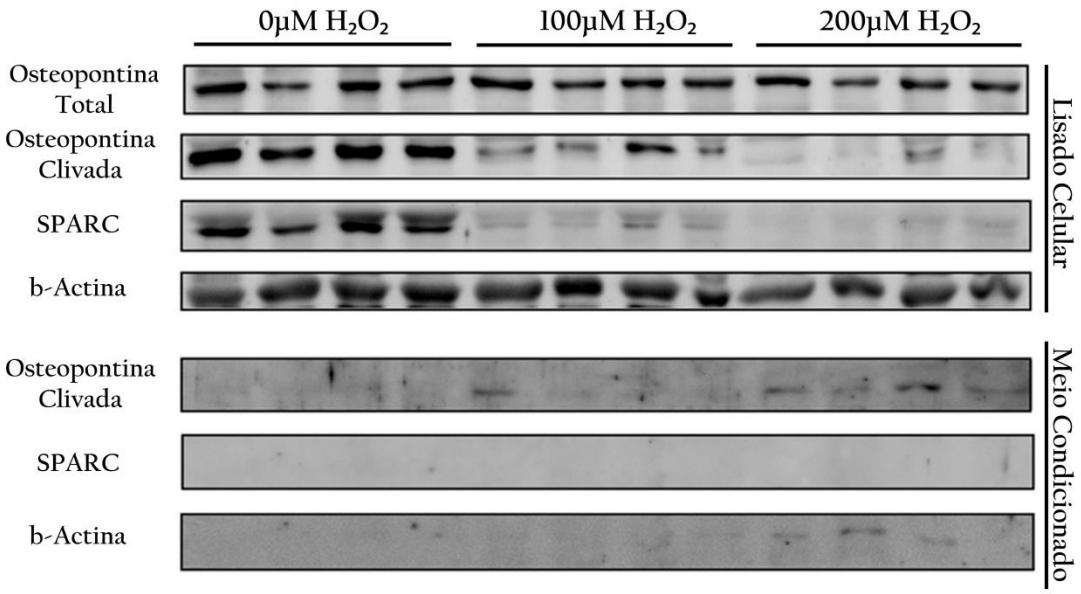


Figura 11: Expressão proteica dos fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, no lisado celular e no meio condicionado de cardiomiócitos. Devido à redução na expressão dos fatores SPARC e Osteopontina clivada no lisado de células tratadas com peróxido de hidrogénio, realizou-se a análise para verificar se estas proteínas foram secretadas. Os dados demonstram ausência completa de SPARC no meio de cultura em todas as condições. No entanto, observou-se uma pequena quantidade de Osteopontina clivada em células tratadas com 200µM de H_2O_2 , apesar de beta-actina ser detectável também (n=4).

Ao avaliar a expressão gênica desses fatores em cardiomiócitos tratados e não tratados com peróxido de hidrogênio, a expressão de Osteopontina não apresentou um aumento significativo em nenhuma das concentrações testadas (Figura 12A). Também não foi observada alteração na expressão de SPARC, mesmo em células tratadas com a maior concentração de H_2O_2 (Figura 12B). No entanto, uma diferença significativa foi observada na expressão de MMP-3, sendo que na presença de 100µM de H_2O_2 esta foi estatisticamente aumentada em cerca de 17 vezes e cerca de 10 vezes com 200µM, sendo nesta última condição de forma não significativa, em comparação com o controle (Figura 12C).

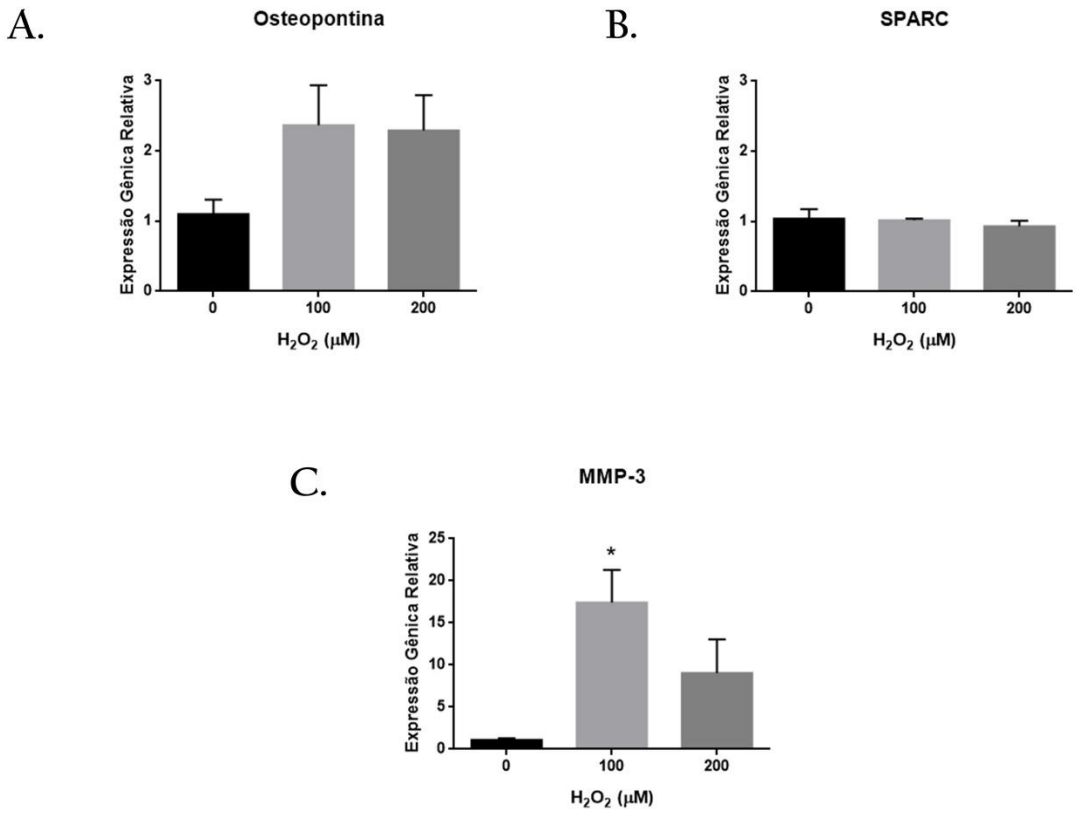


Figura 12: Efeito do peróxido de hidrogênio na expressão gênica dos fatores em cardiomiócitos. Cardiomiócitos de ratos neonatos foram tratados com H_2O_2 por 6 horas e após esse período avaliou-se a expressão gênica por RT-PCR. (A) A expressão de Osteopontina não apresentou um aumento significativo em nenhuma das concentrações de H_2O_2 testadas (p=0.1069 vs. 0µM, n=5). (B) A expressão de

SPARC também não apresentou diferença significativa quando tratada com peróxido de hidrogênio (p=0.7848 vs. 0µM, n=5). (C) Entretanto, a expressão de MMP-3, apresentou aumento significativa com 100µM (p=0.0095 vs. 0µM, n=5).

Diante dos resultados de morte celular e expressão gênica e proteica dos fatores, os experimentos subsequentes com cardiomiócitos foram realizados com 200µM de H_2O_2.

4.4.3. Fibroblastos cardíacos

Após a padronização da morte celular de fibroblastos cardíacos tratados com H_2O_2, a expressão proteica endógena dos três fatores foi avaliada (Figura 13A). A expressão de Osteopontina total não apresentou diferença significativa, independentemente da dose de H_2O_2 (Figura 13B). Já a sua forma clivada não teve uma redução significativa (Figura 13C). A proteína SPARC apresentou uma redução significativa em todas as condições (aproximadamente 80% para ambos os tratamentos - Figura 13D). Já a expressão de MMP-3 não apresentou mudança significativa com os tratamentos (Figura 13E).

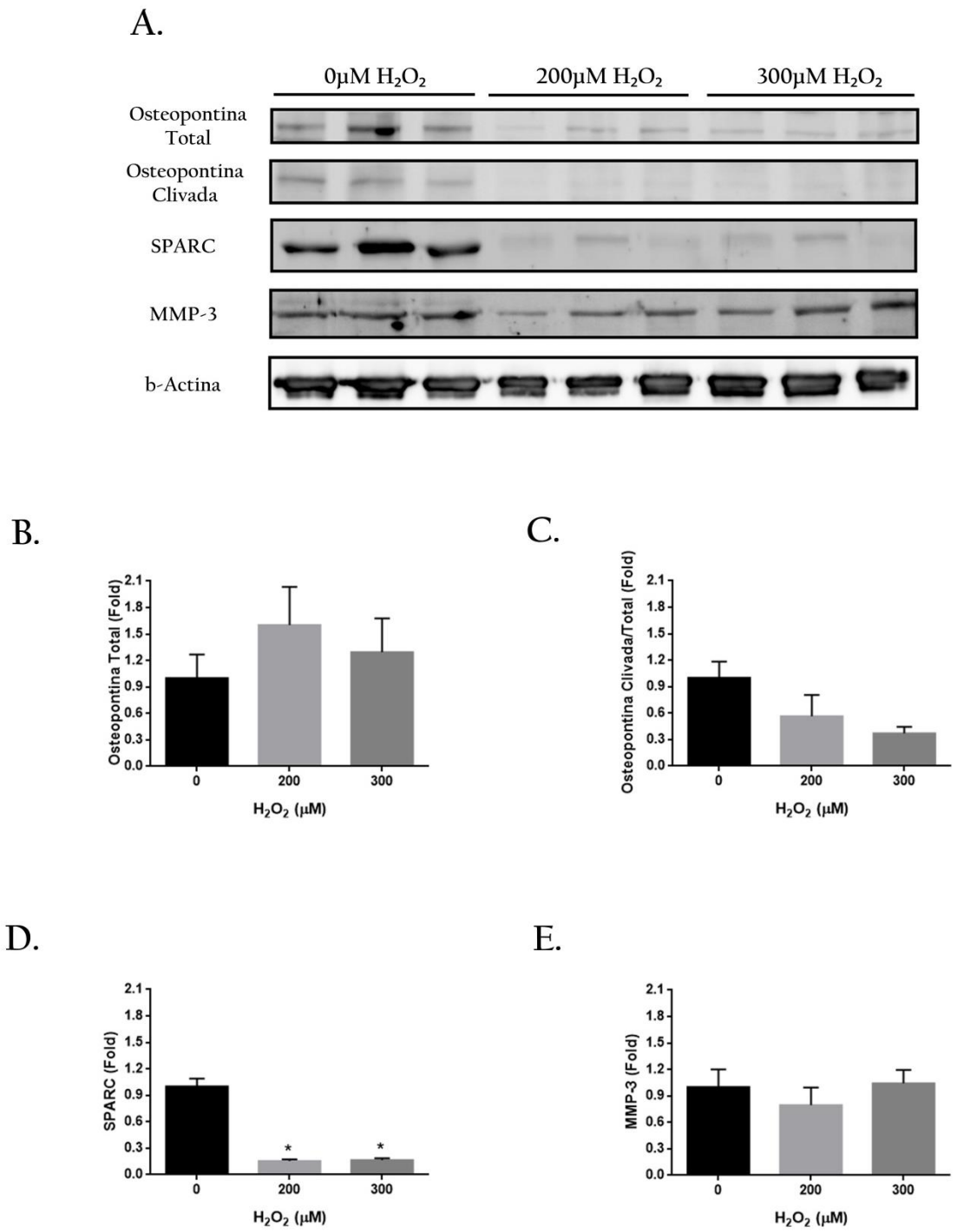


Figura 13: Efeito do H_2O_2 na expressão proteica dos fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, em fibroblastos cardíacos. Fibroblastos cardíacos foram tratados com H_2O_2 por 6 horas e após esse período foi avaliada a expressão proteica dos fatores. (A) *Western blot* representando a expressão dos três fatores. As expressões endógenas de Osteopontina total (B) e a relação clivada/total (C) não apresentaram diferença significativa quando tratadas com peróxido de hidrogênio ($p>0.05$ vs. 0µM, n=5). (D) A proteína SPARC apresentou uma redução significativa em todas as condições (*$p<0.05$ vs. 0µM, n=6). (E) A expressão de MMP-3 não apresentou mudança significativa com os tratamentos ($p>0.6242$ vs. 0µM, n=3).

Além disso, também foram avaliadas as proteínas encontradas no meio condicionado e, semelhante aos resultados encontrados nos cardiomiócitos, há um aumento na quantidade de SPARC e Osteopontina clivada no meio das células tratadas com H_2O_2 (Figura 14). Entretanto, o aumento demonstrado também para a expressão da proteína beta-actina no meio, indica que as duas proteínas supracitadas sejam resultantes da lise celular, e não de secreção celular ativa (Figura 14). Já a proteína MMP-3 não foi detectada no meio de cultura.

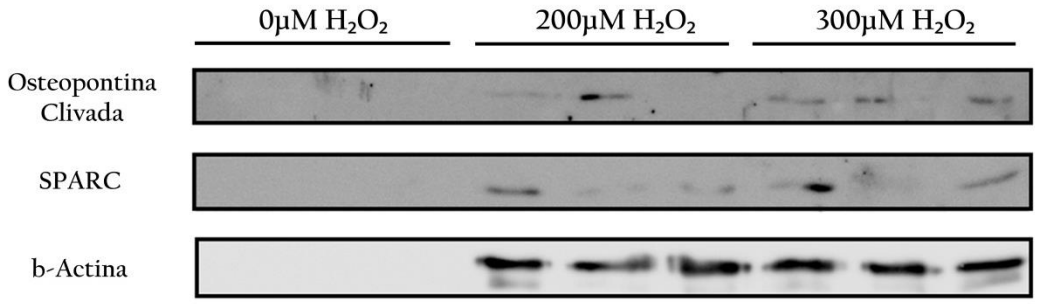


Figura 14: Expressão proteica dos fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, no meio condicionado de fibroblastos cardíacos. Após o tratamento com H_2O_2, o meio de cultura foi coletado, concentrado e analisado por *Western blot*. Observou-se uma pequena quantidade de Osteopontina clivada e SPARC em células tratadas com H_2O_2 , mas há um aumento também da beta-actina no meio (n=3). A MMP-3 não foi detectada.

Avaliamos também a expressão gênica dos fatores. A expressão de Osteopontina apresentou diferença estatística apenas com a concentração de 300µM (Figura 15A), correspondendo a uma redução de aproximadamente 50% na sua expressão gênica. Diferentemente dos cardiomiócitos, há uma redução significativa de SPARC nas células tratadas (Figura 15B), de aproximadamente 50%. A expressão de MMP-3 não foi detectada.

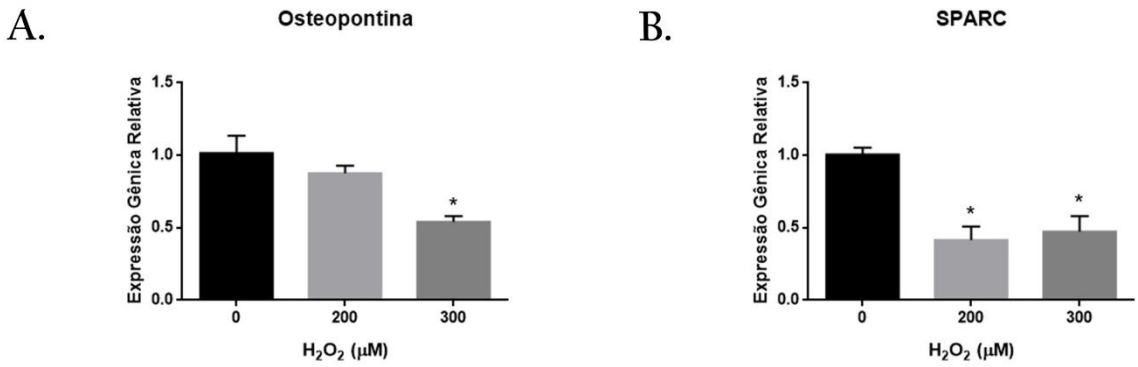


Figura 15: Efeito do peróxido de hidrogênio na expressão gênica dos fatores em fibroblastos cardíacos. As células foram tratados com H_2O_2 por 6 horas e após esse período avaliou-se a expressão gênica por RT-PCR. (A) A expressão de Osteopontina apresentou redução significativa com a concentração de 300μM de H_2O_2 ($p=0.0151$ vs. 0μM, n=3). (B) A expressão de SPARC também apresentou diferença significativa quando tratada com peróxido de hidrogênio ($p<0.05$ vs. 0μM, n=6). A expressão de MMP-3 não foi detectada.

4.4.3.1 Produção de colágeno

Foi ainda avaliada a capacidade do peróxido de hidrogênio em modificar o fenótipo celular de fibroblastos cardíacos e induzir estes a produzir colágeno. Para isso, as células foram tratadas com 200 ou 300μM de H_2O_2 por 6 horas e o colágeno solúvel no meio de cultivo foi quantificado (Figura 16). Pode-se observar que, após esse período, houve um aumento de aproximadamente 6 vezes na produção de colágeno em ambos os tratamentos.

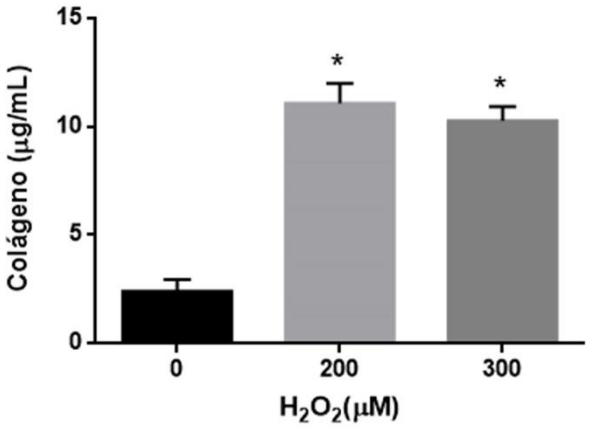


Figura 16: Indução da produção de colágeno em fibroblastos cardíacos por H_2O_2. Fibroblastos cardíacos foram tratados com H_2O_2 por 6 horas e após esse período foi avaliada a produção de colágeno pelo ensaio de Sircol. Pode-se observar que, após o tratamento, houve um aumento de significativo na produção de colágeno em ambas as concentrações (*p<0.0001 vs. 0µM, n=6).

Diante dos resultados de morte celular, expressão gênica e proteica dos fatores e produção de colágeno, os experimentos subsequentes com fibroblastos cardíacos foram realizados com 200µM de H_2O_2.

4.4.4. HUVECs

A expressão das proteínas-alvo em células endoteliais tratadas com H_2O_2 revelou um padrão diferente do encontrado em cardiomiócitos, sendo que nas HUVECs a expressão basal tanto de Osteopontina total quanto clivada é inferior a dos cardiomiócitos (Figura 17A). No entanto, não houve diferença na quantidade de Osteopontina total (Figura 17B) e na relação clivada/total (Figura 17C) nas células tratadas com H_2O_2, em relação ao controle. Por outro lado, essas células apresentaram um alto nível de expressão de SPARC, que não foi modificado pelo tratamento com H_2O_2 (Figura 17D). A expressão proteica de MMP-3 não foi detectada.

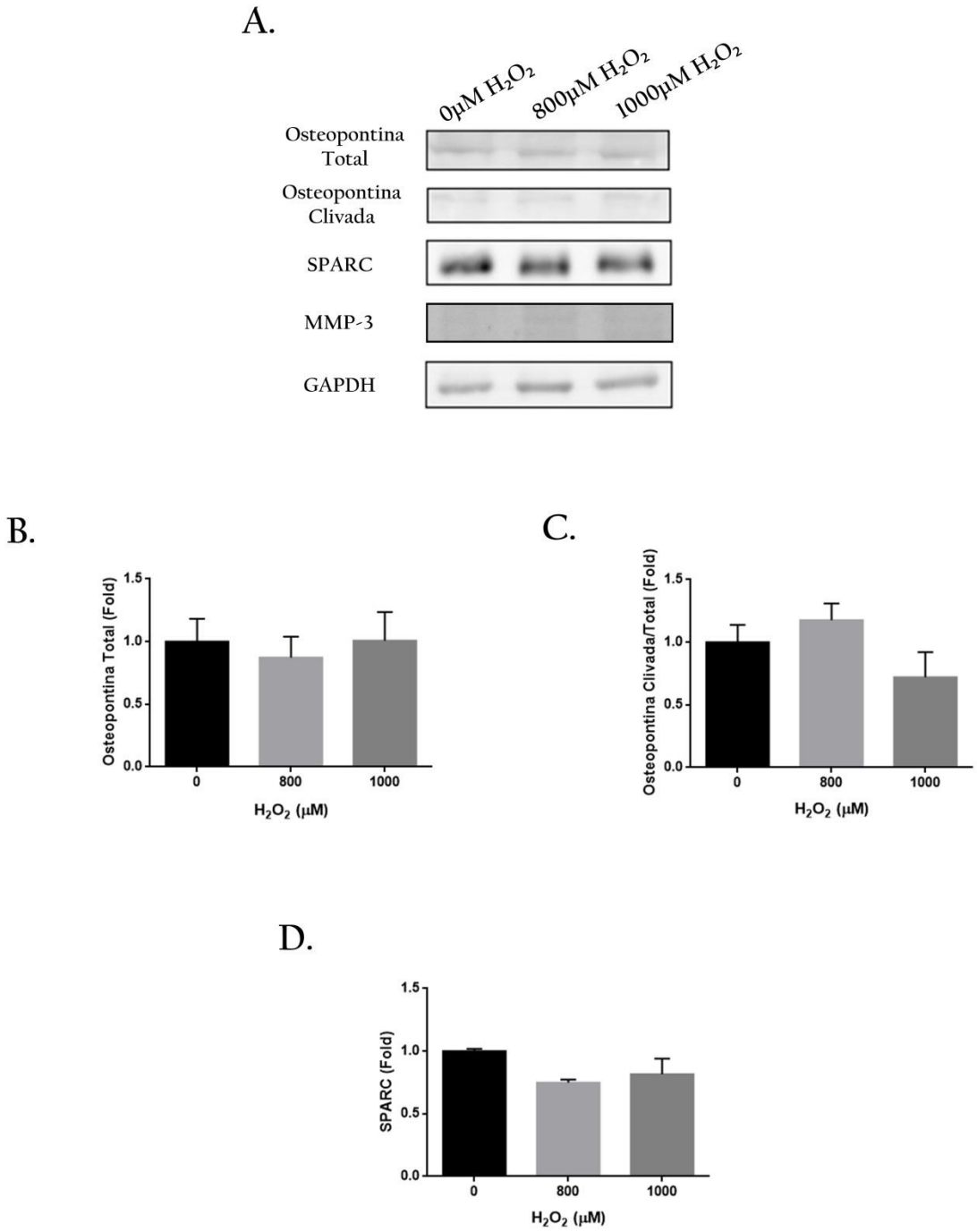


Figura 17: Efeito do peróxido de hidrogênio na expressão proteica dos fatores, SPARC, MMP-3 e Osteopontina, em HUVECs. As células endoteliais foram tratadas com H_2O_2 por 6 horas e após esse período avaliou-se a expressão proteica desses fatores. (A) *Western blot* representando a expressão dos três fatores. (B) A expressão de Osteopontina total não apresentou diferença significativa quando tratada com peróxido de hidrogênio ($p>0.05$ vs. 0μM, n=6). O segmento clivado de Osteopontina (C), que representa sua forma ativa, também não apresentou alteração significativa com os tratamentos ($p>0.05$ vs. 0μM, n=6). (D) A proteína SPARC, diferente dos cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos, não apresentou redução significativa em nas condições experimentadas ($p>0.05$ vs. 0μM, n=3). A MMP-3 não foi detectada.

