

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO EM BIOTECNOLOGIA
EFEITO DE DEXAMETASONA E AZATIOPRINA NO SECRETOMA, CICLO
CELULAR E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

FERNANDA OTESBELGUE PINTO

Porto Alegre, 2015

FERNANDA OTESBELGUE PINTO

EFEITO DE DEXAMETASONA E AZATIOPRINA NO SECRETOMA, CICLO
CELULAR E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Trabalho apresentado como um dos requisitos
para a obtenção do grau de bacharel Em
Biotecnologia, ênfase em Biologia Molecular.

Orientadora : Ana Helena da Rosa Paz

Co-orientadora: Karina Mariante Monteiro

Comissão Examinadora:

Dr. Pedro Chagastelles

Faculdade de Farmácia – UFRGS

Dra. Aline Teichmann

Departamento de Biologia Celular e Molecular-
UFRGS

Profa. Dra. Ana Helena da Rosa Paz

Departamento de Ciências Morfológicas –
UFRGS

Porto Alegre, 2015

Este trabalho foi realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Laboratório Nacional de Biociência (LNBio), Campinas, SP e no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de cursar Biotecnologia, usufruindo de uma formação e ensino de excelência. Aos professores pela dedicação e ensino de qualidade proporcionados durante o período de graduação.

À minha orientadora Ana Helena da Rosa Paz, por quem tenho profunda admiração e amizade. Desde minha entrada no grupo de pesquisa se mostrou uma orientadora presente e atenciosa, me deixando surpresa com o olhar cuidadoso que tinha sobre cada aluno, conhecendo bem as peculiaridades e qualidades de cada um. Agradeço pela oportunidade de realizar este projeto, e pela sincera preocupação, orientação e dedicação. À minha co-orientadora Karina Mariante Monteiro pela confiança e oportunidade na realização deste trabalho.

Às minhas colegas Natália Schneider e Fabiany da Costa Gonçalves, que me treinaram com paciência e carinho, sempre tirando minhas dúvidas e me preparando para a vida científica. Não pouparam esforços para me ajudar e me deram todo apoio e incentivo que precisei. Admiro muito vocês, muito obrigada! Aos colegas, Patrícia Lopez, Eduardo Chiel, Débora Constantino, Nayê Balzan Schneider e Delva Leão pela ajuda, apoio, ensinamentos e amizade. Aos colegas do Centro de Pesquisa Experimental, principalmente ao Everaldo de Almeida e à Flavinha Giusti, sempre dispostos a auxiliar seus colegas, muito obrigada!

À minha família e ao meu namorado Wilson que estiveram sempre presentes. Agradeço pelo incentivo, torcida, compreensão nos momentos de ausência, amor e carinho.

Aos amigos, que se encarregaram de fazer esta caminhada mais leve e alegre, oferecendo seu apoio e amizade.

Aos demais, que de alguma forma contribuíram com este trabalho, deixo minha gratidão.

Às agências de fomento CAPES e CNPq.

