

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Bruna Andrade Aguiar Koga

Effect of recombinant human peptide growth factors (PDGF-BB and/or VEGF165) at mesenchymal stem cells secretoma and in a wound healing animal model

Regenerative Medicine aims to achieve treatments that accelerate the different stages of the healing process in both humans and animals, and the manipulation of the growth factor (GF) composition can improve or modify the repair and remodeling process of injured tissues, as well as providing more aesthetic and functional scars. The present study aimed to evaluate the effect of recombinant human platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and/or endothelial vascular growth factor (VEGF165) on adipose (canine) and bone marrow (equine) mesenchymal stem cells and their secretome, as well as in a model of skin healing in nude rats. GF were obtained from purified media by heparin affinity chromatography and characterized by ELISA and Western blot, and were used in vehicle buffer or in 2% alginate hydrogel. Mesenchymal stem cells were obtained, characterized, cultured and treated with GF and exosomes were isolated from conditioned media. The animal model of wound healing was established in Rowett nude rats, where 3µg/mL of GF were applied alone or combined in wounds on the animals' backs, and after 7 days the healing evolution was evaluated macroscopically and histopathologically. The present study demonstrated for the first time the potential of rhPDGF-BB and/or rhVEGF165 supplementation in the healing of skin wounds in seven days, stimulating angiogenesis, fibroblast reaction and re-epithelialization, but a long-term evaluation is necessary. The 2% alginate hydrogel proved to be the best approach to be used as a vehicle for GF applications *in vivo* in relation to the vehicle buffer, but not *in vitro* assays. The treatment with both factors combined improved the therapeutic profile of adipose mesenchymal stem cells by stimulating cell migration and exosome secretion. The study demonstrated for the first time that treatment with rhVEGF165 stimulated cell proliferation, angiogenic profile and secretion of exosomes by equine bone marrow mesenchymal stem cells. Together, the data support future investigations into the effect of GF supplementation *in vitro*, on cellular and molecular content of

the mesenchymal stem cell secretome and *in vivo*, in a safe and reproducible model, opening a new perspective for a cell-free therapeutic approach for wound healing.

Keywords: Wound healing. PDGF-BB. VEGF. Mesenchymal stem cells. Exosomes.

Efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes (PDGF-BB e/ou VEGF165) no secretoma de células-tronco mesenquimais e em modelo animal de cicatrização de pele

A Medicina Regenerativa visa alcançar tratamentos que acelerem as diferentes fases do processo de cicatrização em humanos e animais e a manipulação da composição dos fatores de crescimento (FC) pode melhorar ou modificar o processo de reparo e remodelação dos tecidos lesados, bem como proporcionar cicatrizes mais estéticas e funcionais. O presente estudo objetivou avaliar o efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes humanos derivado de plaquetas (PDGF-BB) e/ou de crescimento endotelial e/ou vascular (VEGF165) em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (canino) e de medula óssea (equino) e seu secretoma, e em modelo de cicatrização de pele em ratos nude Rowett. Os FC foram obtidos a partir de meios purificados por cromatografia de afinidade a heparina e caracterizados por ELISA e *Western blot*, e foram utilizados em tampão como veículo ou em hidrogel de alginato 2%. As células foram obtidas, caracterizadas, cultivadas e tratadas com FC e o meio condicionado foi utilizado para isolamento de exossomos. O modelo animal de cicatrização de feridas foi estabelecido em ratos nude Rowett, onde foram aplicados 3µg/mL de FC sozinhos ou combinados em feridas no dorso dos animais, e após 7 dias a evolução da cicatrização foi avaliada macroscópica e histopatologicamente. O presente estudo demonstrou pela primeira vez o potencial da suplementação de rhPDGF-BB e/ou rhVEGF165 na cicatrização de feridas cutâneas em sete dias, estimulando angiogênese, reação de fibroblastos e reepitelização. O hidrogel de alginato 2% mostrou ser a melhor abordagem para ser usada como veículo para aplicações de FC *in vivo* em relação ao tampão veículo, mas não em ensaios *in vitro*. O tratamento com ambos os fatores combinados melhorou o perfil terapêutico de células-

tronco mesenquimais de tecido adiposo estimulando a migração celular e a secreção de exossomos. O estudo demonstrou pela primeira vez que o tratamento com rhVEGF165 estimulou proliferação celular, o perfil angiogênico e a secreção de exossomos por células-tronco mesenquimais de medula óssea equina. Juntos os dados embasam futuras investigações sobre efeito da suplementação com FC *in vitro*, no conteúdo celular e molecular do secretoma de células-tronco mesenquimais, e *in vivo* em um modelo seguro e reprodutível, abrindo uma nova perspectiva para abordagem terapêutica livre de células para cicatrização de feridas.

Palavras-chave: Cicatrização de feridas. PDGF-BB. VEGF. Células-tronco mesenquimais. Exossomos.