Referente à expressão gênica de Osteopontina, o tratamento com peróxido de hidrogênio não induziu uma diferença estatística (Figura 18A). A expressão de SPARC também não apresentou diferença nos grupos tratados versus o controle (Figura 18B). A expressão gênica de MMP-3, assim como sua expressão proteica, não foi detectada.

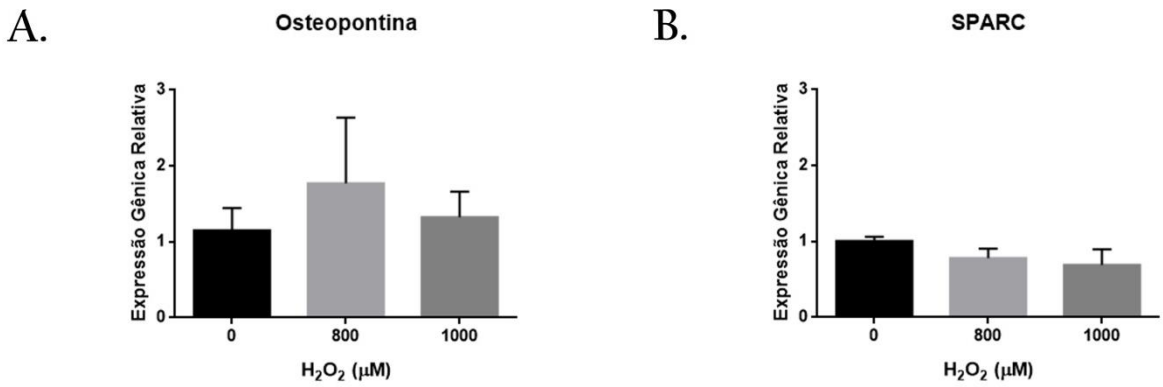


Figura 18: Efeito do peróxido de hidrogênio na expressão gênica dos fatores em HUVECs. As células endoteliais foram tratadas com H_2O_2 por 6 horas e após esse período avaliou-se a expressão gênica. (A) A expressão de Osteopontina não apresentou alteração significativa com o tratamento de H_2O_2 (p=0.5850 vs. 0μM, n=4). (B) A expressão de SPARC também não apresentou diferença significativa quando tratada com peróxido de hidrogênio (p=0.4084 vs. 0μM, n=5). A expressão de MMP-3 não foi detectada.

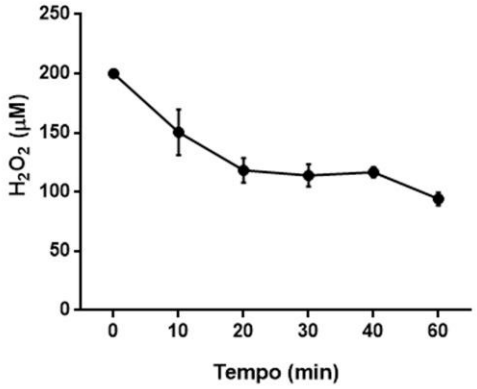
Diante dos resultados de morte celular e expressão gênica e proteica dos fatores, os experimentos subsequentes com HUVECs foram realizados com 800μM de H_2O_2.

4.5. Determinação do tempo de degradação e do tempo mínimo de tratamento com H_2O_2

Devido a uma possível alteração estrutural dos fatores induzida pelo H_2O_2, podendo resultar em perda de suas estruturas e funções, o tratamento concomitante das células com peróxido de hidrogênio e os fatores não foi

realizado. Para reverter isso, em um primeiro experimento, a degradação do H_2O_2 foi avaliada em fibroblastos tratados com 200 e 800µM de H_2O_2 (Figuras 19A e 19B, respectivamente) em intervalos de dez minutos, totalizando uma hora. Os dados mostram que ambos os tratamentos diminuem significativamente a quantidade de H_2O_2 nos dez minutos iniciais, ficando relativamente estáveis após esse período. Ainda assim, após uma hora de tratamento, há aproximadamente 100µM de H_2O_2 nas células tratadas com 200µM (Figura 19A) e aproximadamente 400µM nas células tratadas com 800µM (Figura 19B).

A.



B.

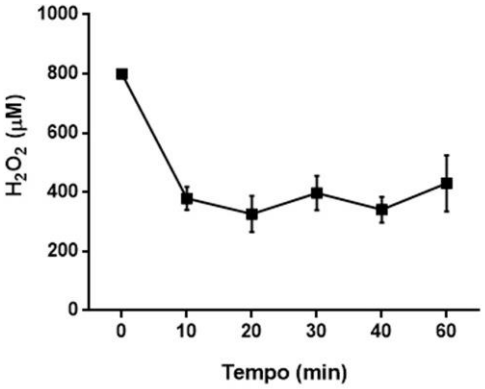
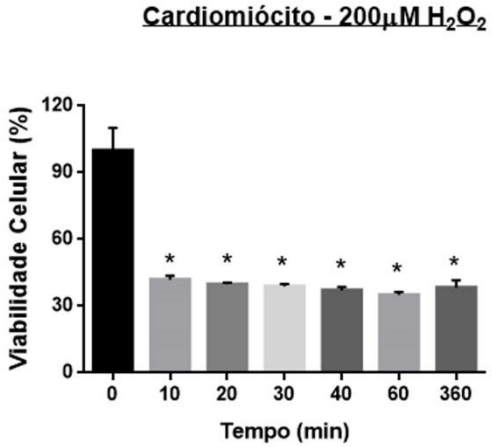


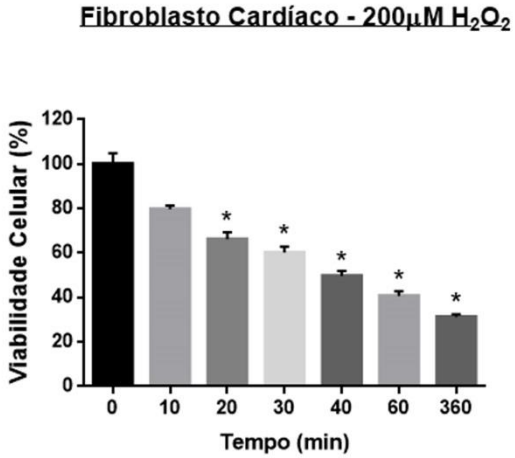
Figura 19: Avaliação do tempo de degradação do peróxido de hidrogênio. A degradação do H_2O_2 foi avaliada pelo ensaio de Amplex Red em fibroblastos cardíacos tratados com H_2O_2 em intervalos de dez minutos, totalizando uma hora. Os resultados mostram que ambos os tratamentos diminuem significativamente a quantidade de H_2O_2 nos dez minutos iniciais, ficando relativamente estáveis após esse período. Após uma hora de tratamento há aproximadamente 100µM de H_2O_2 nas células tratadas com 200µM (A, n=3) e aproximadamente 400µM nas células tratadas com 800µM (B, n=3).

O experimento seguinte consistiu em avaliar o efeito do peróxido de hidrogênio na viabilidade celular de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e HUVECs tratados por 10, 20, 30, 40 e 60 minutos. Na Figura 20A, observa-se que todos os tempos de tratamento testados exercem o mesmo efeito sobre os cardiomiócitos. Já nos fibroblastos cardíacos (Figura 20B) há uma diminuição na viabilidade celular com o passar do tempo sendo que, com 60 minutos de tratamento, a viabilidade celular é muito semelhante à encontrada nas células tratadas por 6 horas. As HUVECs apresentam um padrão semelhante de redução da viabilidade (Figura 20C).

A.



B.



C.

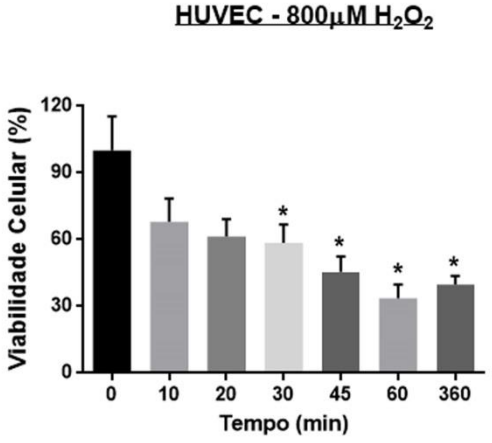


Figura 20: Determinação do tempo mínimo de tratamento com H_2O_2 em cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e células endoteliais. Foi avaliado o efeito do peróxido de hidrogênio na viabilidade celular de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e HUVECs tratados por 10, 20, 30, 40 e 60 minutos. Após cada período, o meio foi trocado por meio de cultura novo, livre de H_2O_2, e a vaibilidade dessas células

foi avaliada por MTT ao completar seis horas. (A) Em relação aos cardiomiócitos, observou-se que todos os tempos de tratamento testados exercem o mesmo efeito na viabilidade celular do que o tratamento por 6 horas contínuas (*p<0.0001 vs. 0 min, n=5). (B) Já nos fibroblastos cardíacos há uma diminuição na viabilidade celular com o passar do tempo sendo que, com 60 minutos de tratamento, a viabilidade celular é muito semelhante à encontrada nas células tratadas por 6 horas (*p<0.05 vs. 0 min, n=6). (C) As HUVECs apresentam um padrão semelhante aos fibroblastos cardíacos, com diminuição gradativa da viabilidade celular (*p<0.05 vs. 0 min, n=3).

4.6. Efeito dos fatores e do meio condicionado na viabilidade celular

4.6.1. Cardiomiócitos

Ao tratar os cardiomiócitos por 60 minutos com peróxido de hidrogênio e, após esse período, trocar o meio por meio novo com os fatores até completar o período de seis horas, tanto a Osteopontina (Figura 21A) quanto a SPARC (Figura 21B) não alteraram a viabilidade celular, independentemente das concentrações de proteínas testadas como tratamento. Já o tratamento com a MMP-3 apresentou uma redução significativa na viabilidade celular quando do uso da maior concentração (20nM, Figura 21C). Entretanto, os tratamentos combinados das três proteínas com as suas respectivas concentrações mais baixas (7,5nM SPARC, 10nM Osteopontina e 5nM MMP-3) ou médias (15nM SPARC, 20nM Osteopontina e 10nM MMP-3), não alteraram estatisticamente a viabilidade celular dos cardiomiócitos (Figura 21D).

Utilizando o tratamento com o meio condicionado (MC) de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo de ratos (rASC), não se observou diferença estatística na viabilidade celular quando comparada com as células tratadas apenas com H_2O_2 (Figura 21E). Avaliando o efeito protetor do MC rASC perante o efeito deletério do peróxido de hidrogênio, os cardiomiócitos foram pré-tratados com meio condicionado de rASC por duas horas e, em

seguida, tratados com H_2O_2 por seis horas. Apesar disso, o MC não foi capaz de proteger as células e melhorar a viabilidade celular (Figura 24A).

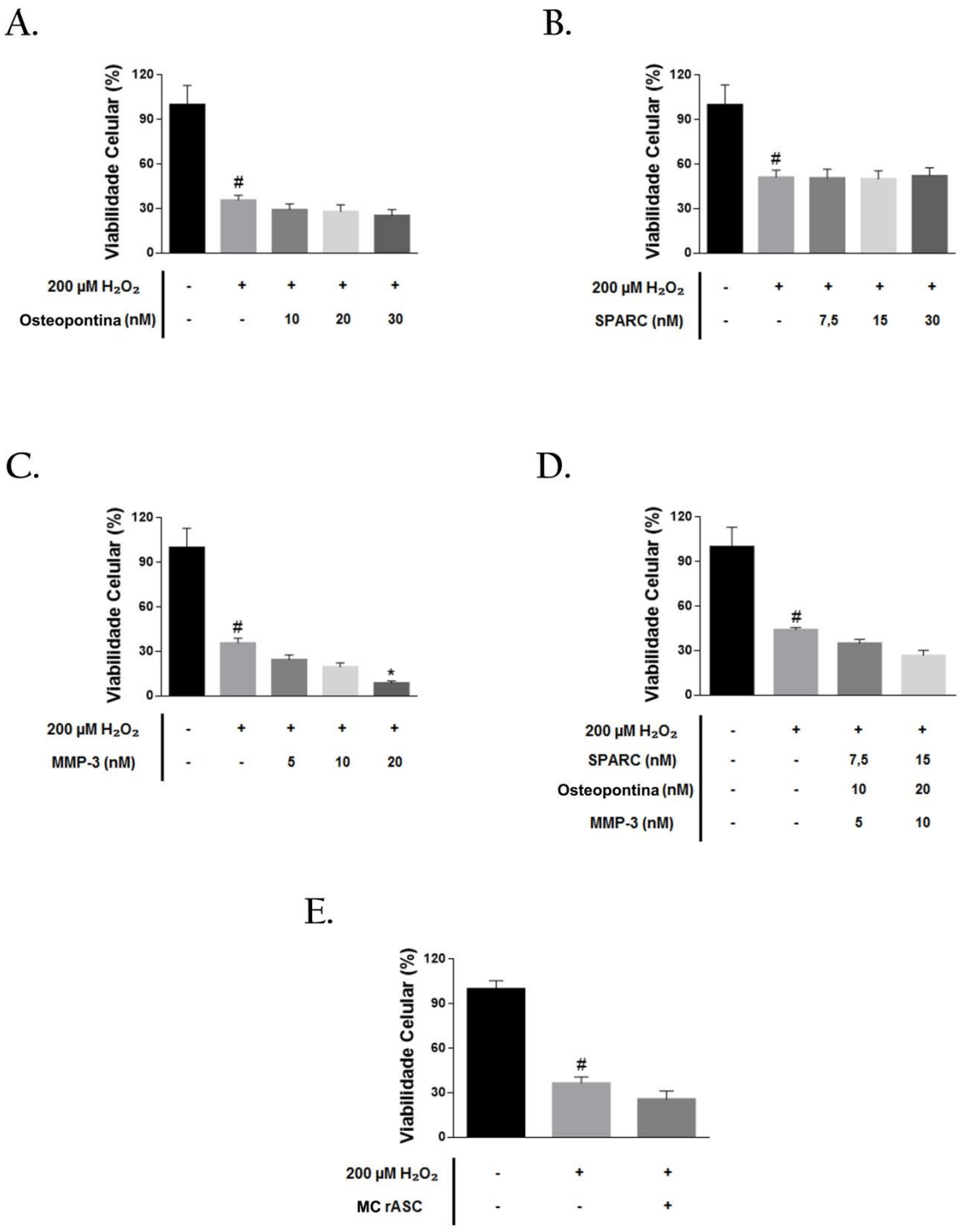


Figura 21: Efeito do tratamento com SPARC, Osteopontina, MMP-3 e MC na viabilidade celular de cardiomiócitos. Após serem tratados com H_2O_2 por uma hora, os cardiomiócitos de ratos neonatos foram tratados com as proteínas ou meio

condicionado (MC) por cinco horas e foi avaliado a viabilidade celular. Tanto o tratamento com Osteopontina (A) quanto com SPARC (B) não alteraram a viabilidade celular, independentemente das concentrações de proteínas testadas como tratamento ($p>0.05$ vs. 200µM H_2O_2; $\#p<0.005$ vs. 0µM H_2O_2, n=5). (C) O tratamento com a MMP-3 apresentou uma redução significativa na viabilidade celular quando do uso da maior concentração ($*p<0.05$ vs. 200µM H_2O_2; $\#p<0.0001$ vs. 0µM H_2O_2, n=5). (D) Os tratamentos combinados das três proteínas com as suas respectivas concentrações mais baixas (7,5nM SPARC, 10nM Osteopontina e 5nM MMP-3) ou médias (15nM SPARC, 20nM Osteopontina e 10nM MMP-3), não alteraram estatisticamente a viabilidade celular ($p>0.05$ vs. 200µM H_2O_2; $\#p<0.0003$ vs. 0µM H_2O_2, n=3). (E) Utilizando o tratamento com o MC, não se observou diferença estatística na viabilidade celular quando comparada com as células tratadas apenas com H_2O_2 ($p>0.05$ vs. 200µM H_2O_2; $\#p<0.0001$ vs. 0µM H_2O_2, n=5).

4.6.2. Fibroblastos Cardíacos

O tratamento com três concentrações diferentes de Osteopontina (Figura 22A) e SPARC (Figura 22B) também não alterou a viabilidade celular dos fibroblastos cardíacos. O tratamento com a MMP-3 induziu a uma redução significativa na viabilidade com todas as concentrações utilizadas (Figura 22C). Assim sendo, ao utilizar o tratamento combinado das três proteínas com as suas respectivas concentrações inferiores (7,5nM SPARC, 10nM Osteopontina e 5nM MMP-3) e médias (15nM SPARC, 20nM Osteopontina e 10nM MMP-3), esta última reduziu a viabilidade celular significativamente (Figura 22D).

De forma semelhante ao observado para cardiomiócitos, os fibroblastos cardíacos não apresentaram alterações significativas na viabilidade celular quando tratados por 60 minutos com peróxido de hidrogênio e, consecutivamente, com o MC rASC por mais cinco horas, quando comparados com as células tratadas apenas com H_2O_2 (Figura 22E). O MC também não foi capaz de prevenir o efeito deletério causado pelo peróxido de hidrogênio nos fibroblastos pré-tratados por duas horas e, em seguida, tratados por seis horas com H_2O_2 (Figura 24B).

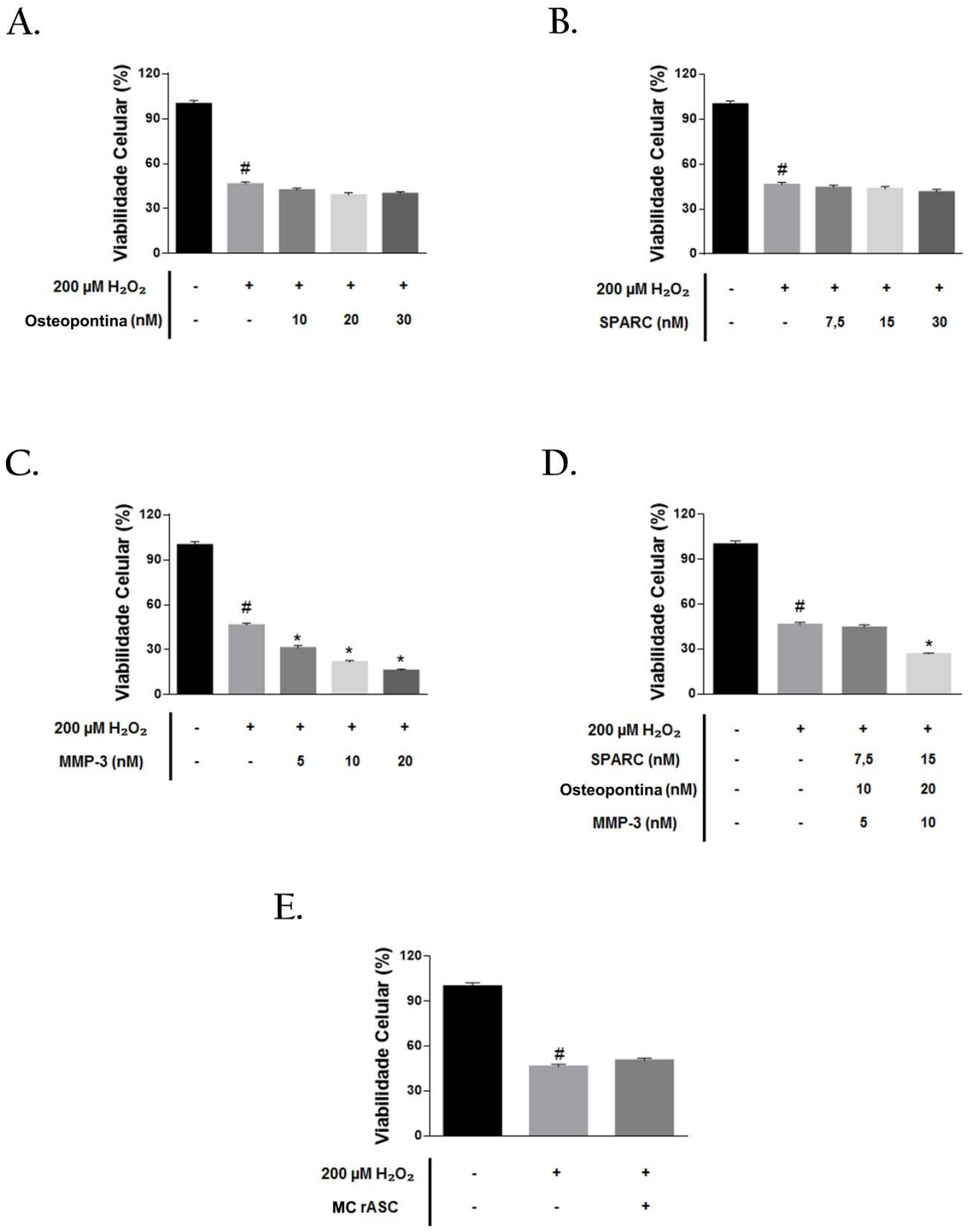


Figura 22: Efeito do tratamento com SPARC, Osteopontina, MMP-3 e MC na viabilidade celular de fibroblastos cardíacos. Após serem tratados com H_2O_2 por uma hora, os fibroblastos cardíacos foram tratados com as proteínas ou meio condicionado (MC) por cinco horas e foi avaliado a viabilidade celular. Tanto o tratamento com Osteopontina (A) quanto com SPARC (B) não alteraram a viabilidade celular, independentemente das concentrações de proteínas testadas como tratamento ($p>0.05$ vs. 200µM H_2O_2; #$p<0.0001$ vs. 0µM H_2O_2, n=6). (C) O tratamento com a MMP-3 apresentou uma redução significativa na viabilidade com todas as

concentrações utilizadas (*p<0.05 vs. 200µM H_2O_2; #p<0.0001 vs. 0µM H_2O_2, n=6). (D) Os tratamentos combinados das três proteínas com as suas respectivas concentrações mais baixas (7,5nM SPARC, 10nM Osteopontina e 5nM MMP-3) não alteraram a viabilidade celular, mas com as concentrações médias (15nM SPARC, 20nM Osteopontina e 10nM MMP-3), houve diminuição estatística da viabilidade celular (*p<0.05 vs. 200µM H_2O_2; #p<0.0001 vs. 0µM H_2O_2, n=6). (E) Utilizando o tratamento com o MC, não se observou diferença estatística na viabilidade celular quando comparada com as células tratadas apenas com H_2O_2 (p>0.05 vs. 200µM H_2O_2; #p<0.0001 vs. 0µM H_2O_2, n=6).

4.6.3. Células endoteliais

As HUVECs foram tratadas por 60 minutos com peróxido de hidrogênio e, após esse período, por cinco horas com meio fresco e os fatores. Tanto o tratamento com a Osteopontina (Figura 23A) quanto com a SPARC (Figura 23B) não favoreceram um aumento da viabilidade celular, mesmo na presença de três concentrações diferentes das proteínas testadas. O tratamento com a MMP-3 apresentou uma redução significativa na viabilidade celular quando usadas as concentrações de 10 e 20nM (Figura 23C). De maneira semelhante, O tratamento combinado das três proteínas com as suas respectivas concentrações médias (15nM SPARC, 20nM Osteopontina e 10nM MMP-3), foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular (Figura 23D).

As células tratadas com MC rASC não apresentaram diferença estatística na viabilidade celular quando comparadas com as células tratadas apenas com H_2O_2 (Figura 23E). Avaliando o efeito protetor do MC diante do efeito deletério do peróxido de hidrogênio, as HUVECs foram pré-tratadas com meio condicionado de rASC por duas horas e, em seguida, tratados com H_2O_2 por seis horas. Entretanto, esse tratamento não foi capaz de prevenir a redução na viabilidade celular induzida pelo H_2O_2 (Figura 24C).