“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Células-tronco Mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells* - MSCs) são uma alternativa terapêutica para doenças inflamatórias intestinais, devido às suas propriedades imunomodulatórias. Acredita-se que as MSCs respondam ao microambiente inflamatório produzindo fatores solúveis, que agem inibindo a inflamação e atuam na reparação tecidual. As MSCs são capazes de migrar a sítios de lesão por um processo conhecido como *homing*, o qual é mediado pelas quimiocinas secretadas por células inflamatórias, as quais interagem com receptores presentes nas MSCs. Dessa forma, alterações no microambiente das MSCs podem modificar este processo e, conseqüentemente, seu efeito terapêutico. Os tratamentos atualmente utilizados para desordens imunes incluem glicocorticoides e imunossupressores, como Dexametasona (DEX) e Azatioprina (AZA). Em combinação com a terapia celular, AZA ou DEX poderiam alterar características das MSCs importantes para a terapia celular. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das drogas AZA e DEX no ciclo celular, capacidade migratória e secretoma de MSCs. O ciclo celular das MSCs cultivadas com DEX ou AZA foi avaliado através de citometria de fluxo. O comportamento migratório foi analisado por um ensaio *transwell* com o quimioatratador SDF-1 e as proteínas presentes no secretoma das MSCs foram avaliadas por espectrometria de massas. Os resultados demonstraram que AZA e DEX não promoveram alterações no ciclo celular das MSCs, porém alteraram seu comportamento migratório. As MSCs do grupo AZA migraram mais em direção ao SDF-1 ($P < 0,05$), enquanto as células cultivadas com DEX tiveram sua migração diminuída ($P < 0,05$). A análise do secretoma do grupo AZA não demonstrou resultados relevantes. Ao contrário das células cultivadas com DEX, que apresentaram em seu secretoma proteínas que podem auxiliar no entendimento do comportamento migratório observado.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) represent a therapeutic alternative for the treatment of inflammatory bowel diseases, because of their immunomodulatory properties. It is believed that these cells respond to the inflammatory microenvironment, producing soluble factors that may act inhibiting inflammation, and facilitating tissue repair. MSCs are able to reach the injury site through a migratory process known as cell homing, in response to chemoattractants secreted by inflammatory cells that interact with MSCs receptors. Thereby, alterations in the MSCs microenvironment could modify this process and their therapeutic effect. Conventional treatments for immune disorders include glucocorticoids and immunosuppressive drugs, such Dexamethasone (DEX) and Azathioprine (AZA), which in combination with cell therapy could alter some of MSCs characteristics. The aim of this study is to evaluate the effect of AZA and DEX in MSCs cell cycle, migratory behavior and secretome. MSCs were cultivated with AZA or DEX and cell cycle was analyzed through flow cytometry. MSC migratory behavior was analyzed towards a transwell assay with the SDF-1 chemoattractant and proteins present in secretome by mass spectrometry. Our results demonstrated that MSCs cell cycle was no affected, but their migratory behavior was altered. MSCs cultivated with AZA presented more migratory cells than control group ($P<0.05$), while cells cultivated with DEX had a decrease in the migratory cell number ($P<0.05$). In the MSCs secretome, AZA group demonstrated no relevant results. However, DEX showed important differences from control group that can help in the understanding of observed migratory behavior changes.

LISTA DE ABREVIATÓES

MSCs - Células-tronco Mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells*)

DEX - Dexametasona

AZA - Azatioprina

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

SFB - Soro Fetal Bovino

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

PBS - Solução Salina Fosfatada (*Phosphate Buffered Saline*)

H&E - Coloração hematoxilina e eosina

PGE₂ - Prostaglandina E2

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador Beta (*Transforming growth factor beta*)

HGF - Fator de Crescimento do Hepatócito (*Hepatocyte growth factor*)

IDO - Indoleamina 2,3-Dioxigenase

NO - Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)

NK - Células NK (*Natural killer*)

MHC II - Complexo de Histocompatibilidade de Classe II (*Major histocompatibility complex class II*)

RCU - Retocolite Ulcerativa

DIIs - Doenças Inflamatórias Intestinais

DC - Doença de Crohn

IFN- γ - Fator de Necrose Tumoral Gamma (*Interferon Gamma*)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa (*Tumoral Necrose Fator*)

DSS - Dextran Sulfato de Sódio

STAT5 - *Signal Transducer and Activator of Transcription-5*

Th - Células T auxiliares

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos (*antigen-presenting cells*)

CD4+ - Linfócito T auxiliar

TLR - Receptor *Toll-like*

NF κ B- Factor Nuclear kappa B

MSCs-CM - Meio Condicionado de Células-Tronco Mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells Conditioned Media*)

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas em Tandem (Liquid chromatography - Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)

MS - Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

MS/MS - Espectrometria de Massas em Tandem (Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)

pH - Potencial Hidrogeniônico

DTT - Ditioneitol

ESI - Ionização por *Eletrospray* (*Electrospray Ionization*)

KDa - Quilodalton (s)

TGM-2 - *Protein-Glutamine Gamma-Glutamyltransferase 2*

TGFBI - *Transforming Growth Factor-Beta-Induced Protein ig-h3*

HSPA8 - *Heat Shock Cognata 71KDa*

FAK - *Focal Adhesion Kinase*

6-MP - *6-Mercaptopurina*

TRAIL - *Fator de Necrose Tumoral Relacionado ao Ligante Indutor de Apoptose (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand)*

TNFRS7 - *Membro 7 da Superfamília de Receptores do Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 7)*

MEK - *Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (Mitogen-activated protein Kinase)*

Bcl-xL - *Linfoma de Células B Extra Grande (B cell lymphoma-extra large)*

ERM - *Ezrina-Radixina-Moesina (Ezrin-Radixin-Moesin)*

NSAF - *Normalized Spectral Abundance Factor*

SNK - *Student-Newman-Keuls*

SDF-1- *Fator 1 Derivado do Estroma (Stromal Derived Factor-1)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inflamação <i>versus</i> homeostase intestinal.....	15
Figura 2. Propriedades imunomodulatórias das MSCs.....	19
Figura 3. Migração celular.....	21
Figura 4. Caracterização de MSCs quanto à morfologia e diferenciação celular.....	30
Figura 5. Imunofenotipagem das MSCs.....	31
Figura 6. Comportamento migratório das MSCs.....	32
Figura 7. Ciclo celular das MSCs.....	33
Figura 8. Diagrama de Venn das proteínas identificadas no secretoma das MSCs.....	35
Figura 9. Diagrama esquemático das proteínas secretadas na presença ou ausência de DEX.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais.....	15
1.2 Tratamento medicamentoso das Doenças Inflamatórias Intestinais.....	16
1.3 Células-tronco Mesenquimais.....	17
1.4 Propriedades das Células-tronco Mesenquimais.....	18
1.5 Ciclo celular e migração das MSCs.....	20
1.6 Secretoma das MSCs.....	21
1.7 Células-tronco Mesenquimais e Doenças Inflamatórias Intestinais.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Isolamento e cultura de MSCs.....	25
4.2 Caracterização das MSCs.....	25
4.2.1 Imunofenotipagem.....	25
4.2.2 Diferenciação Celular.....	26
4.3 Cultivo das MSCs com as drogas AZA DEX.....	26
4.4 Análise de migração por <i>transwell</i>	27
4.5 Análise do ciclo celular.....	27
4.6 Espectrometria de massas.....	28
4.7 Análise quantitativa e de bioinformática.....	28
4.8 Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Isolamento e caracterização de MSCs.....	30
5.2 Comportamento migratório.....	31
5.3 Ciclo celular.....	32
5.4 Secretoma de MSCs cultivadas com AZA ou DEX.....	34
5.4.1 Identificação de proteínas.....	34

5.4.2 Análise das proteínas secretadas.....	35
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO.....	45
8. PERSPECTIVAS.....	46
9. REFERÊNCIAS.....	47
10. APÊNDICE.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise do ciclo celular das MSCs.....	33
Tabela 2. Análise das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos DEX e controle.....	36
Tabela 3. Anotação funcional das proteínas diferencialmente expressas nos grupos DEX e controle.....	57
Tabela 4. Proteínas identificadas no secretoma dos grupos DEX e controle.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs), tais como a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) são caracterizadas por inflamações crônicas e recorrentes do trato gastrointestinal de etiologia desconhecida. A RCU se restringe ao cólon e ao reto, apresentando infiltrado linfocitário, inflamação na mucosa e superficial na submucosa; enquanto a DC pode afetar qualquer parte do tubo digestivo, sendo caracterizada por um processo inflamatório transmural de aspecto granulomatoso com úlceras. Os principais sintomas das DIIs são perda de peso, diarreia e dores abdominais (Ordas I, *et al.* 2012; Podolsky DK, *et al.* 1991; Baumgart DC, *et al.* 2012). Estudos têm demonstrado o papel das respostas TH1 e TH2 em ambas as doenças, incluindo TH17, mais recentemente (Fuss IJ, *et al.* 2008; Feng T, *et al.* 2011). O aumento do número de células T efetoras e a deficiência de T células regulatórias, assim como o desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias estão relacionados ao início e progressão de ambas as DIIs (Figura 3) (Martínez-Montiel, *et al.* 2014; Múzes G, Molnár B, Tulassay Z, *et al.* 2012; Múzes G, Molnár B, *et al.* 2012).