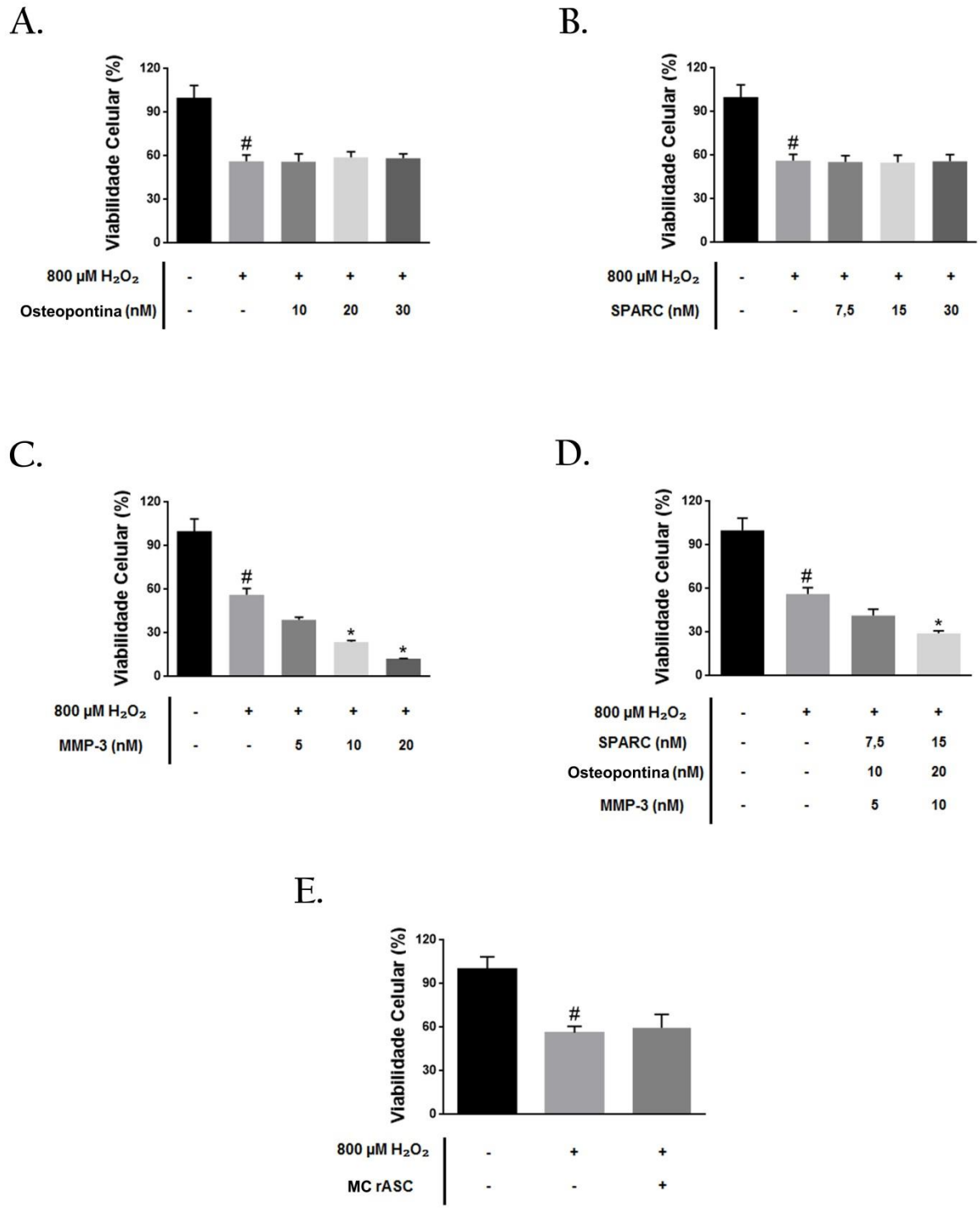


Figura 23: Efeito do tratamento com SPARC, Osteopontina, MMP-3 e MC na viabilidade celular de HUVECs. Após serem tratadas com H_2O_2 por uma hora, as células endoteliais foram tratadas com as proteínas ou meio condicionado (MC) por cinco horas e foi avaliado a viabilidade celular. Tanto o tratamento com Osteopontina (A) quanto com SPARC (B) não alteraram a viabilidade celular, independentemente das concentrações de proteínas testadas como tratamento ($p>0.05$ vs. 800µM H_2O_2; #$p<0.0001$ vs. 0µM H_2O_2, n=4). (C) O tratamento com a MMP-3 apresentou uma redução significativa na viabilidade celular quando usadas as concentrações de 10 e

20nM (*p<0.05 vs. 800µM H_2O_2; #p<0.0001 vs. 0µM H_2O_2, n=4). (D) Os tratamentos combinados das três proteínas com as suas concentrações mais baixas (7,5nM SPARC, 10nM Osteopontina e 5nM MMP-3) não alteraram a viabilidade celular, mas com as concentrações médias (15nM SPARC, 20nM Osteopontina e 10nM MMP-3), houve diminuição estatística da viabilidade celular (*p<0.05 vs. 800µM H_2O_2; #p<0.0001 vs. 0µM H_2O_2, n=4). (E) Utilizando o tratamento com o MC, não se observou diferença estatística na viabilidade celular quando comparada com as células tratadas apenas com H_2O_2 (p>0.05 vs. 800µM H_2O_2; #p<0.0022 vs. 0µM H_2O_2, n=3).

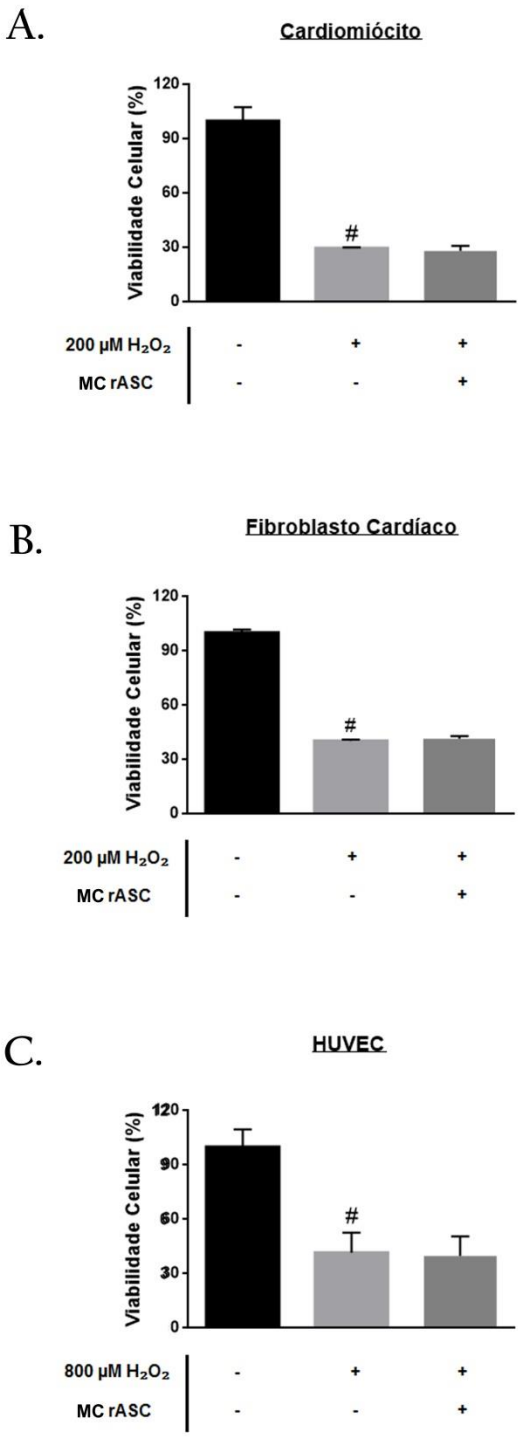


Figura 24: Efeito do pré-tratamento com MC na viabilidade celular de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e HUVECs. Antes de serem tratadas com H_2O_2 por seis horas, as células foram pré-tratadas com meio condicionado (MC) por duas horas. (A) Em relação aos cardiomiócitos, o MC não foi capaz de proteger as células e melhorar a viabilidade celular ($p>0.05$ vs. 200µM H_2O_2; #$p<0.0001$ vs. 0µM H_2O_2, n=3). (B) O MC também não foi capaz de prevenir o efeito deletério causado pelo peróxido de hidrogênio nos fibroblastos pré-tratados por duas horas ($p>0.05$ vs. 200µM H_2O_2; #$p<0.0001$ vs. 0µM H_2O_2, n=3). (C) As HUVECs foram pré-tratadas com meio condicionado de rASC por duas horas e, em seguida, tratados com H_2O_2 por seis

horas, mas não houve alteração na viabilidade celular ($p>0.05$ vs. 800µM H_2O_2; $\#p<0.0061$ vs. 0µM H_2O_2, n=3).

4.7. Efeito do MC rASC, SPARC e Osteopontina na secreção de colágeno

A secreção de colágeno foi avaliada em fibroblastos cardíacos tratados com H_2O_2 por uma hora e, após esse período, tratados por cinco horas adicionais com MC, SPARC ou Osteopontina (Figura 25). O meio condicionado de rASC foi capaz de reduzir significativamente a secreção de colágeno, em relação às células tratadas apenas com peróxido de hidrogênio (Figura 25A), não existindo diferença em relação às células não tratadas Já a concentração de 10nM de Osteopontina não alterou a secreção de colágeno por fibroblastos cardíacos tratados com peróxido de hidrogênio (Figura 25B).

Entretanto, ao utilizar a concentração de 7,5nM de SPARC, uma redução significativa dos níveis de colágeno secretado foi observada, semelhante ao encontrado com o tratamento do MC, não havendo diferença em relação às células não tratadas com H_2O_2 (Figura 25C). Apesar de ter sido demonstrado que o tratamento com peróxido de hidrogênio aumenta a secreção de colágeno, a expressão proteica intracelular do colágeno tipo I não é alterada com essa droga (Figura 26). Ainda assim, o tratamento com duas das três concentrações de SPARC (7,5 e 30nM) reduziu significativamente a expressão de colágeno tipo I, relativo tanto às células não tratadas quanto às tratadas com H_2O_2 (Figura 26).

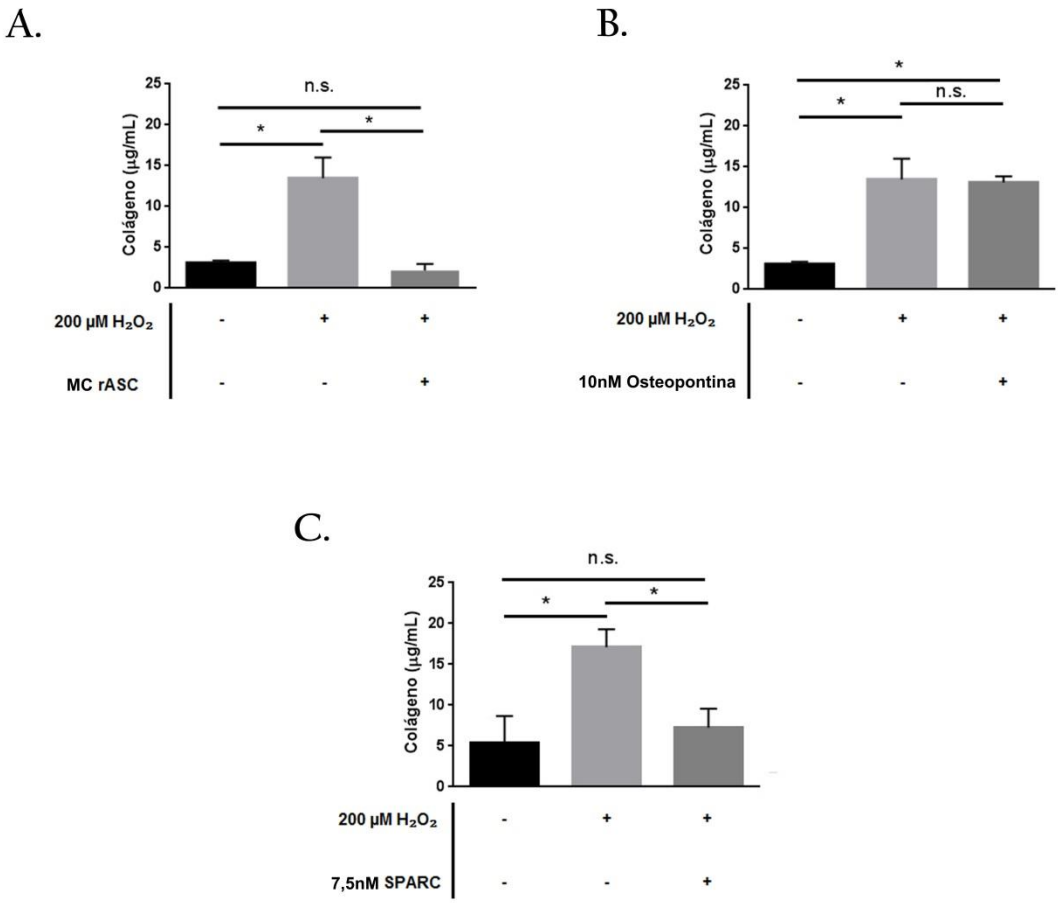


Figura 25: Análise da produção de colágeno em fibroblastos cardíacos tratados com MC, Osteopontina e SPARC. Uma hora após o tratamento com H_2O_2, os fibroblastos cardíacos foram tratados com as proteínas ou meio condicionado (MC) por cinco horas e foi avaliada a produção de colágeno por Sircol. (A) Utilizando o tratamento com o MC, observou-se diferença estatística na produção de colágeno quando comparado com as células tratadas apenas com H_2O_2 ($p>0.05$ vs. 0µM H_2O_2; *$p<0.05$ vs. 200µM H_2O_2, n=4). (B) Semelhante ao resultado encontrado pelo tratamento com o MC, a concentração de 10nM de Osteopontina também não foi capaz de reduzir a secreção de colágeno ($p>0.05$ vs. 200µM H_2O_2; *$p<0.0014$ vs. 0µM H_2O_2, n=4). (C) Já a concentração de 7,5nM de SPARC foi capaz de reduzir significativamente os níveis de colágeno secretado, não havendo diferença em relação às células não tratadas com H_2O_2 ($p>0.66$ vs. 0µM H_2O_2; *$p<0.04$ vs. 200µM H_2O_2, n=3).

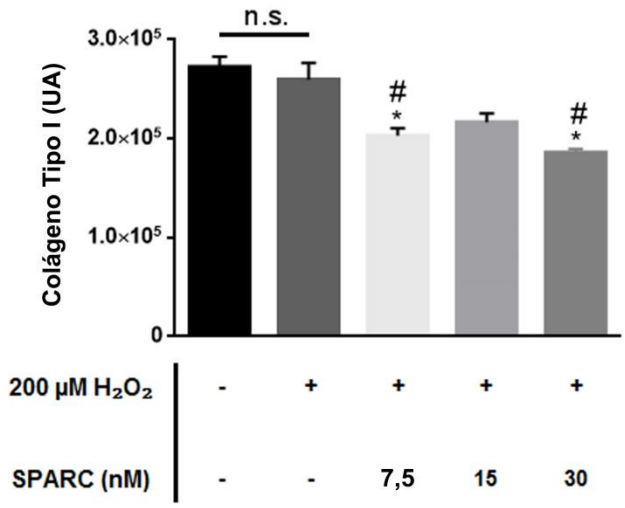


Figura 26: Análise da expressão proteica endógena de colágeno tipo I em fibroblastos cardíacos tratados com SPARC. Uma hora após o tratamento com H_2O_2, os fibroblastos cardíacos foram tratados com SPARC por cinco horas e foi avaliada a expressão de colágeno tipo I por imunofluorescência. Apesar de o tratamento com peróxido de hidrogênio não alterar a expressão desse tipo de colágeno ($p>0.05$ vs. 0µM H_2O_2), duas das três concentrações de SPARC (7,5 e 30nM) reduziram significativamente a expressão de colágeno tipo I, relativo tanto às células não tratadas quanto às tratadas com H_2O_2 (*$p<0.05$ vs. 200µM H_2O_2; #$p<0.05$ vs. 0µM H_2O_2, n=2).

4.8. Efeito de SPARC na angiogênese

O modelo de angiogênese baseado na formação de tubos foi utilizado para verificar o efeito de SPARC em HUVECs não-tratadas com H_2O_2. Para isso, as células foram tratadas com três concentrações 7,5, 15 e 30nM.

Em relação ao número de tubos formados por campo, não há diferença estatística (Figura 27A). O número de ramificações não apresentou alteração significativa (Figura 27B). A área média dos tubos, assim como os outros dois parâmetros anteriores, também não apresentou diferença estatística nas células tratadas em relação ao controle não tratado com a SPARC (Figura 27C).

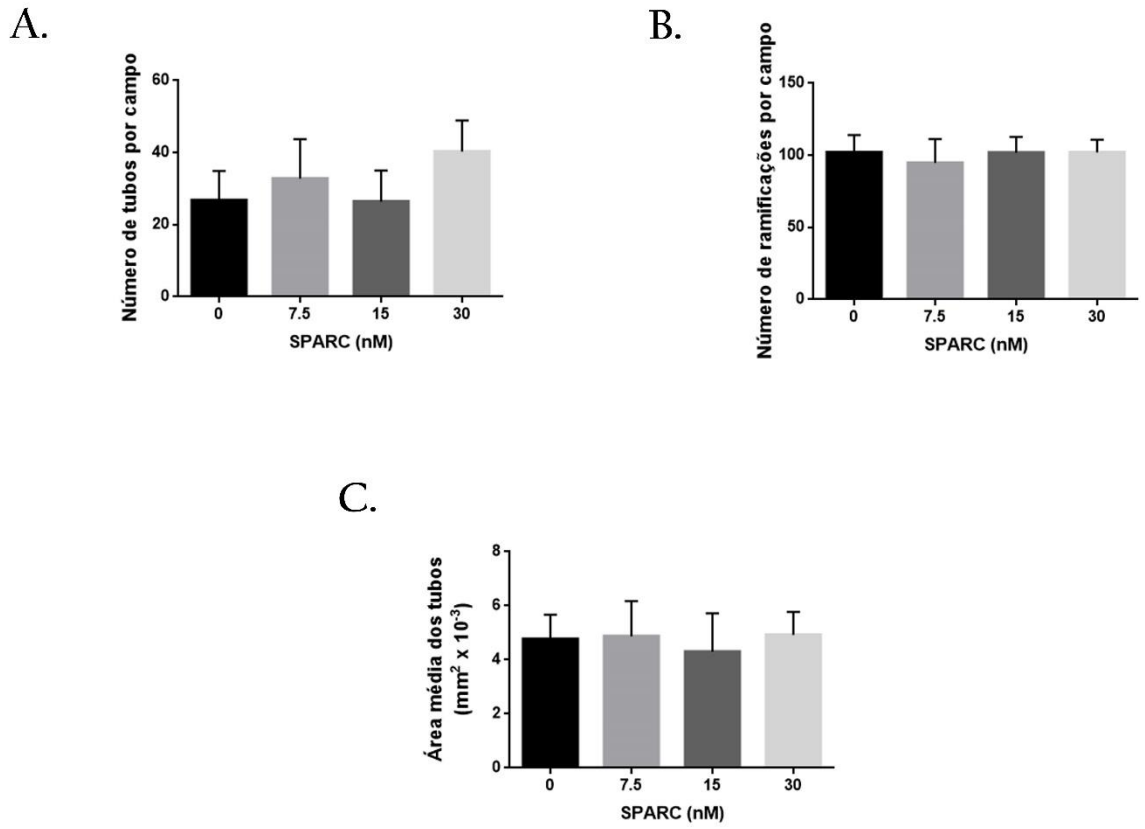


Figura 27: Efeito do tratamento com SPARC sobre o ensaio de formação de tubos por HUVECs. Visto que o H_2O_2 não permite a adesão das células e consequente formação dos tubos, este experimento foi realizado na ausência de um estímulo estressor. As células foram plaqueadas em uma camada de Geltrex e após 10 horas foram fotografadas. O tratamento com nenhuma das concentrações de SPARC foi capaz de aumentar o número de tubos (A), número de ramificações (B) ou a área média dos tubos (C) ($p>0.05$ vs. 0nM, n=3)

.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, uma série de estudos tem demonstrado os efeitos da terapia celular no miocárdio infartado. Dados deste laboratório mostraram que a injeção de células-tronco derivadas da medula óssea (11) ou do tecido adiposo (8) previnem a deterioração cardíaca pós-infarto do miocárdio no modelo de roedores. Entretanto, *Nakamuta et al*. (11) e *Dariolli et al.* (dados não publicados) demonstraram que essas células apresentam baixa retenção no tecido cardíaco e não se transdiferenciam em outras células, como cardiomiócitos e células endoteliais, reforçando a ideia de que o efeito dessas células seja via secreção parácrina de fatores.

Sendo assim, o principal objetivo deste estudo foi analisar o secretoma de células-tronco derivadas de tecido adiposo de camundongo (mASC), com a ideia de identificar proteínas-alvo que pudessem ajudar a explicar o efeito parácrino observado em estudos *in vivo* quando do transplante de células-tronco no coração pós-IM. As proteínas encontradas no secretoma estão relacionadas com adesão celular, regulação do citoesqueleto, resposta à hipóxia e estresse oxidativo, desenvolvimento e remodelação de cartilagem e osso, e proteólise, sendo que a maioria destes fatores tem localização intracelular/transmembrana, principalmente.

Ao submeter apenas as proteínas secretadas a uma análise de interação pelo software *GeneGo MetaCore*, encontrou-se uma relação interessante entre três proteínas: SPARC, MMP-3 e Osteopontina. A análise mostrou que esses fatores estão presentes em processos relacionados com a quimiotaxia, a regulação da angiogênese, inflamação, proteólise e remodelação óssea. Com o objetivo de verificar se havia relações entre estas três proteínas e os fatores encontrados no coração pós-IAM, trabalhos científicos que apresentaram

dados da expressão gênica e/ou proteica do tecido cardíaco isquêmico foram avaliados (65-70) e observou-se a presença de 308 fatores diferencialmente expressos, dos quais 231 são super-expressos, 80 são sub-expressos e 3 são não-concordantes. Realizou-se a análise de interação entre os fatores mais representativos, super e sub-expressos, com as três proteínas e obteve-se relações importantes com o VEGF e a caspase-8.

SPARC é uma glicoproteína de matriz anti-adesiva e anti-proliferativa com afinidade para cálcio e que se liga a diversos componentes da matriz, com vitronectina, nidogênio, colágenos e trombospondina (71). Ela regula a interação célula-matriz e também a função celular, contribuindo assim para a organização da matriz extracelular. A análise de interação mostrou que SPARC se liga a VEGF (72), impedindo-o de se ligar ao VEGFR. Essa glicoproteína também pode aumentar a ativação de caspase-8 (73). A Osteopontina também é uma glicoproteína e tem função de adesão celular quando liga-se a integrinas (74-76) e quimiotaxia quando interage com o receptor CD44 (77). Através da análise de interação, foi demonstrado que esta proteína influencia a expressão de VEGF (78, 79) e é clivada pela caspase-8 (80).