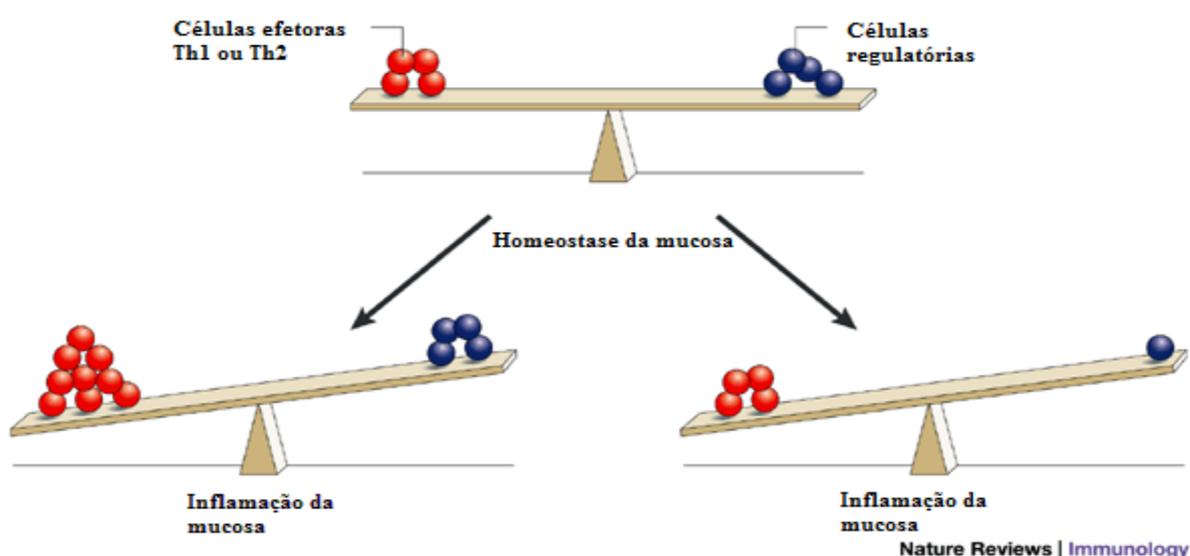


Figura 1. Inflamação versus homeostase intestinal. DIIs são caracterizadas pelo desequilíbrio entre células T efetoras e células T regulatórias. Um aumento anormal

no número de células T efectoras, bem como a redução de células T regulatórias está relacionado à progressão da inflamação intestinal (Adaptado de Bouma, G, *et al.* 2003).

Altas incidências de RCU e DC são relatadas no norte da Europa, no Reino Unido e na América do Norte (Ng SC, *et al.* 2013). Atualmente, a incidência anual de DC é mais alta na América do Norte (20,2 para cada 100.000 habitantes), enquanto que a incidência anual da RCU é maior na Europa (24,3 a cada 100.000 pessoas). Nesse sentido, a prevalência das DIIs tem aumentado nos últimos 50 anos, sendo mais alta na Europa (505 para UC e 322 para DC a cada 100.000 habitantes). O Brasil se encontra no grupo de baixa incidência da doença, semelhante à encontrada em outros países da América latina, porém essa classificação pode estar equivocada devido à falta de dados e registros da frequência de DIIs (Burisch J, *et al.* 2013; Ponder A, *et al.* 2013; Ng SC, *et al.* 2013).

Embora a exata causa das DIIs permaneça desconhecida, as condições parecem estar relacionadas a combinações de fatores genéticos, poluição, microbiota gastrointestinal, entre outros que desencadeiam um processo inflamatório multissistêmico (Alex P, *et al.* 2009; Baumgart DC, *et al.* 2012; Ordas I, *et al.* 2012; Podolsky DK, *et al.* 1991; Wallace KL, *et al.* 2014; Sobczak M, *et al.* 2014; Philpott D J, *et al.* 2014).

1.2 Tratamento Medicamentoso das Doenças Inflamatórias Intestinais

O tratamento medicamentoso das DIIs avançou na última década com a introdução de terapias biológicas, otimização das antigas terapias e melhor entendimento da patogênese da doença no que se refere à genética e sistema imune intestinal (Pithadia AB, *et al.* 2011). Os tratamentos atualmente disponíveis para as DIIs consistem, principalmente, de aminosalicilatos, corticosteroides e imunossupressores, além de anticorpos monoclonais anti-TNF- α , mais recentemente, visando induzir e manter a remissão da doença com a melhora dos efeitos colaterais (Pithadia AB, *et al.* 2011; Baumgart D C, *et al.* 2012; Ordas I, *et al.* 2012).

Entre as drogas utilizadas estão o imunossupressor azatioprina (AZA) e o corticosteroide dexametasona (DEX). A AZA é uma droga análoga do nucleotídeo purina, pertencente ao grupo das tiopurinas. É um antimetabólito que prejudica a biosíntese de purinas e inibe a proliferação celular. AZA é convertida para mercaptopurina, que é posteriormente metabolizado para 6-tioguanina (6-MP), que é o seu metabólito ativo (Pithadia AB, *et al.* 2011). Resulta em diminuição da inflamação através da apoptose de linfócitos T ativados, e o aumento de 6-TGN que bloqueia a expressão de TRAIL, TNFRS7 e α 4-integrina (Thomas C W, *et al.* 2005; Sahasranaman S, *et al.* 2008). Além disso, a inibição da ativação de Rac1 em células T, que tem como alvo os genes MEK, NFkB e bcl-xL, levando à apoptose celular também foi demonstrada (Tiede I, *et al.* 2003). Porém demora de algumas semanas a três meses para que os pacientes alcancem a remissão. Esta é uma droga que é geralmente utilizada a longo prazo (Pithadia AB, *et al.* 2011).

A DEX apresenta efeitos anti-inflamatório e imunossupressor, entretanto, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado. (Wang X, *et al.* 2008). Um dos efeitos conhecidos para os glicocorticoides, como a Dexametasona, é a inibição de NFkB, através da indução da expressão de I κ B. (Rhen T, *et al.* 2005; Wang X, *et al.* 2008). Os glicocorticoides são amplamente utilizados em pacientes com RCU, podendo promover a remissão em 90% destes (Schreiber S, *et al.* 1998). Este tratamento é utilizado para pacientes classificados como portadores de atividade moderada a grave da doença, porém não é indicado o uso a longo prazo devido aos efeitos colaterais (Pithadia AB, *et al.* 2011).

1.3 Células-tronco Mesenquimais

Células-tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells* - MSCs) são células multipotentes que apresentam grande plasticidade e podem secretar uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, os quais possuem atividades parácrinas e autócrinas (Yi T, *et al.* 2012; Lee J W, *et al.* 2011). As MSCs foram identificadas pela primeira vez em 1960 por Ernest A. McCulloch e James E. Till e têm se mostrado como uma promissora alternativa terapêutica nas áreas de medicina regenerativa, doenças inflamatórias e doenças autoimunes (De Miguel MP, *et al.* 2012; Le Blanc

K, *et al.* 2008; Martínez-Montiel MeP, *et al.* 2014; Flores AI, *et al.* 2015; Sensebé L, *et al.* 2010; Li N, *et al.* 2014; Wang D, *et al.* 2015; Yaochite JN; Collino F, *et al.* 2015).