MMP-3 é uma protease dependente de zinco conhecido por degradar a matriz extracelular. Esta metaloprotease apresenta uma ampla especificidade a substratos, tais como fibronectina, laminina, elastina, proteoglicanos e colágenos (81). Por meio da análise pelo programa *MetaCore*, foi encontrado que MMP-3 cliva Osteopontina, semelhante à trombina (82), e SPARC (83). Esta clivagem resulta em três fragmentos, um fragmento pode estimular o crescimento vascular, enquanto os outros dois inibem a proliferação celular e não têm efeito sobre a formação de vasos (83). MMP-3 pode clivar VEGF e, de

forma interessante, um dos peptídeos resultantes da clivagem não tende a aumentar o número de vasos formados, mas sim o calibre dos mesmos (84). Com isso, frente a inter-relação das três proteínas derivadas do secretoma e a relação destes com os principais fatores encontrados no coração infartado, avaliou-se a expressão e o efeito destas proteínas sobre os três tipos celulares básicos que compõem o coração: fibroblastos, cardiomiócitos e células endoteliais. Para tanto, foram padronizados modelos celulares, *in vitro,* que podem mimetizar alguns dos cenários presentes em desfechos clínicos de alta complexidade que envolvem a isquemia cardíaca. Dentre estes cenários o primeiro estímulo a ser testado foi um modelo de hipóxia por baixa tensão de oxigênio.

Durante a isquemia, a resposta do coração à lesão é altamente complexa, onde os três tipos celulares básicos que constituem o coração (cardiomiócitos, fibroblastos e células endoteliais) respondem, teoricamente, à hipóxia induzida pelo infarto do miocárdio. Os resultados deste estudo indicam que, pelo menos quando se trata de morte celular e de estresse oxidativo, o tipo celular não-miócito predominante no coração, no caso, os fibroblastos cardíacos, são as células mais resistentes à hipóxia. Esta afirmação também já foi demonstrada verdadeira por dados da literatura (85-87), e alguns autores mostram aumento na morte celular de fibroblastos em períodos maiores, entre 72 horas e 8 dias de hipóxia (86, 88). *Mayorga et al.* (86), buscando entender essa resistência à morte celular, submeteram fibroblastos cardíacos, dermais e pulmonares aos tratamentos com hipóxia, privação de soro, estaurosporina ou etoposídeo e observaram que os fibroblastos de origem cardíaca são mais resistente a todos esses estímulos em comparação com fibroblastos de outros

locais. Segundo os autores, a resistência dos fibroblastos pode ser explicada pela não ativação por clivagem de caspase-3, consistente com os nossos resultados, e devido ao bloqueio da libertação de citocromo C. No entanto, a chave para esta resistência é a super-expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, que não é expressa por outros tipos de fibroblastos.

Os cardiomiócitos de ratos neonatos foram utilizados neste trabalho devido à sua facilidade de obtenção e cultivo, além de já ser muito utilizada neste laboratório. A técnica de extração por *preplating*, tempo de utilização pós-extração, concentração de soro e número de células plaqueadas foram baseadas no trabalho de *Socas et al*. (dados não publicados). Estas células demostraram ser muito sensíveis à hipóxia, corroborando dados prévios de outros trabalhos (89-91). Entretanto, devido a resistência à morte dos fibroblastos frente à hipóxia e também porque a estufa de hipóxia do laboratório apresentou problemas, esse modelo teve de ser suspenso.

Em um primeiro momento, foi realizada a hipóxia química por $CoCl_2$, um indutor de HIF-1α. Entretanto, esse modelo mostrou-se ineficaz em aumentar a morte celular. Visto isso, o modelo de indução de morte celular por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado.

Neste estudo, demonstrou-se a sensibilidade de cardiomiócitos de ratos neonatos para H_2O_2 e que os danos induzidos por peróxido de hidrogênio são tempo e concentração dependentes. Esses resultados são corroborados por outros estudos (92-94). *Lv et al.* (93) mostraram um aumento significativo na expressão de miR-214 em células tratadas com peróxido de hidrogênio e apresentaram resultados conclusivos de que este fator protege as células contra o estresse oxidativo através da cascata de PTEN. No entanto, *Mangat et*

al. (95) demonstraram uma diminuição na viabilidade celular de, aproximadamente, 80% com a mesma dose de H_2O_2 de 100µM, em apenas 15 minutos. A diferença entre os dados pode ser relacionada ao fato de que o trabalho foi feito com cultura que contém apenas 0,5% de soro, enquanto que aqui a cultura celular continha 15% durante as primeiras 48 horas e 1% ao longo do experimento. O efeito do soro deve-se ao fato de que este apresenta uma capacidade de anti-oxidantes totais muito superior ao meio de cultura normal (96). Sendo assim, o efeito do H_2O_2 na cultura celular é menor quanto maior for a concentração de soro.

Embora os fibroblastos cardíacos não tenham apresentado redução da viabilidade celular quando submetidos às baixas tensões de oxigênio, essas células demonstraram ser sensíveis ao tratamento com H_2O_2. No entanto, contrariando os resultados apresentados, de acordo com *Philip e Shivakumar* (97), o fibroblasto cardíaco apresenta uma resistência à morte por H_2O_2 quando comparado com os fibroblastos de pulmão devido ao aumento da expressão do gênica e proteica de cIAP-2, um fator anti-apoptótico. Porém, a dose máxima utilizada por estes autores foi de 50µM H_2O_2 em três horas, resultando numa diminuição da viabilidade de apenas 10%.

A obtenção de células endoteliais foi testada, inicialmente, a partir da extração de células do pulmão e também do coração de ratos adultos, através da utilização de *beads* magnéticas. Devido à dificuldade e, principalmente, ao baixo rendimento, a técnica de extração de células endoteliais microvasculares derivadas de músculo cremaster foi utilizada. Entretanto, estas células apresentavam mínima marcação para CD31, inviabilizando o uso da mesma.

Por isso, a cultura primária de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), obtidas comercialmente, foi utilizada.

Ao contrário do que foi observado anteriormente com os cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos, as HUVECs foram muito mais resistentes à indução da morte por tratamento com H_2O_2. De acordo com *Park* (98), a alta resistência das HUVECs ao tratamento com peróxido de hidrogênio não é compartilhada por todos os tipos de células endoteliais. Ao analisar a apoptose induzida por H_2O_2 durante 24 horas em HUVEC e células endoteliais de artéria pulmonar de bezerro (*calf pulmonary artery endothelial cells* - CPAEC), o autor descobriu que para induzir 50% de morte em CPAEC foi necessária uma concentração de 50µM, enquanto que para induzir 28% de morte em HUVEC, uma dose 6 vezes mais elevada foi necessária. Curiosamente, H_2O_2 induz ao aumento dos níveis de ânion superóxido em HUVEC, mas estes níveis foram diminuídos em CPAEC. Juntos, estes dados sugerem que as HUVECs são mais resistentes a este tratamento devido à quantidade de enzimas antioxidantes presentes nas mesmas.

Curiosamente, não foi possível detectar a porção clivada da caspase-3 nas HUVECs tratadas com H_2O_2. Segundo *Csordas et al.* (99), isto se deve ao fato de HUVECs tratadas com altas concentrações de peróxido de hidrogênio apresentarem depleção de energia, inibindo assim a clivagem da caspase neste sítio específico, mas podendo sofrer uma clivagem não-canônica.

Antes de realizar os tratamentos com as proteínas-alvo (SPARC, Osteopontina e MMP-3), avaliou-se a expressão endógena destes três fatores em cada tipo de célula, com e sem tratamento de H_2O_2.

Ao analisar a expressão proteica de Osteopontina em cardiomiócitos, não houve alteração na quantidade de proteína total, mas uma diminuição significativa da proteína clivada nas células tratadas com a maior concentração de H_2O_2. A análise da expressão gênica não apresentou um aumento significativo nas células tratadas. Depois de encontrar uma redução da expressão da Osteopontina clivada em células tratadas com H_2O_2, foi sugerido que esta proteína estaria sendo secretada para o meio extracelular. Encontrou-se uma pequena quantidade de Osteopontina clivada no meio, nas células tratadas com a concentração de 200µM de H_2O_2. No entanto, há um aumento também na beta-actina, concluindo assim que a proteína observada no meio de cultura pode ser derivada da lise celular. Curiosamente, *Dalal et al.* (100) não detectaram Osteopontina no lisado ou no meio de cultura de cardiomiócitos adultos, parcialmente indo contra estes resultados. Isto pode ser explicado pela ausência desta proteína no coração de ratos adultos, mas não no coração de neonatos (101). A expressão de SPARC é encontrada em ambos os cardiomiócitos adultos e em neonatos (102-104). A detecção de SPARC por *Western blot* revelou o mesmo padrão do obtido para a Osteopontina clivada. No entanto, a expressão gênica permaneceu inalterada. Ao avaliar a expressão desta proteína no meio de cultura, a mesma não foi detectada. MMP-3 apresenta baixa expressão de proteínas, tanto no tecido cardíaco saudável como no infartado (105). As células tratadas com H_2O_2 não apresentaram nenhuma diferença significativa na expressão proteica de MMP-3. No entanto, quando se refere â expressão gênica, as células tratadas com 100µM mostram um aumento de cerca de 17 vezes, embora ainda seja pouco expressa.

A análise da expressão proteica de Osteopontina total em fibroblastos cardíacos não apresentou alteração com o tratamento com H_2O_2. A porção clivada apresentou uma redução com o tratamento, mas essa não foi significativa. A expressão gênica apresentou uma redução significativa apenas nas células tratadas com 300µM de H_2O_2. O estudo de *Ashizawa et al.* (106) foi o primeiro a demonstrar a expressão de Osteopontina em fibroblastos cardíacos, tanto em adultos como em neonatos, e a sua regulação por angiotensina II, demonstrando a complexa relação entre esses fatores e os efeitos sobre a síntese de DNA e o ensaio de contração de gel. Tanto a expressão proteica quanto gênica de SPARC apresentam significativa redução nas células tratadas com H_2O_2. Contrário a esses resultados, *Frippiat et al.* (107) demonstraram que o tratamento de fibroblastos humanos diploides com H_2O_2 aumenta a expressão de SPARC. Apesar de utilizar uma concentração semelhante à utilizada neste trabalho (150µM), os experimentos foram realizados com 10% de FBS e 72 horas após a exposição ao H_2O_2, sendo esta de apenas duas horas. A expressão proteica de MMP-3 não apresentou alteração com o tratamento com peróxido de hidrogênio e sua expressão gênica não foi detectável. De fato, *van Nieuwenhoven et al*. (108) evidenciaram que a expressão gênica desse fator em fibroblastos cardíacos humanos é extremamente baixa e que a presença do mesmo no meio de cultura é apenas cerca de 50pg/mL, após 24 horas de cultivo.

Semelhante ao encontrado nos cardiomiócitos há um aumento na quantidade de SPARC e Osteopontina clivada no meio de cultura. Entretanto, há um aumento também da beta-actina, concluindo mais uma vez que a

proteína observada no meio de cultura é derivada da lise celular. A MMP-3 não foi detectada no meio de cultura.

Tanto a expressão gênica como proteica de Osteopontina, mesmo sendo encontrada em outro trabalho utilizando HUVEC (109), não apresentou nenhuma alteração com o tratamento de H_2O_2. As expressões gênica e proteica de MMP-3 não foram detectadas, embora essa última tenha sido encontrada por outros autores (110, 111). SPARC é normalmente expressa em HUVEC (112), mas o tratamento de H_2O_2 não alterou a expressão gênica e proteica deste fator, mesmo com uma redução não significativa nas células tratadas. Curiosamente, *Kato et al.* (112) demonstraram que o tratamento de células endoteliais com o VEGF aumenta a expressão da SPARC, e este efeito pode ser revertido por meio de um inibidor de p38.

Tendo em vista a alteração dos fatores em cardiomiócitos e fibroblastos, mas não em HUVECs (Tabela 4), duas hipóteses foram arquitetadas: (**i**) o peróxido de hidrogênio induz a clivagem e degradação desses fatores naquelas células, porém, assim como ocorre com a caspase-3 em HUVECs, altas concentrações de H_2O_2 podem depletar a energia da célula endotelial, impossibilitando assim a clivagem dessas proteínas; (**ii**) o stress oxidativo causado pelo tratamento com H_2O_2 ativa vias de sinalização intracelular que vão influenciar a expressão gênica e proteica desses fatores de maneira diferente em cada tipo celular. De fato, esta última hipótese é corroborada por *Clerk et al.* (113), que encontraram diferentes níveis de expressão de vários genes ao tratar cardiomiócitos com 0,2 e 0,04mM de H_2O_2 por 2, 4 e 24 horas.

Tabela 4: Efeito do H_2O_2 na expressão gênica e proteica.

Célula	Expressão Proteica				Expressão Gênica		
	SPARC	MMP-3	Osteopontina		SPARC	MMP-3	Osteopontina
			Total	Clivada			
Cardiomiócito	↓	-	-	↓	-	↑	-
Fibroblasto Cardíaco	↓	-	-	-	↓	*	↓
HUVEC	-	*	-	-	-	*	-

* Não detectada

Para verificar o efeito das proteínas na viabilidade das células tratadas com H_2O_2 e evitar uma possível alteração estrutural dos fatores induzida pelo peróxido de hidrogênio, podendo resultar em perda da função dos mesmos, foi avaliada a degradação do H_2O_2. Os dados demonstraram que a concentração de peróxido de hidrogênio diminui 50%, aproximadamente, nos dez minutos iniciais, ficando relativamente estável após esse período e que as células cultivadas por cinco horas com meio normal, após uma hora de tratamento, apresentam viabilidade semelhante à encontrada por células tratadas por seis horas. Sendo assim, avaliou-se o efeito das três proteínas e do meio condicionado durante cinco horas, após uma hora de tratamento com H_2O_2.

O tratamento de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e HUVECs com MC de rASC não foi capaz de melhorar a viabilidade celular, em relação às células tratadas com H_2O_2. Concordando com esses resultados, *Fidelis-de-Oliveira et al.* (114) mostraram que o meio condicionado de MSCs derivadas da medula óssea, pré-condicionadas ou não em hipóxia, não conseguiu reduzir a apoptose de cardiomiócitos submetidos à hipóxia. Quando realizou-se o pré-tratamento dessas células com o MC, duas horas antes do tratamento com H_2O_2, a prevenção da viabilidade celular também não foi observada.

O tratamento com três concentrações diferentes de SPARC também não melhorou a viabilidade celular. Curiosamente, *McCurdy et al.* (115) demonstraram que animais *knock-out* para SPARC apresentam, três dias após o infarto, menores volumes finais diastólico e sistólico, além de uma maior fração de ejeção, quando comparado com animais *wild-type*. Em contrapartida, *Schellings et al.* (116) mostraram que animais *knock-out* para SPARC têm muito mais chance de morrer por ruptura cardíaca do que os animais *wild-type*, após o infarto do miocárdio. O autor mostrou ainda que animais que super-expressam SPARC apresentam uma melhora da função cardíaca e prevenção da dilatação do órgão pós-infarto.

A utilização de três concentrações diferentes de Osteopontina também não teve efeito estatístico nas células tratadas. Apesar disso, o trabalho de *Dalal et al.* (100) demonstrou que o tratamento de cardiomiócitos de ratos adultos com 20nM de Osteopontina aumenta a morte celular, ainda que esta seja de baixa magnitude (controle: 4,8% *versus* tratado: 12,8%). O autor ainda mostra que animais modificados geneticamente para super-expressar Osteopontina apenas em cardiomiócitos apresentam aumento no número de células TUNEL-positivas e diminuição da fração de encurtamento.

A MMP-3, diferente dos fatores anteriores, diminuiu a viabilidade das células tratadas. Considerando que a MMP-3 é uma metaloprotease que degrada matriz (81), ao final do experimento observou-se uma quantidade significativa de células não-aderidas e que, portanto, não foram detectáveis pelo ensaio de MTT, e podem ter colaborado para a redução na viabilidade celular. Ainda assim, esse fator é associado com disfunção ventricular e pior

prognóstico após infarto do miocárdio (117). Quando utilizou-se a terapia combinada dos três fatores, há uma diminuição na viabilidade de fibroblastos e de células endoteliais com a concentração intermediária das proteínas, provavelmente associada à falta de adesão das células promovida pela presença da MMP-3. Diante disso, os experimentos seguintes foram realizados sem o tratamento com essa metaloprotease.

Os resultados mostram que o tratamento com H_2O_2 é capaz de aumentar a produção e secreção de colágeno consideravelmente. Segundo *Wang et al.* (118), isto se deve ao fato de que o tratamento com peróxido de hidrogênio induz um aumento na expressão tempo-dependente das subunidades da NAD(P)H oxidase (p47phox, Nox2 e Nox4), sendo que a produção de colágeno é revertida através do *knock-down* de qualquer uma destas três subunidades. De fato, *Iglesias-De La Cruz et al*. (119) demonstraram que o tratamento de células mesangiais humanas com glucose oxidase, uma enzima que produz continuamente H_2O_2, a expressão gênica de colágeno tipo I, III e IV aumenta estatisticamente. Entretanto, quando avaliou-se apenas a expressão de colágeno tipo I, as células tratadas com peróxido de hidrogênio não apresentaram aumento na expressão intracelular desse tipo de colágeno. Apesar disso, *Guo et al.* (120) apresentaram aumento na concentração desse colágeno no meio extracelular, em fibroblastos cardíacos tratados com 100µM de H_2O_2 por seis horas. O fato do peróxido de hidrogênio não aumentar a expressão do colágeno tipo I intracelular, mas aumentar a secreção de colágeno total pode ter duas explicações: (**i**) apesar de não aumentar o colágeno tipo I, há um aumento nos outros tipos de colágeno (II, III,

V e XI) que serão secretados preferencialmente; (**ii**) há uma maior produção de colágeno tipo I, mas, este é totalmente secretado, apresentando apenas níveis basais no interior da célula.

Ao tratar os fibroblastos com MC de rASC, houve redução significativa na secreção de colágeno. Importante ressaltar o fato de que este meio da célula mesenquimal apresenta grande quantidade de colágeno dissolvido: cerca de 30µg/mL. Entretanto, quantificando-se o colágeno em uma placa sem células contendo apenas solução de 50% MC de rASC e 50% DMEM *High* por cinco horas na incubadora, encontrou-se uma concentração final de 8µg/mL. Dessa forma, essa quantidade de colágeno foi subtraída do resultado obtido com os fibroblastos cardíacos tratados com MC, resultando em diminuição significativa na produção de colágeno dessas células. De fato, outros trabalhos mostram redução na expressão gênica de colágeno em fibroblastos cardíacos e redução no tamanho da cicatriz de animais infartados e tratados com o MC (121, 122).

Os fibroblastos cardíacos tratados com 7,5nM de SPARC apresentaram uma redução significativa na secreção de colágeno, quando comparado às células tratadas apenas com H_2O_2, não existindo diferença em relação às células não tratadas com peróxido de hidrogênio. Corroborando esse resultado, avaliando-se especificamente a expressão de colágeno tipo I, as células tratadas com H_2O_2 e com SPARC apresentaram redução significativa do colágeno tipo I. Esses dados são corroborados por *Harris et al.* (58), ao tratarem fibroblastos cardíacos *knock-out* para SPARC, apresentaram redução significativa na expressão de colágeno I. Os autores ainda demonstra que

fibroblastos *knock-out* para SPARC têm maior expressão de colágeno tipo I e V.

O tratamento com 10nM de Osteopontina não foi capaz de reduzir a secreção de colágeno nos fibroblastos tratados com H_2O_2. Previamente, *Trueblood et al.* (123), demonstraram que, embora animais *knock-out* para Osteopontina infartados não apresentassem diferença no tamanho do infarto quando comparados com animais *wild-type*, tanto a expressão gênica como proteica de colágeno tipo I estavam significativamente reduzidas nos animais *knock-out* infartados. Por outro lado, *Pardo et al*. (124) mostraram que o tratamento de fibroblastos pulmonares humanos com Osteopontina aumenta duas vezes a expressão gênica de colágeno tipo I. Esta divergência provavelmente deve-se à diferença nas espécies e origens dos fibroblastos e também ao fato de que o ensaio de Sircol, utilizado nesse estudo, detecta não apenas o tipo I, mas também os tipos II, III, V e XI de colágeno.

Tendo em vista que tanto a Osteopontina quanto o MC não reduziram a secreção de colágeno, apenas o efeito da SPARC foi avaliado no modelo de angiogênese pelo sistema de formação de vasos em matriz. Entretanto, apesar de o objetivo desse trabalho ter como base o efeito deletério do H_2O_2, nesse ensaio não foi possível utilizar o mesmo. Isso se deve ao fato de que, ao plaquear as células em uma matriz e trata-las com peróxido de hidrogênio, este não permite a adesão dessas células e consequente migração e formação de tubos, impossibilitando o ensaio. Assim, este ensaio foi realizado na ausência de um estímulo estressor. Entretanto, nenhuma das concentrações de SPARC amplificou qualquer dos parâmetros observados (número de tubos, número de

ramificações e área média dos tubos). *Chlenski et al*. (125), ao utilizar o modelo do *plug* de matrigel, demonstraram que o tratamento com bFGF e quatro concentrações diferentes de SPARC pode não alterar ou até mesmo reduzir a densidade de vasos formados e o tamanho dos mesmos, quando comparados ao controle tratado apenas com bFGF. Outros trabalhos demonstraram que células endoteliais tratadas com MC de células tumorais super-expressando SPARC apresentam inibição na formação de tubos e proliferação celular, além de supressão de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF, FGF e PDGF pelas células tumorais (126, 127). Mais recentemente, *Cydzik et al.* (128) demonstraram que células endoteliais tratadas com VEGF apresentam um aumento na adesão celular, migração, proliferação e na formação de vasos (comprimento dos tubos, tamanho dos tubos e número de junções), e que todos esses efeitos foram revertidos pelo co-tratamento de VEGF com SPARC (128). Os autores descreveram que SPARC se liga ao VEGF e forma um complexo estável, não permitindo que VEGF ligue-se ao seu receptor e ative os efetores intracelulares. Por outro lado, assim como em nosso estudo, o tratamento apenas com SPARC não produziu nenhum dos efeitos acima citados (128).

6. SUMÁRIO

a) Os fibroblastos cardíacos são resistentes à hipóxia por baixa tensão de O_2, mas sensíveis ao tratamento com H_2O_2;

b) Os cardiomiócitos são sensíveis tanto à hipóxia quanto ao peróxido de hidrogênio;

c) As células endoteliais são sensíveis ao H_2O_2;

d) H_2O_2 reduz a expressão proteica de SPARC e Osteopontina clivada mas aumenta a expressão gênica de MMP-3 em cardiomiócitos;

e) Em fibroblastos cardíacos, H_2O_2 reduz a expressão proteica e gênica de SPARC e reduz a expressão gênica de Osteopontina, além de aumentar a produção e secreção de colágeno;

f) O tratamento com meio condicionado de rASC não melhora a viabilidade de células tratadas com H_2O_2;

g) SPARC e Osteopontina não alteram a viabilidade das células tratadas com peróxido de hidrogênio;

h) MMP-3 reduz a viabilidade das células tratadas com H_2O_2;

i) O tratamento combinado dos três fatores não melhora a viabilidade de células tratadas com peróxido de hidrogênio;

j) SPARC, assim como o meio condicionado, reduz a níveis basais a produção de colágeno em fibroblastos tratados com H_2O_2;

k) Osteopontina não altera a produção e secreção de colágeno

l) SPARC não aumenta a capacidade de formação de tubos de células endoteliais

7. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados mostram que a proteína SPARC reduz a produção de colágeno assim como o meio condicionado, consistente com a ideia de que a SPARC participa, pelo menos em parte, da resposta benéfica associada ao transplante de ASC pós-infarto do miocárdio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Download the detailed data files 2011 [21/04/2012]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html.

2. MS D-MdS. Taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório 2008 [21/04/2012]. Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM]. Available from: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2009/c08.def.

3. Duncan BB, Schmidt MI, Schmitz M, Ott EA. Tendencies in adult mortality in Rio Grande do Sul, Brazil, 1970-1985. An international comparison. Ciencia e cultura. 1992;44(6):362-7.

4. Buja LM, Entman ML. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. Circulation. 1998;98(14):1355-7.

5. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. Circulation research. 1998;82(11):1111-29.

6. Depre C, Vatner SF. Mechanisms of cell survival in myocardial hibernation. Trends in cardiovascular medicine. 2005;15(3):101-10.

7. Tunis SR, Bass EB, Steinberg EP. The use of angioplasty, bypass surgery, and amputation in the management of peripheral vascular disease. The New England journal of medicine. 1991;325(8):556-62.

8. Danoviz ME, Nakamuta JS, Marques FL, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA, et al. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. PloS one. 2010;5(8):e12077.

9. Goncalves GA, Vassallo PF, dos Santos L, Schettert IT, Nakamuta JS, Becker C, et al. Intramyocardial transplantation of fibroblasts expressing vascular endothelial growth factor attenuates cardiac dysfunction. Gene therapy. 2010;17(3):305-14.

10. Haider H, Ye L, Jiang S, Ge R, Law PK, Chua T, et al. Angiomyogenesis for cardiac repair using human myoblasts as carriers of human vascular endothelial growth factor. J Mol Med (Berl). 2004;82(8):539-49.

11. Nakamuta JS, Danoviz ME, Marques FL, dos Santos L, Becker C, Goncalves GA, et al. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. PloS one. 2009;4(6):e6005.

12. Ruixing Y, Dezhai Y, Hai W, Kai H, Xianghong W, Yuming C. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor gene improves cardiac performance and inhibits cardiomyocyte apoptosis. European journal of heart failure. 2007;9(4):343-51.

13. Timmers L, Lim SK, Hoefer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. Stem Cell Res. 2011;6(3):206-14.

14. Brehm M, Zeus T, Strauer BE. Stem cells--clinical application and perspectives. Herz. 2002;27(7):611-20.

15. Zipori D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. Blood cells, molecules & diseases. 2004;33(3):211-5.

16. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular biology of the cell. 2002;13(12):4279-95.

17. Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, Penascino VM, Mooney MP, Jiang S, et al. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. Annals of plastic surgery. 2006;56(5):543-8.

18. Farrell E, Both SK, Odorfer KI, Koevoet W, Kops N, O'Brien FJ, et al. In-vivo generation of bone via endochondral ossification by in-vitro chondrogenic priming of adult human and rat mesenchymal stem cells. BMC musculoskeletal disorders. 2011;12:31.

19. dos Santos L, Santos AA, Goncalves GA, Krieger JE, Tucci PJ. Bone marrow cell therapy prevents infarct expansion and improves border zone remodeling after coronary occlusion in rats. International journal of cardiology. 2010;145(1):34-9.

20. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(7):3213-8.

21. Kudo M, Wang Y, Wani MA, Xu M, Ayub A, Ashraf M. Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart. Journal of molecular and cellular cardiology. 2003;35(9):1113-9.

22. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood. 2001;98(9):2615-25.

23. Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001;938:231-3; discussion 3-5.

24. Dariolli R, Bassaneze V, Nakamuta JS, Omae SV, Campos LC, Krieger JE. Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation. PloS one. 2013;8(7):e67939.

25. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol. 2003;31(10):890-6.

26. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood. 2002;99(10):3838-43.

27. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. J Biomed Sci. 2003;10(2):228-41.

28. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circulation research. 2004;95(1):9-20.

29. Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. J Immunol. 2003;171(7):3426-34.

30. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. J Inflamm (Lond). 2005;2:8.

31. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation. 2003;75(3):389-97.

32. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009;106(33):14022-7.

33. Anversa P, Sussman MA, Bolli R. Molecular genetic advances in cardiovascular medicine: focus on the myocyte. Circulation. 2004;109(23):2832-8.

34. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, et al. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. Cells, tissues, organs. 2004;178(1):2-12.

35. Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology. 2003;272(1):398-402.

36. Blande IS, Bassaneze V, Lavini-Ramos C, Fae KC, Kalil J, Miyakawa AA, et al. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. Transfusion. 2009;49(12):2680-5.

37. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue engineering. 2001;7(2):211-28.

38. Fraser JK, Schreiber RE, Zuk PA, Hedrick MH. Adult stem cell therapy for the heart. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36(4):658-66.

39. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. Cell Physiol Biochem. 2004;14(4-6):311-24.

40. Bagno LL, Werneck-de-Castro JP, Oliveira PF, Cunha-Abreu MS, Rocha NN, Kasai-Brunswick TH, et al. Adipose-derived stromal cell therapy improves cardiac function after coronary occlusion in rats. Cell Transplant. 2012;21(9):1985-96.

41. van Dijk A, Naaijkens BA, Jurgens WJ, Nalliah K, Sairras S, van der Pijl RJ, et al. Reduction of infarct size by intravenous injection of uncultured adipose derived stromal cells in a rat model is dependent on the time point of application. Stem Cell Res. 2011;7(3):219-29.

42. Wang L, Deng J, Tian W, Xiang B, Yang T, Li G, et al. Adipose-derived stem cells are an effective cell candidate for treatment of heart failure: an MR imaging study of rat hearts. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2009;297(3):H1020-31.

43. Chen D, McKearin D. Gene circuitry controlling a stem cell niche. Current biology : CB. 2005;15(2):179-84.

44. Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. Circulation research. 2005;96(2):151-63.

45. Caccia D, Dugo M, Callari M, Bongarzone I. Bioinformatics tools for secretome analysis. Biochimica et biophysica acta. 2013;1834(11):2442-53.

46. Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: insights into the secretome. Biochimica et biophysica acta. 2013;1834(11):2380-4.

47. Girao-Silva T, Bassaneze V, Campos LC, Barauna VG, Dallan LA, Krieger JE, et al. Short-term mechanical stretch fails to differentiate human adipose-derived stem cells into cardiovascular cell phenotypes. Biomedical engineering online. 2014;13:54.

48. Frangogiannis NG. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. Physiological reviews. 2012;92(2):635-88.

49. Bassaneze V, Barauna VG, Lavini-Ramos C, Kalil J, Schettert IT, Miyakawa AA, et al. Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. Stem cells and development. 2010;19(3):371-8.

50. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. Physiological reviews. 2007;87(4):1285-342.

51. Vanhoutte D, Heymans S. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family'. Journal of molecular and cellular cardiology. 2010;48(3):445-53.

52. He A, Jiang Y, Gui C, Sun Y, Li J, Wang JA. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. The Canadian journal of cardiology. 2009;25(6):353-8.

53. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. Circulation. 2003;107(16):2134-9.

54. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. Circulation research. 2001;88(2):167-74.

55. Ivanovic V, Jelkic N, Bikicki M, Petrovic M, Canji T, Srdanovic I. [The significance of coronary collateral circulation in the preservation of myocardial function]. Medicinski pregled. 2007;60(5-6):287-91.

56. Regieli JJ, Jukema JW, Nathoe HM, Zwinderman AH, Ng S, Grobbee DE, et al. Coronary collaterals improve prognosis in patients with ischemic heart disease. International journal of cardiology. 2009;132(2):257-62.

57. Chavez-Munoz C, Hartwell R, Jalili RB, Jafarnejad SM, Lai A, Nabai L, et al. SPARC/SFN interaction, suppresses type I collagen in dermal fibroblasts. Journal of cellular biochemistry. 2012;113(8):2622-32.

58. Harris BS, Zhang Y, Card L, Rivera LB, Brekken RA, Bradshaw AD. SPARC regulates collagen interaction with cardiac fibroblast cell surfaces. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2011;301(3):H841-7.

59. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. Circulation research. 2004;94(5):678-85.

60. Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. Nature medicine. 2005;11(4):367-8.

61. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. Circulation. 2004;109(10):1292-8.

62. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. Circulation research. 2006;98(11):1414-21.

63. Wei X, Du Z, Zhao L, Feng D, Wei G, He Y, et al. IFATS collection: The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats. Stem Cells. 2009;27(2):478-88.

64. Garbern JC, Mummery CL, Lee RT. Model systems for cardiovascular regenerative biology. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(4):a014019.

65. Roy S, Khanna S, Kuhn DE, Rink C, Williams WT, Zweier JL, et al. Transcriptome analysis of the ischemia-reperfused remodeling myocardium: temporal changes in inflammation and extracellular matrix. Physiological genomics. 2006;25(3):364-74.

66. Vandervelde S, van Luyn MJ, Rozenbaum MH, Petersen AH, Tio RA, Harmsen MC. Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. Cardiovascular research. 2007;73(4):783-93.

67. Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Henry JP, Drobecq H, Dubois E, Pottiez G, et al. Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. Journal of proteome research. 2008;7(11):5004-16.

68. Xiang F, Shi Z, Guo X, Qiu Z, Chen X, Huang F, et al. Proteomic analysis of myocardial tissue from the border zone during early stage post-infarct remodelling in rats. European journal of heart failure. 2011;13(3):254-63.

69. Kim HK, Kang SW, Jeong SH, Kim N, Ko JH, Bang H, et al. Identification of potential target genes of cardioprotection against ischemia-reperfusion injury by express sequence tags analysis in rat hearts. Journal of cardiology. 2012;60(2):98-110.

70. Gu HJ, Gao CB, Gong JL, Li XJ, Sun B, Li XN. Comparative proteomic analysis in left ventricular remodeling following myocardial infarction in rats. Biomedical and environmental sciences : BES. 2012;25(1):117-23.

71. Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. The Journal of clinical investigation. 2001;107(9):1049-54.

72. Kupprion C, Motamed K, Sage EH. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. The Journal of biological chemistry. 1998;273(45):29635-40.

73. Tang MJ, Tai IT. A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. The Journal of biological chemistry. 2007;282(47):34457-67.

74. Barry ST, Ludbrook SB, Murrison E, Horgan CM. Analysis of the alpha4beta1 integrin-osteopontin interaction. Experimental cell research. 2000;258(2):342-51.

75. Furger KA, Allan AL, Wilson SM, Hota C, Vantyghem SA, Postenka CO, et al. Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin. Molecular cancer research : MCR. 2003;1(11):810-9.

76. Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, et al. The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. The Journal of biological chemistry. 1999;274(51):36328-34.

77. Teramoto H, Castellone MD, Malek RL, Letwin N, Frank B, Gutkind JS, et al. Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12. Oncogene. 2005;24(3):489-501.

78. Diaz BV, Lenoir MC, Ladoux A, Frelin C, Demarchez M, Michel S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. The Journal of biological chemistry. 2000;275(1):642-50.

79. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. The American journal of pathology. 1996;149(1):293-305.

80. Kim HJ, Lee HJ, Jun JI, Oh Y, Choi SG, Kim H, et al. Intracellular cleavage of osteopontin by caspase-8 modulates hypoxia/reoxygenation cell death through p53. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009;106(36):15326-31.

81. Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). The Biochemical journal. 1991;277 (Pt 1):277-9.

82. Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). The Journal of biological chemistry. 2001;276(30):28261-7.

83. Sage EH, Reed M, Funk SE, Truong T, Steadele M, Puolakkainen P, et al. Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis. The Journal of biological chemistry. 2003;278(39):37849-57.

84. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. The Journal of cell biology. 2005;169(4):681-91.

85. Agocha A, Lee HW, Eghbali-Webb M. Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. Journal of molecular and cellular cardiology. 1997;29(8):2233-44.

86. Mayorga M, Bahi N, Ballester M, Comella JX, Sanchis D. Bcl-2 is a key factor for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death. The Journal of biological chemistry. 2004;279(33):34882-9.

87. Sangeetha M, Pillai MS, Philip L, Lakatta EG, Shivakumar K. NF-kappaB inhibition compromises cardiac fibroblast viability under hypoxia. Experimental cell research. 2011;317(7):899-909.

88. Watson CJ, Collier P, Tea I, Neary R, Watson JA, Robinson C, et al. Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the

development of a myofibroblast-like phenotype. Human molecular genetics. 2014;23(8):2176-88.

89. Li HX, Zhou YF, Zhao X, Jiang B, Yang XJ. GATA-4 protects against hypoxia-induced cardiomyocyte injury: effects on mitochondrial membrane potential. Can J Physiol Pharmacol. 2014;92(8):669-78.

90. Yan X, Xue J, Wu H, Wang S, Liu Y, Zheng S, et al. Ginsenoside-Rb1 Protects Hypoxic- and Ischemic-Damaged Cardiomyocytes by Regulating Expression of miRNAs. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:171306.

91. Zhang L, Gan W, An G. Influence of Tanshinone IIa on heat shock protein 70, Bcl-2 and Bax expression in rats with spinal ischemia/reperfusion injury. Neural Regen Res. 2012;7(36):2882-8.

92. Jie B, Zhang X, Wu X, Xin Y, Liu Y, Guo Y. Neuregulin-1 suppresses cardiomyocyte apoptosis by activating PI3K/Akt and inhibiting mitochondrial permeability transition pore. Molecular and cellular biochemistry. 2012;370(1-2):35-43.

93. Lv G, Shao S, Dong H, Bian X, Yang X, Dong S. MicroRNA-214 protects cardiac myocytes against H2O2-induced injury. Journal of cellular biochemistry. 2014;115(1):93-101.

94. Marshall KD, Edwards MA, Krenz M, Davis JW, Baines CP. Proteomic mapping of proteins released during necrosis and apoptosis from cultured neonatal cardiac myocytes. American journal of physiology Cell physiology. 2014;306(7):C639-47.

95. Mangat R, Singal T, Dhalla NS, Tappia PS. Inhibition of phospholipase C-gamma 1 augments the decrease in cardiomyocyte viability by H2O2. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2006;291(2):H854-60.

96. Lewinska A, Wnuk M, Slota E, Bartosz G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007;34(8):781-6.

97. Philip L, Shivakumar K. cIAP-2 protects cardiac fibroblasts from oxidative damage: an obligate regulatory role for ERK1/2 MAPK and NF-kappaB. Journal of molecular and cellular cardiology. 2013;62:217-26.

98. Park WH. The effects of exogenous H2O2 on cell death, reactive oxygen species and glutathione levels in calf pulmonary artery and human umbilical vein endothelial cells. International journal of molecular medicine. 2013;31(2):471-6.

99. Csordas A, Wick G, Bernhard D. Hydrogen peroxide-mediated necrosis induction in HUVECs is associated with an atypical pattern of caspase-3 cleavage. Experimental cell research. 2006;312(10):1753-64.

100. Dalal S, Zha Q, Daniels CR, Steagall RJ, Joyner WL, Gadeau AP, et al. Osteopontin stimulates apoptosis in adult cardiac myocytes via the involvement of CD44 receptors, mitochondrial death pathway, and endoplasmic reticulum stress. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2014;306(8):H1182-91.

101. Graf K, Do YS, Ashizawa N, Meehan WP, Giachelli CM, Marboe CC, et al. Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. Circulation. 1997;96(9):3063-71.

102. Masson S, Arosio B, Luvara G, Gagliano N, Fiordaliso F, Santambrogio D, et al. Remodelling of cardiac extracellular matrix during beta-adrenergic stimulation: upregulation of SPARC in the myocardium of adult rats. Journal of molecular and cellular cardiology. 1998;30(8):1505-14.

103. Wu RX, Laser M, Han H, Varadarajulu J, Schuh K, Hallhuber M, et al. Fibroblast migration after myocardial infarction is regulated by transient SPARC expression. Journal of molecular medicine. 2006;84(3):241-52.

104. Yamamoto K, Dang QN, Kennedy SP, Osathanondh R, Kelly RA, Lee RT. Induction of tenascin-C in cardiac myocytes by mechanical deformation. Role of reactive oxygen species. The Journal of biological chemistry. 1999;274(31):21840-6.

105. Tseliou E, de Couto G, Terrovitis J, Sun B, Weixin L, Marban L, et al. Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially-injected cardiospheres. PloS one. 2014;9(2):e88590.

106. Ashizawa N, Graf K, Do YS, Nunohiro T, Giachelli CM, Meehan WP, et al. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. The Journal of clinical investigation. 1996;98(10):2218-27.

107. Frippiat C, Chen QM, Zdanov S, Magalhaes JP, Remacle J, Toussaint O. Subcytotoxic H2O2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. The Journal of biological chemistry. 2001;276(4):2531-7.

108. van Nieuwenhoven FA, Hemmings KE, Porter KE, Turner NA. Combined effects of interleukin-1alpha and transforming growth factor-beta1 on modulation of human cardiac fibroblast function. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. 2013;32(7-8):399-406.

109. Bishop E, Theophilus EH, Fearon IM. In vitro and clinical studies examining the expression of osteopontin in cigarette smoke-exposed endothelial cells and cigarette smokers. BMC cardiovascular disorders. 2012;12:75.

110. Mauro A, Buscemi M, Gerbino A. Immunohistochemical and transcriptional expression of matrix metalloproteinases in full-term human umbilical cord and human umbilical vein endothelial cells. Journal of molecular histology. 2010;41(6):367-77.

111. Heo SH, Choi YJ, Ryoo HM, Cho JY. Expression profiling of ETS and MMP factors in VEGF-activated endothelial cells: role of MMP-10 in VEGF-induced angiogenesis. Journal of cellular physiology. 2010;224(3):734-42.

112. Kato Y, Lewalle JM, Baba Y, Tsukuda M, Sakai N, Baba M, et al. Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial cells. Biochemical and biophysical research communications. 2001;287(2):422-6.

113. Clerk A, Kemp TJ, Zoumpoulidou G, Sugden PH. Cardiac myocyte gene expression profiling during H2O2-induced apoptosis. Physiological genomics. 2007;29(2):118-27.

114. Fidelis-de-Oliveira P, Werneck-de-Castro JP, Pinho-Ribeiro V, Shalom BC, Nascimento-Silva JH, Costa e Souza RH, et al. Soluble factors from multipotent mesenchymal stromal cells have antinecrotic effect on cardiomyocytes in vitro and improve cardiac function in infarcted rat hearts. Cell Transplant. 2012;21(5):1011-21.

115. McCurdy SM, Dai Q, Zhang J, Zamilpa R, Ramirez TA, Dayah T, et al. SPARC mediates early extracellular matrix remodeling following myocardial infarction. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2011;301(2):H497-505.

116. Schellings MW, Vanhoutte D, Swinnen M, Cleutjens JP, Debets J, van Leeuwen RE, et al. Absence of SPARC results in increased cardiac rupture and dysfunction after acute myocardial infarction. J Exp Med. 2009;206(1):113-23.

117. Kelly D, Khan S, Cockerill G, Ng LL, Thompson M, Samani NJ, et al. Circulating stromelysin-1 (MMP-3): a novel predictor of LV dysfunction, remodelling and all-cause mortality after acute myocardial infarction. European journal of heart failure. 2008;10(2):133-9.

118. Wang P, Zhou S, Xu L, Lu Y, Yuan X, Zhang H, et al. Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and collagen synthesis in cardiac fibroblasts: blockade by tanshinone IIA. Journal of ethnopharmacology. 2013;145(1):152-61.

119. Iglesias-De La Cruz MC, Ruiz-Torres P, Alcami J, Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Chen S, et al. Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF-beta in human mesangial cells. Kidney Int. 2001;59(1):87-95.

120. Guo JL, Yu Y, Jia YY, Ma YZ, Zhang BY, Liu PQ, et al. Transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) contributes to H2O2-induced cardiac fibrosis via mediating Ca(2+) influx and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activation in cardiac fibroblasts. J Pharmacol Sci. 2014;125(2):184-92.

121. Mao Q, Lin CX, Liang XL, Gao JS, Xu B. Mesenchymal stem cells overexpressing integrin-linked kinase attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. Mol Med Rep. 2013;7(5):1617-23.

122. Mias C, Lairez O, Trouche E, Roncalli J, Calise D, Seguelas MH, et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. Stem Cells. 2009;27(11):2734-43.

123. Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, et al. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. Circulation research. 2001;88(10):1080-7.

124. Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril C, et al. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS Med. 2005;2(9):e251.

125. Chlenski A, Liu S, Guerrero LJ, Yang Q, Tian Y, Salwen HR, et al. SPARC expression is associated with impaired tumor growth, inhibited angiogenesis and changes in the extracellular matrix. Int J Cancer. 2006;118(2):310-6.

126. Gorantla B, Bhoopathi P, Chetty C, Gogineni VR, Sailaja GS, Gondi CS, et al. Notch signaling regulates tumor-induced angiogenesis in SPARC-overexpressed neuroblastoma. Angiogenesis. 2013;16(1):85-100.

127. Zhang JL, Chen GW, Liu YC, Wang PY, Wang X, Wan YL, et al. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) suppresses angiogenesis by down-regulating the expression of VEGF and MMP-7 in gastric cancer. PloS one. 2012;7(9):e44618.

128. Cydzik M, Abdul-Wahid A, Park S, Bourdeau A, Bowden K, Prodeus A, et al. Slow binding kinetics of secreted protein, acidic, rich in cysteine-VEGF interaction limit VEGF activation of VEGF receptor 2 and attenuate angiogenesis. FASEB J. 2015.

9. ANEXOS

9.1. Anexo A. Cópia do parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **13/07/2011, APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **267/11** intitulado: **"SECRETOMA DE CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSO SUBMETIDAS AO ESTIRAMENTO SOB ISQUEMIA IN VITRO: MANIPULAÇÃO DO MICROAMBIENTE PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS COM POTENCIAL PARA ESTIMULAR A REPARAÇÃO CARDÍACA PÓS-ISQUEMIA"** apresentado pela **Comissão Científica do Incor.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: José Eduardo Krieger
Pesquisador (a) Executante: Juliana Sanajotti Nakamuta

CEP-FMUSP, 14 de Julho de 2011.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
15/07/2011

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

9.2. Anexo B. Cópia do parecer de aprovação para adição de subprojeto no processo 267/11 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais.

MEDICINA
USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26/06/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **085/14** intitulado: **"Modulação do reparo cardíaco pós-infarto pela interação proteica entre SPARC, MMP-3 e osteopontina secretadas por células-tronco do tecido adiposo"** que utilizará **50** animais da espécie **rato**. Esse projeto foi aprovado como subprojeto do protocolo nº 267/11 "Secretoma de células-tronco do tecido adiposo submetidas ao estiramento sob isquemia in vitro: manipulação do microambiente para identificação de alvos com potencial para estimular a reparação cardíaca pós-isquemia", com vinculação acadêmica de pós-graduação em Ciências Médicas, sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo Krieger, apresentado pela **Comissão Científica – INCOR.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: José Eduardo Krieger
Pesquisador (a) Executante: Marcus Vinicius Naghetini dos Santo

CEUA-FMUSP, 03 de Julho de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

10. APÊNDICE

10.1. Apêndice A. Cópia da confirmação de submissão do artigo resultante desta dissertação na revista *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.

DEV Elsevier Editorial System for Journal of Molecular and Cellular Cardiology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Anti-fibrotic effect of SPARC protein in cardiac fibroblasts

Article Type: Full length article

Keywords: Stem cells; Adipose tissue; Secretome; SPARC; Collagen; Cell death; Hydrogen peroxide

Corresponding Author: Dr. Jose E Krieger, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Heart Institute/Univ Sao Paulo Sch Med

First Author: Marcus V Santos, MS

Order of Authors: Marcus V Santos, MS; Juliana S Nakamuta, PhD; Elida Neri, PhD; Rafael Dariolli, PhD; Miriam H Fonseca-Alaniz, PhD; Jose E Krieger, MD, PhD

Abstract: Increased tissue collagen and compromised cardiac function characterize incomplete cardiac repair post-myocardial infarction (MI) leading to poor overall outcomes. Cardiac transplantation of adipocyte-derived stem cells (ASC) in rodents decreases tissue collagen and increases neo-angiovasculogenesis preventing cardiac function deterioration, despite lack of robust cardiac regeneration. In the present study, we tested candidate proteins for the underlying pleiotropic beneficial effects associated with ASC transplantation post-MI. We selected SPARC, MMP-3 and Osteopontin using in silico analysis based on their ability to interact from proteins released by mouse ASC subjected to controlled stretch under hypoxia to mimic the MI microenvironment. We examined the role of these candidate proteins to prevent H2O2 induced collagen production, activation of angiogenesis, and cell death in neonatal cardiomyocytes, cardiac fibroblasts and endothelial cells. The pattern of expression of these proteins in the three target cell types was not uniform and altered differently in response to H2O2 exposure. Basal expression of SPARC decreased in cardiac fibroblasts treated with H2O2 while secretion of collagen increased. Interestingly, SPARC treatment prevented H2O2 induced collagen secretion smilarly to exposure with conditioned media, but had no effect on angiognesis. Osteopontin displayed no effect on collagen secretion and the treatment with none of them or conditioned media prevented or ameliorated cells survival in response to hydrogen peroxide. Altogether, the results showed that SPARC protein, similarly to ASC conditioned media treatment, reduces collagen production in cardiac fibroblasts exposed to H2O2. These finding provide evidence that SPARC can be responsible, at least in part, for the decreased cardiac collagen associated with cardiac ASC transplantation post-MI.