As MSCs podem ser isoladas de diversos tecidos, como medula óssea, tecido adiposo, tecido muscular e órgãos feto-maternos. A placenta tem demonstrado alguns benefícios quando comparada a outras fontes de MSCs (Hass R, *et al.* 2011; Indumathi S, *et al.* 2013; da Silva Meirelles L, *et al.* 2006), como melhor taxa de proliferação (Barlow, S *et al.* 2008), aumento das propriedades imunossupressoras (Li X, *et al.* 2014; Zhu Y, *et al.* 2014) e uma ótima capacidade de migração *in vitro* (Li G, *et al.* 2011) e *in vivo* (Kholodenko I V, *et al.* 2012).

As MSCs apresentam capacidade de proliferação e autorrenovação, permitindo seu cultivo *in vitro*. Além disso, quando cultivadas em meios específicos, podem ser diferenciadas em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Aggarwal S, *et al.* 2005). As MSCs são conhecidas pela modulação das células do sistema imune, bem como pelo processo chamado de *homing*, em que as células migram a sítios de lesão, auxiliando no reparo tecidual (De Miguel MP, *et al.* 2012; Aggarwal S, *et al.* 2005; Nauta AJ, *et al.* 2007).

1.4 Propriedades das Células-tronco Mesenquimais

As MSCs apresentam capacidade imunossupressora mediada, principalmente, pelo secretoma das MSCs. (Ghannam AS, *et al.* 2010; Rüster B, *et al.* 2006; De Miguel MP, *et al.* 2012; Aggarwal S, *et al.* 2005; Nauta AJ, *et al.* 2007). Entre os fatores secretados estão as prostaglandinas (PGE₂), as interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), o fator de crescimento transformador beta (TGF-β), fator de crescimento do hepatócito (HGF), a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e óxido nítrico (NO) (Yi T, *et al.* 2012). Em associação, esses fatores podem inibir a proliferação e função de células do sistema imune, incluindo linfócitos T e B, e células NK; modular a atividade de células dendríticas e induzir células T regulatórias *in vitro* e *in vivo*. As MSCs bloqueiam a proliferação de linfócitos T (auxiliares e citotóxicos) através da inibição da divisão celular e indução de apoptose, além de suprimir a secreção de

citocinas pró-inflamatórias (Figura 1) (Di Nicola M, *et al.* 2002; Aggarwa S, *et al.* 2005; Nauta AJ, *et al.* 2007; Shi M).