Suggested Reviewers: Alberto Crottogini MD
Professor, Favaloro Fundation
acrottogini@favaloro.edu.ar

Apêndice

He is a medical physiologist expert in gene/cell therapy approaches to minimize post-MI lesions.

Marco Harmsen PhD
Professor, Pathology, Univ Groningen
mcharmsen@gmail.com
Pathologist and cell biologist specialized in vascular biology and post-MI lesions.

Opposed Reviewers:

Dear Editor:

Please find our enclosed manuscript entitled " Title: Anti-fibrotic effect of SPARC protein in cardiac fibroblasts." We would be grateful if you would consider our manuscript for publication in JMCC as a research article.

Fibrosis plays important roles in the cardiac repair response post-myocardial infarction. In our study, we found that SPARC protein, secreted by adipose derived stem cells, decreases collagen secretion in neonatal cardiomyocytes exposed to H_2O_2. This question pertains to the fact that cardiac transplantation of adipocyte-derived stem cells (ASC) in rodents decreases tissue collagen and increases neo-angiovasculogenesis preventing cardiac function deterioration, despite lack of robust cardiac regeneration.
In the present study, we tested candidate proteins for the underlying pleiotropic beneficial effects associated with ASC transplantation post-MI. We selected SPARC, MMP-3 and Osteopontin using *in silico* analysis based on their ability to interact from proteins released by mouse ASC subjected to controlled stretch under hypoxia to mimic the MI microenvironment.
The novel observations of this study is that SPARC protein, similarly to ASC conditioned media treatment, reduces collagen production in cardiac fibroblasts exposed to H_2O_2.
These finding provide evidence that SPARC can be responsible, at least in part, for the decreased cardiac collagen associated with cardiac ASC transplantation post-MI. We believe this study will be of general interest to JMCC readers.

This manuscript contains the following items:
Main text (5568 words wo references)
Abstract (257 words)
6 Figures (embedded in the text)
Supplementary Materials (2 figures and legends at the end of main text)

Finally, this manuscript is original, it is not under review process anywhere else, and all authors have approved the final version.

Sincerely yours,

Jose E Krieger, MD PhD
Professor of Genetics & Molecular Cardiology
Heart Institute (InCor)/Univ Sao Paulo Med Sch
krieger@incor.usp.br

Title: Anti-fibrotic effect of SPARC protein in cardiac fibroblasts

Names and filiations: Marcus Vinicius Naghetini dos Santos; Juliana Sanajotti Nakamuta; Rafael Dariolli; Miriam Helena Fonseca-Alaniz; Elida Neri, José Eduardo Krieger

Abbreviations: Santos, M.V.N.; Nakamuta, J.S.; Dariolli, R.; Fonseca-Alaniz, M.H.; Neri, E.; Krieger, J.E.*.

Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology/LIM 13, University of São Paulo, Medical School, Heart Institute (InCor)

***Corresponding author**: Jose E Krieger, MD, PhD: E-mail: krieger@incor.usp.br

Permanent address

Instituto do Coração (InCor) Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Av Dr Enéas Carvalho Aguiar, 44, ZIP: 05403-000. City: São Paulo State: SP. Country: Brazil

Abstract

Increased tissue collagen and compromised cardiac function characterize incomplete cardiac repair post-myocardial infarction (MI) leading to poor overall outcomes. Cardiac transplantation of adipocyte-derived stem cells (ASC) in rodents decreases tissue collagen and increases neo-angiovasculogenesis preventing cardiac function deterioration, despite lack of robust cardiac regeneration. In the present study, we tested candidate proteins for the underlying pleiotropic beneficial effects associated with ASC transplantation post-MI. We selected SPARC, MMP-3 and Osteopontin using *in silico* analysis based on their ability to interact from proteins released by mouse ASC subjected to controlled stretch under hypoxia to mimic the MI microenvironment. We examined the role of these candidate proteins to prevent H_2O_2 induced collagen production, activation of angiogenesis, and cell death in neonatal cardiomyocytes, cardiac fibroblasts and endothelial cells. The pattern of expression of these proteins in the three target cell types was not uniform and altered differently in response to H_2O_2 exposure. Basal expression of SPARC decreased in cardiac fibroblasts treated with H_2O_2 while secretion of collagen increased. Interestingly, SPARC treatment prevented H_2O_2 induced collagen secretion smilarly to exposure with conditioned media, but had no effect on angiognesis. Osteopontin displayed no effect on collagen secretion and the treatment with none of them or conditioned media prevented or ameliorated cells survival in response to hydrogen peroxide.

Altogether, the results showed that SPARC protein, similarly to ASC conditioned media treatment, reduces collagen production in cardiac fibroblasts exposed to H_2O_2. These finding provide evidence that SPARC can be responsible, at least in part, for the decreased cardiac collagen associated with cardiac ASC transplantation post-MI.

Keywords: Stem cells; Adipose tissue; Secretome; SPARC; Collagen; Cell death; Hydrogen peroxide

Introduction

A constellation of processess are trigerred after a myocardium infarction (MI) to halt damage and to repair the cardiac tissue in response to the abrupt decrease in tissue oxygen tension [1, 2] leading to increased stabilization of hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) and p53 and accumulation of reactive oxygen species (ROS), to name a few. The typical cardiac repair response leads to scar tissue formation and neoangiovasculogenesis, but lacks cardiomyocyte regeneration, which may result in long-term cardiac deterioration [3, 4].
Strategies based on transplantation of of adult stem cells have been initially proposed with the idea of reversing this incomplete repair response by triggering cardiac regeneration [5]. Pre-clinical finding indicate that this strategy can minimize cardiac deterioration post-MI despite lack of evidence for robust cardiac regeneration. In this context, adipose tissue-derived stem cells (ASCs), which are abundant, homogeneous, and easy sampled, have been extensively tested preven or reverse cardiac deterioration post-MI [6-11]. Intramyocardial transplantation of ASCs decreases collagen deposition, increases neo-angiovasculogenesis, and preserves ventricular function under hemodynamic stress post-MI in rats [6, 12-15]. Failure to demonstrate robust cardiac regeneration in these studies gave rise to the alternative hypothesis linking the beneficial pleiothorpic anti-fibrotic, pro-angiogenic and anti-apoptotic effects to secretion of bioactive molecules by the transplanted cells.

Recently, we demonstrated that human ASCs produce VEGF when submited to shear stress [16] and secrete an array of cytokines, including pro-angiogenic factors under mechanical deformation (stretch) [17], even in the absence of induction of endotelial and cardiomyocytes cell markers, respectively, or the loss of mesenchymal surface markers [16, 17].

In the present study, we wanted to test candidate proteins released by mouse ASC, subjected to controlled stretch under hypoxia to mimic the MI microenvironment, for their role as underlying the pleiotropic beneficial effects associated with ASC transplantation post-MI. Based on enriched network interactome, we selected SPARC, MMP-3, and Osteopontin as candidate proteins that, individually or in combination, would influence key biological processes associated with the beneficial pleiotropic effects to preserve cardiac function post-MI. The results suggested that SPARC is downregulated in cardiac fibroblasts exposed to H_2O_2 and when added to the cell culture prevents the increase in collagen secretion similar to exposure with conditioned media from ASC.

Materials and Methods

Secretome analyses

We imported protein accession numbers into the web-based integrative software GeneGo MetaCore (v 6.8 build 30387; Thomson Reuters, St. Joseph, MI) for network analysis. We used MetaCore analysis for network enrichment to obtain the major processes (p-value <0.05) and interactome analysis where SPARC, Osteopontin and MMP-3 were selected as candidates.

Cell culture

Cardiomyocyte. Briefly, hearts excised from 1-3-days-old rat were cut into 1.0 mm and digested with Collagenase II (Worthington, USA) and Pancreatin (Sigma-Aldrich) for 15 minutes, repeating 6 times. The heart tissue digests were suspended in DMEM/M199. Fibroblasts were removed by pre-incubation for 45 min at 37 °C. The cardiomyocytes in suspension were collected and seeded in 6-well plate containing DMEM/M199 supplemente with 10% HBS, 5% NBCS, BrdU (Roche, USA) and antibiotics for 72h. After this period, the culture medium was exchanged with DMEM Low/M199 with 1% NBCS. After one hour (starving), the medium was again exchanged, the hydrogen peroxide solution (H_2O_2 30% - Sigma-Aldrich) was added at different concentrations and the cells were incubated for 3, 6 or 12 hours.

Cardiac Fibroblast (CF). Briefly, hearts excised from adult rat were cut and digested with Collagenase II (Worthington, USA) for 15 minutes, repeating 7-8 times. After each period of incubation, the supernatant was recovered and added to 1ml of FBS. This cell suspension was subjected to centrifugation at 1500g for 5 minutes at room temperature. The precipitate obtained in each stage was resuspended in DMEM-High glucose with 10% FBS and then transferred to bottle 75cm2. Cell passage 3-4 were used. Twenty-four hours after being plated, the culture medium was exchanged with DMEM High without serum for 16 hours (starving). After this period, the medium was exchanged and hydrogen peroxide solution was added and the cells were incubated for 6 hours.

Adipose derived stem cells (ASC). Briefly, inguinal fat samples from adult rats were cut and digested with Collagenase 1A (Sigma Aldrich) for 45 minutes. After incubation, the supernatant was recovered and added to 1ml of FBS. This cell suspension was subjected to centrifugation at 1500g for 5 minutes at room temperature. The precipitate obtained was resuspended in DMEM-Low glucose with 10% FBS. Cell passage 2-4 were used. Twenty-four

hours after being plated, the culture medium was exchanged with DMEM Low without serum for 16 hours (starving). After this period, the medium was exchanged again and the cells were incubated for 24 hours. Finally, the medium was collected, centrifuged at 1500rpm for 5 minutes and the supernatant was used for the treatment of the cells.

Endothelial cells. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from Lonza (Walkersville, MD USA) and maintained in endothelial cell-specific growth medium (EGM-2, Lonza, Walkersville, MD USA) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO2. Cell passages 3–8 were used in all experiments. Twenty-four hours after being plated, the culture medium was exchanged for EBM medium without serum and without factors, hydrogen peroxide solution was added at different concentrations and the cells were incubated for 6 hours.

Cell Viability Assay

We assessed cell viability with the MTT assay. Cardiac fibroblast, cardiomyocytes and HUVECs were seeded on a 96-well plate ($2{,}5 \times 10^4$ cells/well). The cells were treated with diferente concentrations of H_2O_2 and cultured at 37 °C for an additional 3 h before the addition of MTT solution (Sigma-Aldrich, stock solution of 5 mg/mL). At the different time points (3 h, 6h and 12h), 20µL of the MTT stock solution (5 mg/mL) was then added into each well to attain a total reaction volume of 220 µL. After incubating for 3 h at 37 °C, the supernatant was removed, formazan crystals were dissolved with 200 µL of DMSO, the plates were gently shaken for 15s and the optical density (OD) of the wells was read at 490 nm on spectrophotometer. Cell survival (CS) was calculated by the following equation: CS= (*mean OD treated wells* / *mean OD control wells*) X 100%.

Collagen Quantification

We used the Sircol kit (Biocolor) for quantitation of soluble collagen. At the end of the experiment, the culture medium was aliquoted and added to the "Sircol Dye Reagent". The tubes were closed, mixed by inversion and placed on shaker for 30 minutes at 4 ° C. After this period, the tubes were centrifuged for 10 minutes at 12,000 rpm and room temperature and the supernatant was discarded. Was added to the "Ice-cold Wash Reagent Acid-Salt", and the tubes were again centrifuged for 10 minutes at 12,000 rpm at room temperature. After discarding the supernatant, was added the "Alkali Reagent" in all tubes. The tubes were closed and mixed using a vortex. Each sample was transferred into a 96 well plate and the absorbance was measured using 555 nm filter.

TUNEL staining

We used the TUNEL staining to assess the extent of apoptotic cell death on cells exposed to H_2O_2. The TUNEL staining was performed using deoxyneucleotidyl transferase (TdT) and FITC-labeled 2′-deoxyuridine 5′-triphosphate (dUTP) from an *in situ* cell death detection kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), as described in manufacturer's instructions.

Tube formation assay

We added Geltrex with low concentration of growth factor (Life Technologies) into each well of a 96 well plate and incubated for 30 minutes at 37 °C for polymerization. HUVECs between the second and fifth passage and with a density of $1.0x10^4$ cells/well were plated in duplicate in EBM medium with 0.5% serum without growth factors. The plates were incubated at 37 °C for 10 hours and photographed with an inverted microscope with 4x objective. The networks were quantified using ImageJ software and Angiogenesis Analyzer plugin. The criteria used were the number of formed tubes, the average area of these tubes and the number of branches.

Preparation of lysates and Western blot analysis

After 6 hours of stimulation with H_2O_2, the cells were washed with cold PBS and lysed in SDS sample buffer (2% SDS, 5% glycerol, 60 mM Tris pH 6.8) followed by heating and centrifugation at 10,000g for 10 min. Protein concentration were using BCA Protein Assay Kit (Pierce Company).

Proteins were solubilized in sample buffer (0.5% SDS, 10% glycerol, 50 mM Tris pH 6.8, 0.05% bromophenol blue) containing 50mM dithiothreitol (DTT). After heating at 90ºC for 5 min, proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked with 5% BSA in TBS and detection was carried out using specific primary antibodies against: Sparc (Abcam, Cambridge, MA) and Caspase-3 (Abcam, Cambridge, MA). Membranes also were probed with a monoclonal GAPDH or βactin specific antibody (Abcam, Cambridge, MA) as an internal control. After incubation with peroxidase conjugated secondary antibodies, bound proteins were detected using enhanced

chemiluminescence (ECL) (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Immunoreative bands were quantified by densitometry using ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for mRNA quantification

*RNA extraction and cDNA synthesis***.** Total RNA was extracted from cardiomyocytes and HUVECs by use of guanidine isothiocyanate-based TRIzol solution, according to the manufacturer's specifications (Invitrogen® Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Samples were quantified spectrophotometrically at 260nm and checked for integrity by GelRed^{TM}-agarose gel electrophoresis. ImProm-II reverse transcriptase (Promega®, Madison, WI, USA) was used to reversely transcribe 2μg of total RNA isolated, using an oligo$(dT)_{10n}$ (0.5μg/μL, Invitrogen® Life Technologies, Grand Island, NY, USA) primer in a total reaction volume of 20μL.

Real-time RT-PCR.

Real-time quantification of the target genes was performed with a SYBR Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) using ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Twenty five nanogram of cDNA was used for PCR amplification in the presence of SYBR green fluorescent dye according to a protocol provided by the manufacturer (PE Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). PCR product generation was monitored by measuring the increase in fluorescence caused by the binding of SYBR green to double stranded DNA at each annealing phase. A dissociation curve was generated at the end of the reaction to verify that a single product was amplified. All samples were assayed in triplicate. The cyclophilin gene were used to normalize the results. The comparative threshold (CT) cycle method was used for data analyses. CT indicates the fractional cycle number at which the amount of amplified target reaches a fixed threshold, and ΔCT is the difference in threshold cycle for target and reference (beta-actin or GAPDH). The levels of gene expression were given by $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Statistical analysis

All data were analyzed using Prism software (GraphPad Softwares Inc., San Diego, USA) and expressed as mean ± SEM (Standard Error of Measurement). Differences among groups were compared by one-way ANOVA test for 3 or more groups, followed by Tukey's post-hoc test, and t-test to compare 2 groups. A p-value < 0.05 was considered significant.

Results

In silico analysis from the secretome of mouse ASC submitted to controlled stretch under hypoxia (Nakamuta et al. unpublished data) suggested that SPARC, Osteopontin and MMP3 interact and may be involved with key biological processes underlying cardiac repair including extracellular matrix remodeling and angiogenesis as shown in Figure 1A and B. We then demonstrated that SPARC, Osteopontin and MMP-3 are indeed expressed in the cardiac target cells. SPARC mRNA levels are relatively high in cardiomyocytes, endothelial cells and cardiac fibroblasts, whereas MMP-3 relative levels showed the opposite profile in all the three cells. Osteopontin mRNA levels expressed predominantly in cardiomyocytes and were less expressed in HUVECs (Figure 1C).

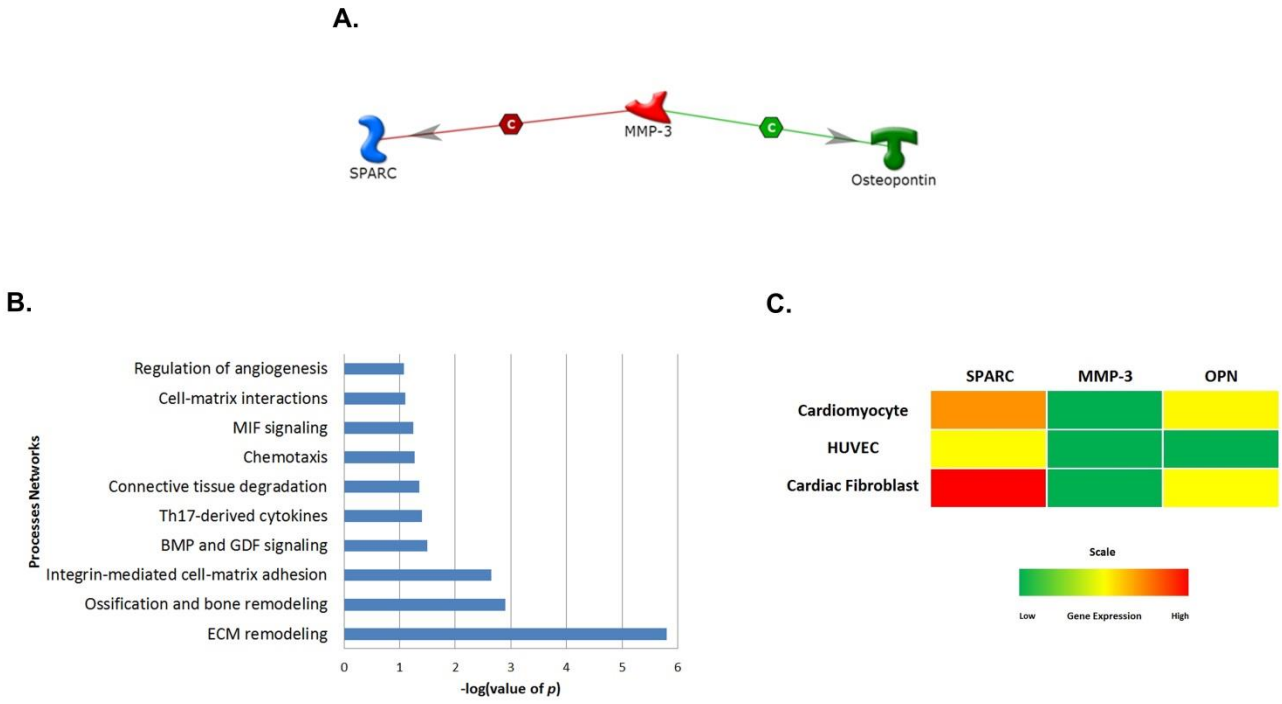


Figure 1: Enrichment and interaction analysis of mouse ASC secretome. (A) The interaction analysis of the factors that are normally secreted revealed the interaction of three proteins. Here, the osteopontin is cleaved and activated by MMP-3, which also cleaves and inactivates SPARC. (B) Enrichment analysis for the three factors showed processes related to cell growth and proliferation, adhesion and cell migration, angiogenesis and immune response. (C) Heatmap of basal gene expression of SPARC, Osteopontin and MMP-3 in the three major cell types that constitute the heart: cardiomyocytes, cardiac fibroblasts and endothelial cells. These data were obtained by calculating $2^{-\Delta CT}$.

SPARC reduces H_2O_2-induced collagen production and release in cardiac fibroblasts

We exposed cardiac fibroblasts to H_2O_2 per one hour and followed the collagen release for a period of five hours after replacing the media with either media supplemented with SPARC or Osteopontin or ASC conditioned medium (CM). H_2O_2-induced collagen release measured in the culture media by Sircol Assay decreased in cardiac fibroblasts treated with SPARC (7.5nM) (Figure 2A). Similarly, ASC conditioned medium exposure; showed significant reduction of H_2O_2-induced secreted collagen nearly reaching basal levels (Figure 2B). Under similar condition, Osteopontin (10nM) failed to reduce H_2O_2-induced collagen release in cardiac fibroblasts (Figure S1).

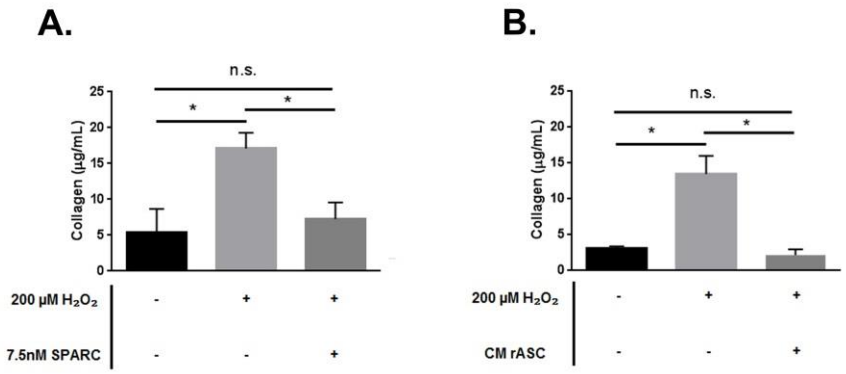


Figure 2: Effect of SPARC treatment on collagen secretion. One hour after treatment with H_2O_2, cardiac fibroblasts were treated with SPARC or conditioned medium (CM) for five hours and was assessed collagen production. (A) Using the treatment with 7,5nM of SPARC, a statistical difference was noted in collagen production compared to cells treated only with H_2O_2. (B) Similar to the results found by the treatment with the SPARC, CM of rASC was able to significantly reduce the secreted levels of collagen, with no difference from untreated cells with H_2O_2-treated cells. (* $p < 0.05$).

SPARC failed to induce angiogenesis in endothelial cells

We used the tube formation assay to verify whether SPARC induces angiogenesis in HUVECs. SPARC (7.5, 15 and 30nM) failed to increase the number of tubes by field, the number of branches, and the average size of the tubes as shown in Figure S2 A, B, and C, respectively.

Considering that hypoxia stress is associated with an accumulation of reactive oxygen species, we then examined the susceptibility of the target cells to caspase-3 mediated cell death and the expression profile of the candidate proteins in response to H_2O_2 exposure.

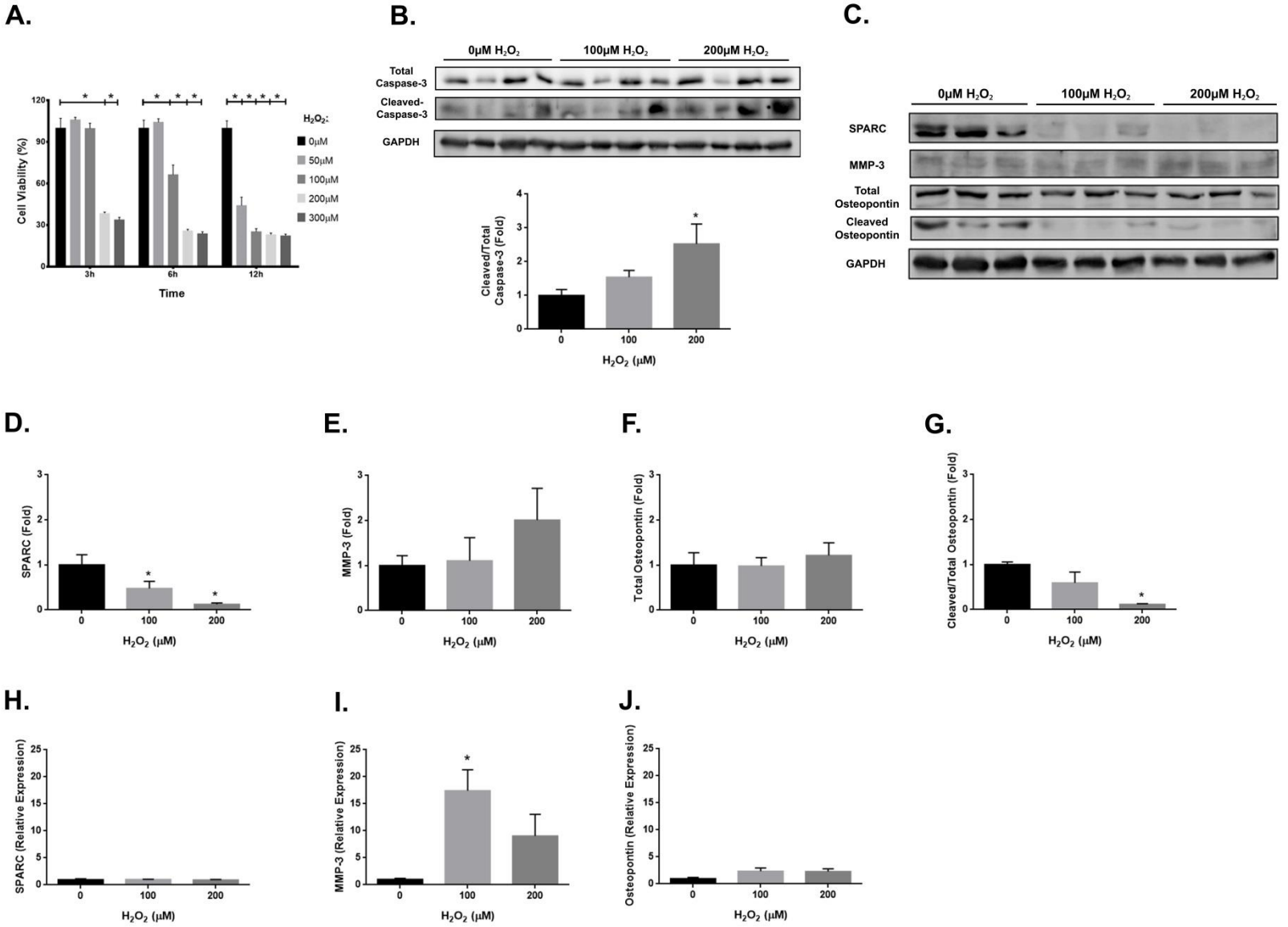
H_2O_2-induced changes in the viability and expression of SPARC, Osteopontin and MMP-3 in cardiomyocytes

The treatment of neonatal rat ventricular cardiomyocytes with increasing concentrations of H_2O_2 up to 12 hours reduced cell viability, measured by MTT, in both concentration- and time-dependent manner (Figure 3A). We demonstrated that H_2O_2 exposure (200 μM per 6 hours) leads to caspase mediated cell death by the cleavage and activation of caspase-3 using Western blot analysis (Figure 3B).

The H_2O_2 induced changes in expression profile of the endogenous candidate proteins in cardiomyocytes are depicted in Figure 3C-J. SPARC protein showed significant decrease in all conditions (approximately 50% and 90% for 100 and 200 μM, respectively, Figure 3D), whereas the mRNA levels remained unchanged (Figure 3H). In contrast, MMP-3 expression levels remained unchanged while the mRNA levels increased in response to H_2O_2 treatment (Figure 3E and I). Total Osteopontin protein and mRNA levels also remained unchanged while the cleaved form of the protein decreased (Figure 3F, G and J, respectively).

Figure 3: Effect of Hydrogen Peroxide on cell viability and on protein and mRNA levels of SPARC, Osteopontin and MMP-3 in cardiomyocytes. (A) Cell viability reduces in response to H_2O_2 exposure. (B) Caspase-3 mediated cell death is increased in cardiomyocytes exposed to H_2O_2. (C-J) Protein and mRNA level changes measured by Western Blot and real time RT-PCR, respectively, are depicted for SPARC, MMP-3 and Osteopontin in cardiomyocytes exposed to H_2O_2. (* $p < 0.05$ vs. 0μM).

Apêndice


A.
B.
C.
D.
E.
F.
G.
H.
I.
J.
Cell Viability (%)
Time
3h
6h
12h
H2O2:
0μM
50μM
100μM
200μM
300μM
0μM H2O2
100μM H2O2
200μM H2O2
Total Caspase-3
Cleaved-Caspase-3
GAPDH
Cleaved/Total Caspase-3 (Fold)
H2O2 (μM)
SPARC
MMP-3
Total Osteopontin
Cleaved Osteopontin
SPARC (Fold)
MMP-3 (Fold)
Total Osteopontin (Fold)
Cleaved/Total Osteopontin (Fold)
SPARC (Relative Expression)
MMP-3 (Relative Expression)
Osteopontin (Relative Expression)

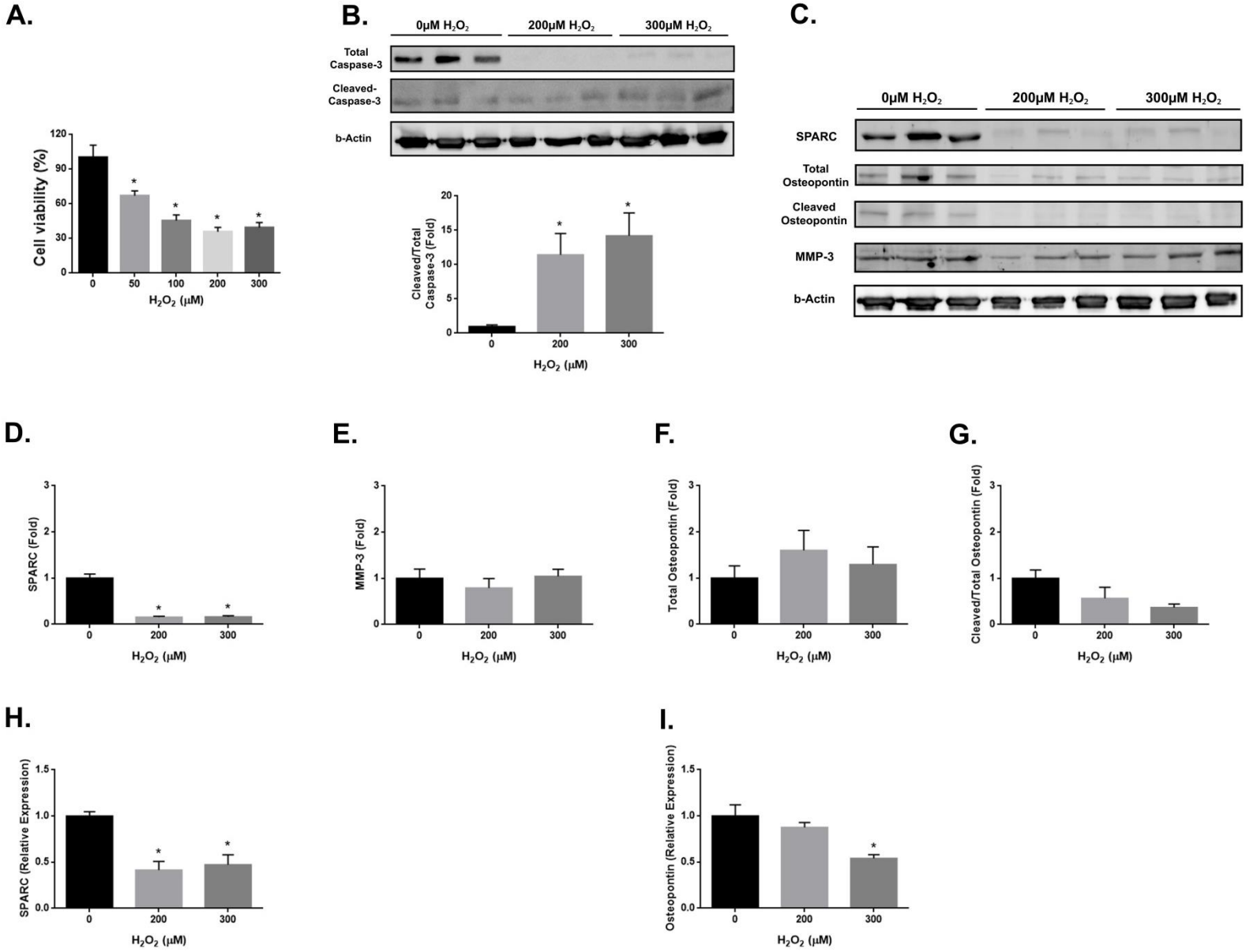
H_2O_2-induced changes in the viability and expression of SPARC, Osteopontin and MMP-3 in cardiac fibroblasts

Cardiac fibroblasts exposed to H_2O_2 (50-300 μM, 6 hours) displayed high susceptibility to cell death of about 40% with the lowest concentrations of 50 μM (Figure 4A). We then evaluated caspased mediated cell death and showed an increase of caspase-3 cleaved over 10-fold in cells treated with both 200 and 300μM of H_2O_2 (Figure 4B).

The H_2O_2 induced changes in expression profile of the endogenous candidate proteins in cardiac fibroblasts are depicted in Figure 4C-I. SPARC protein levels decreased to approximately 80% (Figure 4D), and a similar trend was observed for the mRNA levels (Figure 4H). MMP-3 protein levels remained unchanged (Figure 4E) while the mRNA levels were not detectable (data not shown). Total expression of Osteopontin and its cleaved form also remained unchanged eventhough there was a trend for the latter to decrease similar to the behavior of the OTP mRNA levels (Figures 4F, G, and I, respectively).

Figure 4: Effect of Hydrogen Peroxide on cell viability and on protein and mRNA levels of SPARC, Osteopontin and MMP-3 in cardiac fibroblasts. (A) Cell viability reduces in response to H_2O_2 exposure. (B) Caspase-3 mediated cell death is increased in cardiac fibroblasts exposed to H_2O_2. (C-I) Protein and mRNA level changes measured by Western Blot and real time RT-PCR, respectively, are depicted for SPARC, MMP-3 and Osteopontin in cardiac fibroblasts exposed to H_2O_2. (* $p < 0.05$ vs. 0μM).

Apêndice


A.
Cell viability (%)
120
90
60
30
0
0
50
100
200
300
H2O2 (μM)
B.
0μM H2O2
200μM H2O2
300μM H2O2
Total Caspase-3
Cleaved-Caspase-3
b-Actin
Cleaved/Total Caspase-3 (Fold)
20
15
10
5
0
0
200
300
H2O2 (μM)
C.
0μM H2O2
200μM H2O2
300μM H2O2
SPARC
Total Osteopontin
Cleaved Osteopontin
MMP-3
b-Actin
D.
SPARC (Fold)
3
2
1
0
0
200
300
H2O2 (μM)
E.
MMP-3 (Fold)
3
2
1
0
0
200
300
H2O2 (μM)
F.
Total Osteopontin (Fold)
3
2
1
0
0
200
300
H2O2 (μM)
G.
Cleaved/Total Osteopontin (Fold)
3
2
1
0
0
200
300
H2O2 (μM)
H.
SPARC (Relative Expression)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
200
300
H2O2 (μM)
I.
Osteopontin (Relative Expression)
1.5
1.0
0.5
0.0
0
200
300
H2O2 (μM)

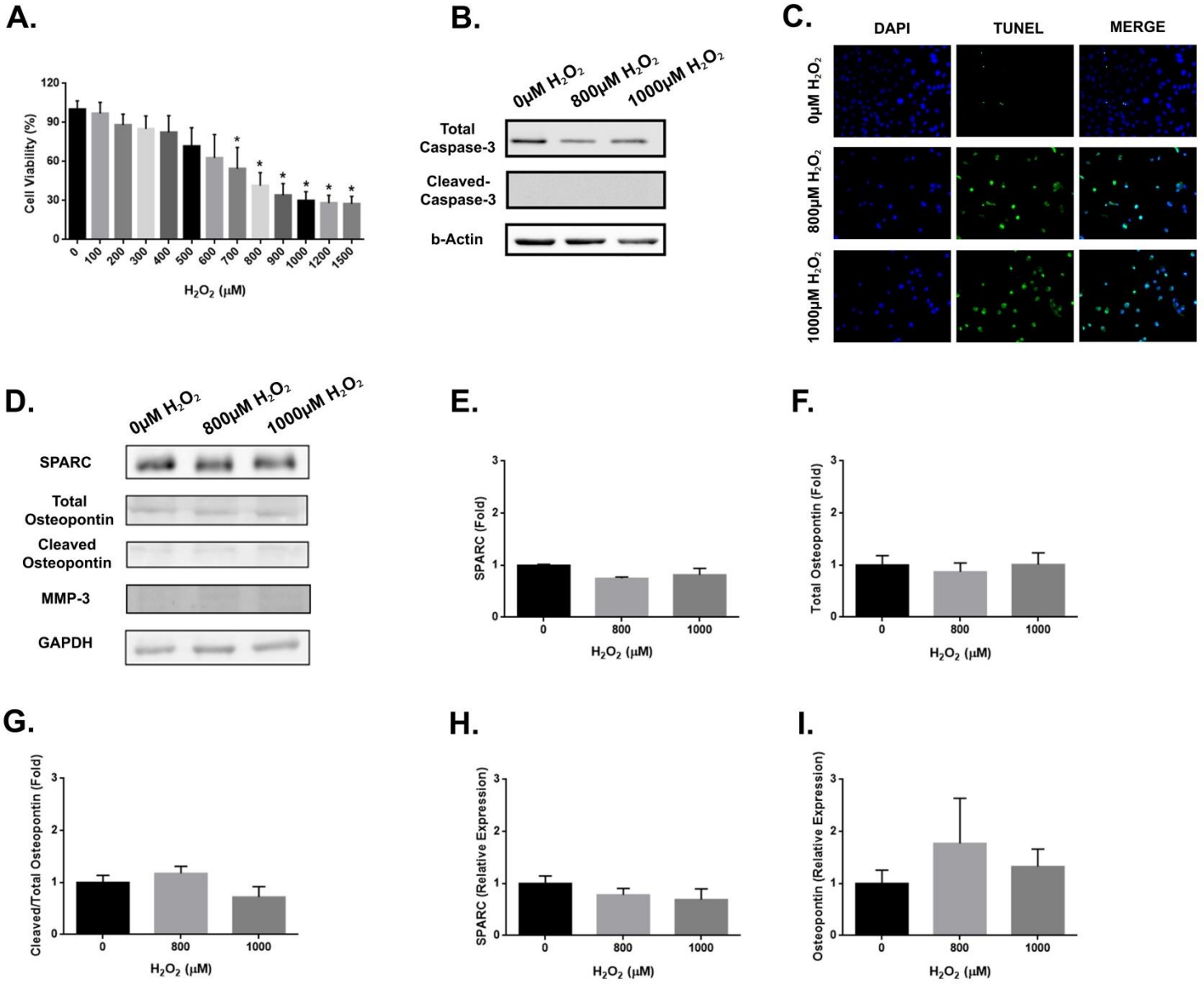
H_2O_2-induced changes in the viability and expression of SPARC, Osteopontin and MMP-3 in endothelial cells

HUVECs were more resistant to H_2O_2-induced cell death than cardiomyocytes and cardiac fibroblasts, as shown above. After 6 hours of treatment only H_2O_2 concentrations over 700 μM decreased cell viability and the response reached a plateau at about 30% with H_2O_2 levels ranging from 900 to 1500μM (Figure 5A). We were unable to show caspase-3 cleavage in response to H_2O_2 (800 and 1000 μM) (Figure 4B), but observed a clear evidence for cell death using the TUNEL assay (Figure 4C).

The endothelial expression of the target proteins and mRNA levels exposed to H_2O_2 are represented in Figure 5D-I. Incontrast to what was observed for cardiomyocytes and cardiac fibroblasts, SPARC protein and mRNA levels, remained unchanged in response to H_2O_2 exposure (Figure 5E and H). Similarly, protein and mRNA levels for both, total and cleaved Osteopontin remained unchanged (Figure 4 F, G, and I, respectively) and the expression of MMP-3 was beyond detectable measurement in endothelial cells.

Figure 5: Effect of Hydrogen Peroxide on cell viability and on protein and mRNA levels of SPARC, Osteopontin and MMP-3 in HUVECs. (A) Cell viability reduces in response to H_2O_2 exposure. (B) Caspase-3 mediated cell death is increased in endothelial cells exposed to H_2O_2. (C-I) Protein and mRNA level changes measured by Western Blot and real time RT-PCR, respectively, are depicted for SPARC, MMP-3 and Osteopontin in endothelial cells exposed to H_2O_2. (* $p < 0.05$ vs. 0μM).

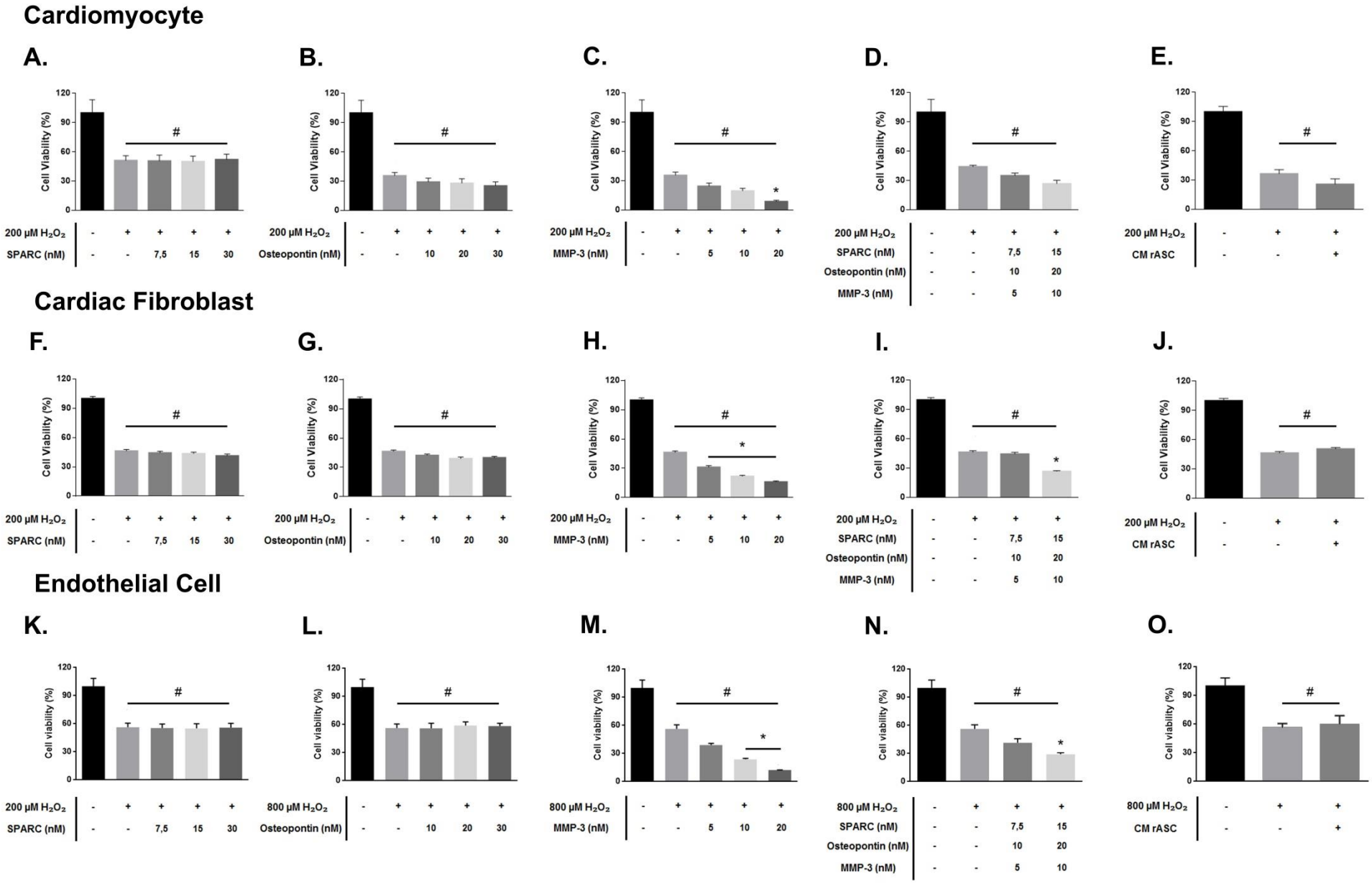
Apêndice


A.
Cell Viability (%)
120
90
60
30
0
0 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1200 1500
H2O2 (μM)
B.
0μM H2O2
800μM H2O2
1000μM H2O2
Total Caspase-3
Cleaved-Caspase-3
b-Actin
C.
DAPI
TUNEL
MERGE
0μM H2O2
800μM H2O2
1000μM H2O2
D.
0μM H2O2
800μM H2O2
1000μM H2O2
SPARC
Total Osteopontin
Cleaved Osteopontin
MMP-3
GAPDH
E.
SPARC (Fold)
0 800 1000
H2O2 (μM)
F.
Total Osteopontin (Fold)
0 800 1000
H2O2 (μM)
G.
Cleaved/Total Osteopontin (Fold)
0 800 1000
H2O2 (μM)
H.
SPARC (Relative Expression)
0 800 1000
H2O2 (μM)
I.
Osteopontin (Relative Expression)
0 800 1000
H2O2 (μM)

SPARC, MMP3 and Osteopontin effects on cell viability in response to H_2O_2

We also assessed the role of SPARC (7.5-30nM), Osteopontin (10-30nM), and MMP-3 (5-20nM), individually or in combination, to improve viability of cardiomyocytes, cardiac fibroblasts and endothelial cells pre-exposed to H_2O_2 (200-800uM) compared to conditioned medium from ASC. The results in Figure 6 showed that none of the candidate proteins individually or in combination was able to prevent the magnitude of cell death in response to H_2O_2 exposure. In some cases, we observed the opposite, an increased cell death, in response to the largest doses of the MMP-3 in cardiomyocytes, cardiac fibroblasts and endothelial cells (Figure 6 C, H, I, M and N respectively). Overall, these results are in agreement with the failure of ASC conditioned medium to prevent cell death in response to H_2O_2 (Figure 6 E, J and O, respectively).