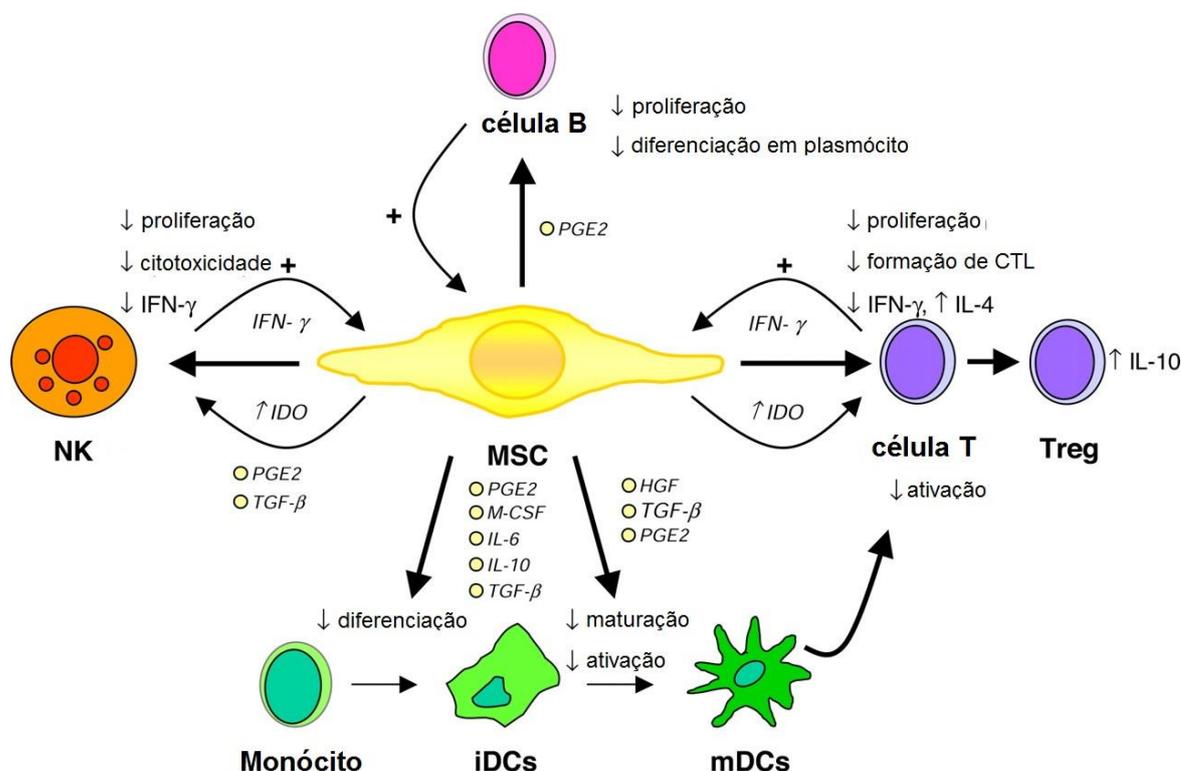


Figura 2. Propriedades imunomodulatórias das MSCs. Os fatores secretados pelas MSCs inibem a diferenciação de monócitos em células dendríticas, a proliferação dos linfócitos T e B, a lise mediada por linfócitos T citotóxicos e o potencial citotóxico das células NK. Além disso, induzem a proliferação de células T regulatórias e a apoptose dos linfócitos T e neutrófilos. HGF, Fator de Crescimento de Hepatócito; CTL, Célula T Citotóxica; IDO, indoleamina 2,3-Dioxigenase; PGE2, Prostaglandina E2; e TGF-β, Fator transformador de crescimento β (Adaptado de Nauta AJ, *et al.* 2007).

O privilégio imunológico das MSCs se deve à ausência de expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) e de moléculas co-estimulatórias, como B7-1, B7-2, CD40 e CD40 ligante. Dessa maneira, as MSCs não podem atuar como células apresentadoras de antígenos e, assim, falham em

ativar o sistema imunológico do hospedeiro, apresentando baixa imunogenicidade (Shi M).

1.5 Ciclo celular e migração das MSCs

A terapia celular com MSCs prevê a expansão das células após o seu isolamento para posterior utilização nos pacientes. O uso das MSCs depende da sua capacidade de proliferação, sendo necessário atingir um número mínimo de células para a eficiência do tratamento (Bernardo M E, *et al.* 2012). Dessa maneira, alterações no ciclo celular e, conseqüentemente na proliferação das MSCs poderiam prejudicar a efetividade da terapia celular.

As MSCs apresentam capacidade de migração a sítios de lesão tecidual, processo conhecido como *homing*, mediado por quimiotaxia. A ativação das MSCs promove aumento da migração das células, podendo influenciar na eficiência do efeito terapêutico (Fu X, *et al.* 2009). A interação de quimiocinas com os receptores presentes na membrana plasmática das MSCs sinaliza sua migração até o local da inflamação. Um dos receptores mais estudados é o CXCR4, responsável pela quimioatração ao SDF-1 (*stromal derived factor-1*) (Sohni A, *et al.* 2013), promovendo o movimento das MSCs em direção ao gradiente do quimioatrator, onde estas auxiliam na reparação tecidual pela secreção de fatores anti-apoptóticos e angiogênicos (Baghaban Eslaminejad M, *et al.* 2014). A migração celular depende de vários aspectos como polarização morfológica, extensão da membrana, formação de adesão célula-substrato, força contrátil e tração, e soltura das adesões (Figura 2). Diferentes quantidades de certos componentes celulares como receptores de adesão, proteínas de ligação ao citoesqueleto e ligantes de matriz celular podem modificar o processo de migração (Lauffenburger D A, *et al.* 1996), alterando, dessa forma, a eficiência da terapia com MSCs.