Figure 6: Effect of SPARC, Osteopontin, MMP-3 on cardiomyocytes, cardiac fibroblasts and HUVECs viability in response to H_2O_2 exposure. H_2O_2-induced apoptosis was largely not affected by the candidate proteins given individually or in combination for cardiomyocytes (A-D); cardiac fibroblasts (F-I) and endothelial cells (K-N). Similarly, conditioned media did not improve cell viability after the exposure of H2O2 in the three target cells (E, J and O). (# $p < 0.05$ vs. 0μM; * $p < 0.05$ vs. 200μM).


Cardiomyocyte
A.
B.
C.
D.
E.
Cell Viability (%)
200 μM H2O2
SPARC (nM)
Osteopontin (nM)
MMP-3 (nM)
CM rASC
Cardiac Fibroblast
F.
G.
H.
I.
J.
Endothelial Cell
K.
L.
M.
N.
O.
Cell viability (%)
800 μM H2O2

Discussion

Reduction in inflammation, collagen deposition and apoptosis combined with activation of neoangiovasculogenesis are some of the key processes underlying the beneficial pleiotropic response associated with the transplantation of adult stem cells post-MI. To unvail the identity and mode of action of the secreted proteins acting individually or in combination on the above-mentioned biological processes represents one of the main challenges in the field of cardiac repair to devise new therapeutic approaches. In the present study, we selected the candidate proteins based on both their ability to interact and influence biological processes required to modulate cardiac repair using an *in silico* approach. We then assessed systematically three candidate proteins on their ability to influence secretion of collagen, angiogenesis and cell death using the target cardiac cells. The experimental results provide evidence that SPARC can prevent the H_2O_2-induced secretion of collagen in cardiac fibroblasts. The effect of SPARC was comparable to the exposure of the cardiac fibroblasts to conditioned media from ASC, which presumably contains SPARC and other proteins that individually or in combination display the benefical pleiotropic effects on cardiac repair post-MI.

As expected, we found in the ASC secretome proteins related to cell adhesion, cytoskeleton regulation, response to hypoxia and oxidative stress, development, remodeling of bone, cartilage, and proteolysis. We then used GeneGo MetaCore software to select SPARC, Osteopontin and MMP-3 based on their ability to interact. The enriched processes related with the three proteins include chemotaxis, regulation of angiogenesis, inflammation, proteolysis and bone remodeling, which are all potential candidates to influence cardiac repair.

SPARC is a counter-adhesive and anti-proliferative matrix glycoprotein with affinity for calcium, vitronectin, nidogen, collagen I and thrombospondin. It regulates cell-matrix interaction and also cellular function, thereby contributing to the organization of the extracellular matrix. SPARC binds to VEGF [18], thereby preventing it from binding to VEGFR and can increase the activation of caspase-8 [19]. Osteopontin is also a glycoprotein with cell adhesion function, when binds to integrin [20-22] and chemotaxis when it interacts with the CD44 receptor [23]. This protein influences the expression of VEGF [24, 25] and is cleaved by caspase-8 [26]. MMP-3 is a zinc-dependent protease known for degrading the extracellular matrix. This metalloprotease presents a broad of substrate specificity, such as fibronectin, laminin, elastin, collagens and proteoglycans [27]. Through analysis by the MetaCore, we showed thatMMP-3 can cleave Osteopontin, as observed to thrombin [28], and SPARC [29].

We chose hydrogen peroxide (H_2O_2) as a stimulus because it is a potent signaling molecule. In normal myocardium some antioxidants act to sequester H_2O_2 avoiding deleterious effects related to oxidative stress. Large amounts of this molecule similar to ROS accumulation

can produce apoptosis and cardiac fibrosis, which are known to aid in the progression of heart failure. Furthermore, H_2O_2 stimulates the production of cardiac proinflammatory cytokines in activated fibroblasts and these cytokines change the production of collagen deposited in the extracellular matrix and around the injured myocardium to replace apoptotic cardiomyocytes, thereby impairing cardiac function [30].

Our results showed that H_2O_2 exposure resulted in robust secretion of collagen by crdiac fibroblasts and apoptosis in the three target cardiac cells. According Wang et al. [31], this is due to the fact that treatment with hydrogen peroxide induces an increase in time-dependent expression of the subunits of NAD(P)H oxidase (p47phox, and Nox2 Nox4). Collagen production is reversed by knock-down of any of these three subunits. In fact, Iglesias-De La Cruz et al. [32] demonstrated that treatment of human mesangial cells with glucose oxidase, an enzyme which continuously produces H_2O_2, increases gene expression of collagen type I, III and IV.

Fibroblasts treated with the CM of rat ASC, showed significant reduction in collagen secretion. In fact, other studies show decrease in collagen gene expression in cardiac fibroblasts and reduction of scar size in infarcted animals and treated with CM [33, 34]. Our data showed a significant reduction in collagen secretion in SPARC treated cardiac fibroblasts consistent with the findings using CM *in vitro* or *in vivo*. The role of SPARC is also corroborated by Harris et al. [35] that subjected SPARC knock-out cardiac fibroblasts to a SPARC treatment demonstrating a significant reduction in expression of collagen I. The authors also showed that knock-out fibroblasts to SPARC had higher expression of collagen type I and V.

Treatment with 10nM of Osteopontin did not result in significant reduction of collagen secretion in fibroblasts treated with H_2O_2. Interestingly,Trueblood et al. [36] found in Osteopontin knockout mice no difference in infarct size compared to wild-type animals, but both the gene and protein expression of type I collagen were significantly reduced in infarcted knock-out animals. In a different cell type, Pardo et al. [37] showed that treatment of human lung fibroblasts with Osteopontin increases the gene expression of collagen type I. It is important to emphasize that fibroblasts are from different species and origins and the fact that detection o collagen by Sircol assay in the present study detects not only type I but also type II, III, V and XI collagen.

The failure of SPARC to influence the tube formation assay (number of tubes, number of branches and average area of the tubes) may reflect the context dependence of its actions. Chlenski et al. [38] demonstrated that treatment with bFGF and four different concentrations of SPARC did not change the density of the formed vessels and size, compared to control treated only with bFGF. More recently, Cydzik et al. [39] demonstrated that endothelial cells treated with VEGF exhibit an increase in cell adhesion, migration, proliferation and vessel formation,

and that all of these effects were reversed by co-treatment with SPARC. The authors reported that SPARC binds to VEGF and forms a stable complex, not allowing VEGF from binding to the receptor and activate their intracellular effectors. Moreover, SPARC treatment alone did not produce any of the above-mentioned effects [39].

The effects of the candidate proteins, individually or in combination, on improving cell viability in response do hydrogen peroxide failed to occur in all three target cells, cardiomyocytes, cardiac fibroblasts and HUVECs. These finding is in agreement with data from Fidelis-de Oliveira et al. [40] that showed no reduction in cardiomyocyte hypoxia-induced apoptosis exposed to conditioned medium from bone marrow derived MSCs.

Interestingly, McCurdy et al. [41] showed that knock-out animals for SPARC present lower diastolic and systolic volumes, and a higher ejection fraction, compared to wild-type animals. Controversely, Schellings et al.[42] showed that SPARC knock-out animals have higher mortality for cardiac rupture than wild-type animals after myocardial infarction. The authors also showed that animals that over-expressing SPARC have an improvement of cardiac function preventing bad remodeling of cardiac chambers after MI.

The use of three different concentrations of Osteopontin had no statistical effect on the treated cells. Nevertheless, Dalal et al. [43] showed that treatment of rat adult cardiomyocytes with 20nM of Osteopontin increased cell death, even though in low level (control: 4.8%; treated: 12.8%). The author showed that animals genetically modified to over-express Osteopontin only in cardiomyocytes presented an increase in the number of TUNEL-positive cells and also reduction of left ventricular fractional shortening.

Unlike the previous factors discussed, MMP-3 induced a decrease in the viability of treated cells. This partly can be due to an artifact of the experiment. MMP-3 is a matrix metalloproteinase which degrades matrixes. After the treatment a significant amount of non-adherent cells could be observed and these cells could not be detected by MTT assay. Still, this factor is associated with ventricular dysfunction and poor prognosis after myocardial infarction [44]. There is a decrease in the viability of fibroblasts and endothelial cells with intermediate concentration of three factors combination therapy. This is probably due to a lack of cell adhesion by MMP-3 cleavege action.

By analyzing the Osteopontin protein expression in cardiomyocytes, no change was observed in total protein content, but a significant decrease of cleaved protein in cells treated with the highest concentration of H_2O_2. The gene expression had no significant increase in treated cells. After found a reduction of cleaved Osteopontin expression in cells treated with H_2O_2, we hypothesized that this protein would be secreted into the extracellular medium. Interestingly, Dalal et al. [43] found Osteopontin in the lysate or in the culture media of adult cardiomyocyte, partially against our results. This can be explained by the absence of this protein

in the adult rat heart, but not in heart of newborns [45]. The SPARC expression was found in both adult cardiomyocytes and in neonates [46-48]. SPARC detection by Western blot revealed the same pattern for the obtained cleaved Osteopontin. However, gene expression was unchanged. MMP-3 has low protein expression, both in healthy cardiac tissue as in myocardial infarction [49]. Cells treated with H_2O_2 showed no significant difference in protein expression of MMP-3.

Ashizawa et al. [50] was the first to demonstrate the Osteopontin expression in cardiac fibroblasts, in both adults and neonates, and its regulation by angiotensin II, showing the complex relationship between these factors and the effects on the synthesis DNA and gel contraction. Both protein and gene expression of SPARC presents significant reduction in cells treated with H_2O_2. Contrary to our results, Frippiat et al. [51] demonstrated that treatment of human diploid fibroblasts with H_2O_2 increases the SPARC expression. The protein expression of MMP-3 did not change with treatment with hydrogen peroxide and their gene expression was undetectable. Indeed, van Nieuwenhoven et al. [52] showed that the gene expression of this factor in human cardiac fibroblasts is extremely low and the presence of this metalloprotein in the culture medium was about 50pg/ml after 24 hours of cultivation.

HUVECs treated with H_2O_2 were much more resistant than the cardiomyocytes and cardiac fibrolasts.Only concentrations over 700 μM were effective to impact cell viability [53-55]. According to Park et al. [53], this resistance is not shared by all types of endothelial cells. By analyzing the apoptosis induced by H_2O_2 during 24 hours in HUVECs and calf pulmonary artery endothelial cells (CPAEC), the author found that to induce 50% of death in CPAEC, a concentration of 50 μM was needed, whereas for induce 28% of death in HUVEC, a 6 times higher dose was required. Interestingly, H_2O_2 increases levels of superoxide anion in HUVEC but decreases in CPAEC. HUVEC is probably more resistant to this treatment due to the amount of antioxidants enzymes present in the same. Interestingly, it was not possible to detect the portion of cleaved caspase-3 in HUVECs treated with H_2O_2. According Csordas et al. [56], this is due to the fact that HUVECs treated with high concentrations of hydrogen peroxide have energy depletion, thus inhibiting the cleavage of caspase in this specific site, but may suffer a non-canonical cleavage.

Both the gene and protein expression of Osteopontin, as even being found in other work using HUVEC [57], showed no change with treatment of H_2O_2. The gene and protein expression of MMP-3 was not detected, although the protein had been found by other authors [58, 59]. SPARC is normally expressed on HUVEC [60], but the H_2O_2 treatment did not alter the protein and gene expression of this factor. Interestingly, Kato et al. [60] demonstrated that treatment of endothelial cells with VEGF enhances expression of SPARC, and this effect can be reversed by an inhibitor of p38.

In view of the change of the factors in cardiomyocytes and fibroblasts, but not in HUVECs, two hypotheses can be possible: (i) hydrogen peroxide induces cleavage and degradation of these factors in those cells, however, as with the caspase-3 in HUVECs, high H_2O_2 concentrations can deplete the energy of the endothelial cell, thus preventing the cleavage of these proteins; (ii) oxidative stress caused by treatment with H_2O_2 activates intracellular signaling pathways that it will influence in gene and protein expression of these factors differently in each cell type. In fact, the latter is evidenced by Clerk et al. [61], who found different levels of expression of different genes in cardiomyocytes treated with 0.2 and 0,04mM H_2O_2 per 2, 4 and 24 hours.

Altogether, the results showed that SPARC protein, similarly to ASC conditioned media treatment, reduces collagen production in cardiac fibroblasts exposed to H_2O_2. These finding provide evidence that SPARC can be responsible, at least in part, for the decreased cardiac collagen observed in the cardiac tissue transplanted with ASC post-MI.

References

1. Buja, L.M. and M.L. Entman, *Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease.* Circulation, 1998. **98**(14): p. 1355-7.
2. Haunstetter, A. and S. Izumo, *Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease.* Circ Res, 1998. **82**(11): p. 1111-29.
3. Goswami, S.K. and D.K. Das, *Oxygen Sensing, Cardiac Ischemia, HIF-1alpha and Some Emerging Concepts.* Curr Cardiol Rev, 2010. **6**(4): p. 265-73.
4. Sermeus, A. and C. Michiels, *Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways.* Cell Death Dis, 2011. **2**: p. e164.
5. Mummery, C.L., R.P. Davis, and J.E. Krieger, *Challenges in using stem cells for cardiac repair.* Sci Transl Med, 2010. **2**(27): p. 27ps17.
6. Danoviz, M.E., et al., *Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention.* PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12077.
7. Mazo, M., et al., *Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction.* Eur J Heart Fail, 2008. **10**(5): p. 454-62.
8. Miyahara, Y., et al., *Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction.* Nat Med, 2006. **12**(4): p. 459-65.
9. Schenke-Layland, K., et al., *Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction.* J Surg Res, 2009. **153**(2): p. 217-23.
10. Valina, C., et al., *Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction.* Eur Heart J, 2007. **28**(21): p. 2667-77.
11. Wang, L., et al., *Adipose-derived stem cells are an effective cell candidate for treatment of heart failure: an MR imaging study of rat hearts.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(3): p. H1020-31.
12. dos Santos, L., et al., *Bone marrow cell therapy prevents infarct expansion and improves border zone remodeling after coronary occlusion in rats.* Int J Cardiol, 2010. **145**(1): p. 34-9.
13. Nakamuta, J.S., et al., *Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold.* PLoS One, 2009. **4**(6): p. e6005.
14. Wollert, K.C. and H. Drexler, *Clinical applications of stem cells for the heart.* Circ Res, 2005. **96**(2): p. 151-63.
15. Chen, D. and D. McKearin, *Gene circuitry controlling a stem cell niche.* Curr Biol, 2005. **15**(2): p. 179-84.
16. Bassaneze, V., et al., *Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells.* Stem Cells Dev, 2010. **19**(3): p. 371-8.
17. Girao-Silva, T., et al., *Short-term mechanical stretch fails to differentiate human adipose-derived stem cells into cardiovascular cell phenotypes.* Biomed Eng Online, 2014. **13**: p. 54.
18. Kupprion, C., K. Motamed, and E.H. Sage, *SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29635-40.
19. Tang, M.J. and I.T. Tai, *A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers.* J Biol Chem, 2007. **282**(47): p. 34457-67.
20. Furger, K.A., et al., *Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin.* Mol Cancer Res, 2003. **1**(11): p. 810-9.

21. Yokosaki, Y., et al., *The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin.* J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36328-34.
22. Barry, S.T., et al., *Analysis of the alpha4beta1 integrin-osteopontin interaction.* Exp Cell Res, 2000. **258**(2): p. 342-51.
23. Teramoto, H., et al., *Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12.* Oncogene, 2005. **24**(3): p. 489-501.
24. Diaz, B.V., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids.* J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 642-50.
25. Senger, D.R., et al., *Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin.* Am J Pathol, 1996. **149**(1): p. 293-305.
26. Kim, H.J., et al., *Intracellular cleavage of osteopontin by caspase-8 modulates hypoxia/reoxygenation cell death through p53.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(36): p. 15326-31.
27. Murphy, G., et al., *Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP).* Biochem J, 1991. **277 (Pt 1)**: p. 277-9.
28. Agnihotri, R., et al., *Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin).* J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28261-7.
29. Sage, E.H., et al., *Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis.* J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37849-57.
30. Pendergrass, K.D., et al., *Temporal effects of catalase overexpression on healing after myocardial infarction.* Circ Heart Fail, 2011. **4**(1): p. 98-106.
31. Wang, P., et al., *Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and collagen synthesis in cardiac fibroblasts: blockade by tanshinone IIA.* J Ethnopharmacol, 2013. **145**(1): p. 152-61.
32. Iglesias-De La Cruz, M.C., et al., *Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF-beta in human mesangial cells.* Kidney Int, 2001. **59**(1): p. 87-95.
33. Mias, C., et al., *Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction.* Stem Cells, 2009. **27**(11): p. 2734-43.
34. Mao, Q., et al., *Mesenchymal stem cells overexpressing integrin-linked kinase attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions.* Mol Med Rep, 2013. **7**(5): p. 1617-23.
35. Harris, B.S., et al., *SPARC regulates collagen interaction with cardiac fibroblast cell surfaces.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(3): p. H841-7.
36. Trueblood, N.A., et al., *Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin.* Circ Res, 2001. **88**(10): p. 1080-7.
37. Pardo, A., et al., *Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis.* PLoS Med, 2005. **2**(9): p. e251.
38. Chlenski, A., et al., *SPARC expression is associated with impaired tumor growth, inhibited angiogenesis and changes in the extracellular matrix.* Int J Cancer, 2006. **118**(2): p. 310-6.
39. Cydzik, M., et al., *Slow binding kinetics of secreted protein, acidic, rich in cysteine-VEGF interaction limit VEGF activation of VEGF receptor 2 and attenuate angiogenesis.* FASEB J, 2015.

40. Fidelis-de-Oliveira, P., et al., *Soluble factors from multipotent mesenchymal stromal cells have antinecrotic effect on cardiomyocytes in vitro and improve cardiac function in infarcted rat hearts.* Cell Transplant, 2012. **21**(5): p. 1011-21.
41. McCurdy, S.M., et al., *SPARC mediates early extracellular matrix remodeling following myocardial infarction.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(2): p. H497-505.
42. Schellings, M.W., et al., *Absence of SPARC results in increased cardiac rupture and dysfunction after acute myocardial infarction.* J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 113-23.
43. Dalal, S., et al., *Osteopontin stimulates apoptosis in adult cardiac myocytes via the involvement of CD44 receptors, mitochondrial death pathway, and endoplasmic reticulum stress.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **306**(8): p. H1182-91.
44. Kelly, D., et al., *Circulating stromelysin-1 (MMP-3): a novel predictor of LV dysfunction, remodelling and all-cause mortality after acute myocardial infarction.* Eur J Heart Fail, 2008. **10**(2): p. 133-9.
45. Graf, K., et al., *Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy.* Circulation, 1997. **96**(9): p. 3063-71.
46. Masson, S., et al., *Remodelling of cardiac extracellular matrix during beta-adrenergic stimulation: upregulation of SPARC in the myocardium of adult rats.* J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(8): p. 1505-14.
47. Wu, R.X., et al., *Fibroblast migration after myocardial infarction is regulated by transient SPARC expression.* J Mol Med (Berl), 2006. **84**(3): p. 241-52.
48. Yamamoto, K., et al., *Induction of tenascin-C in cardiac myocytes by mechanical deformation. Role of reactive oxygen species.* J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21840-6.
49. Tseliou, E., et al., *Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially-injected cardiospheres.* PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88590.
50. Ashizawa, N., et al., *Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction.* J Clin Invest, 1996. **98**(10): p. 2218-27.
51. Frippiat, C., et al., *Subcytotoxic H2O2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts.* J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2531-7.
52. van Nieuwenhoven, F.A., et al., *Combined effects of interleukin-1alpha and transforming growth factor-beta1 on modulation of human cardiac fibroblast function.* Matrix Biol, 2013. **32**(7-8): p. 399-406.
53. Park, W.H., *The effects of exogenous H2O2 on cell death, reactive oxygen species and glutathione levels in calf pulmonary artery and human umbilical vein endothelial cells.* Int J Mol Med, 2013. **31**(2): p. 471-6.
54. Waxman, A.B., et al., *Interleukin-11 and interleukin-6 protect cultured human endothelial cells from H2O2-induced cell death.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(4): p. 513-22.
55. Wen, Y.D., et al., *Hydrogen sulfide protects HUVECs against hydrogen peroxide induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress.* PLoS One, 2013. **8**(2): p. e53147.
56. Csordas, A., G. Wick, and D. Bernhard, *Hydrogen peroxide-mediated necrosis induction in HUVECs is associated with an atypical pattern of caspase-3 cleavage.* Exp Cell Res, 2006. **312**(10): p. 1753-64.
57. Bishop, E., E.H. Theophilus, and I.M. Fearon, *In vitro and clinical studies examining the expression of osteopontin in cigarette smoke-exposed endothelial cells and cigarette smokers.* BMC Cardiovasc Disord, 2012. **12**: p. 75.

58. Heo, S.H., et al., *Expression profiling of ETS and MMP factors in VEGF-activated endothelial cells: role of MMP-10 in VEGF-induced angiogenesis.* J Cell Physiol, 2010. **224**(3): p. 734-42.
59. Mauro, A., M. Buscemi, and A. Gerbino, *Immunohistochemical and transcriptional expression of matrix metalloproteinases in full-term human umbilical cord and human umbilical vein endothelial cells.* J Mol Histol, 2010. **41**(6): p. 367-77.
60. Kato, Y., et al., *Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(2): p. 422-6.
61. Clerk, A., et al., *Cardiac myocyte gene expression profiling during H2O2-induced apoptosis.* Physiol Genomics, 2007. **29**(2): p. 118-27.

Supplementary Figures

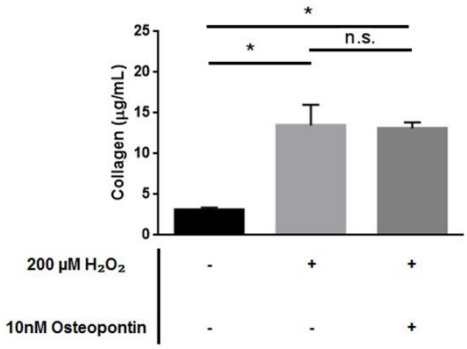


Figure S1: Analysis of collagen production in cardiac fibroblasts treated with Osteopontin. One hour after treatment with H_2O_2, cardiac fibroblasts were treated for five hours and was assessed collagen production. However, the concentration of 10nM of Osteopontin was not able to reduce the secretion of collagen. ($p < 0.05$).

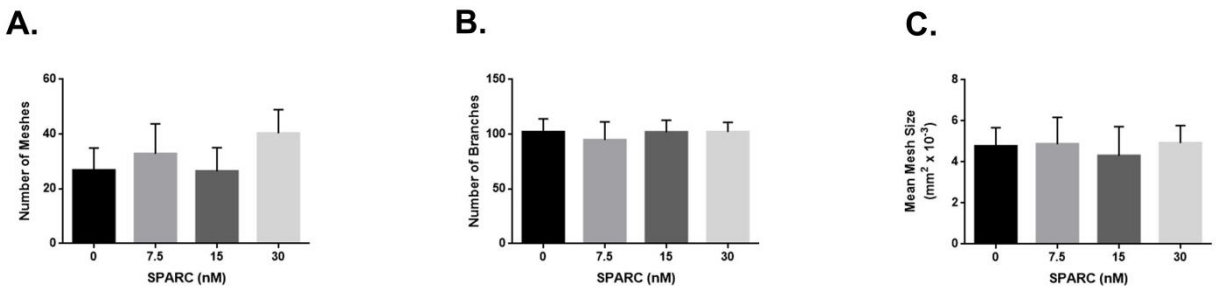


Figure S2: Effect of SPARC treatment on the tube formation assay with HUVECs. The cells were plated on a layer of Geltrex and after 10 hours were photographed. Treatment with any of the three concentrations of SPARC was able to increase the number of tubes (A), number of branches (B) or the average area of the tubes (C) ($P > 0.05$ vs. 0nM)