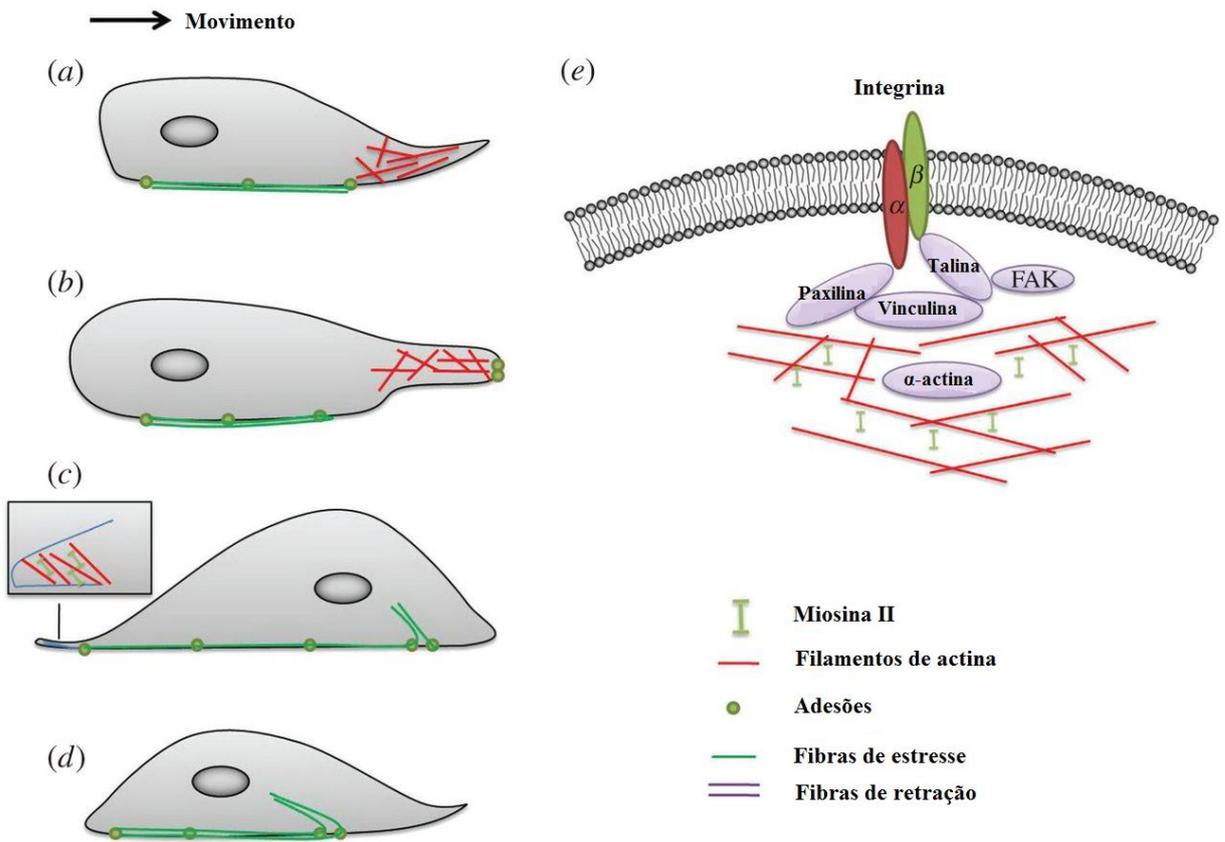


Figura 3. Migração celular. (A) Polarização e polimerização dos filamentos de actina, formando protusões na célula. (B) Adesões são formadas sob o lamelipodio devido às ligações entre as integrinas e a matriz celular. (C) O núcleo e o corpo da célula são movidos para frente em resposta à tensão criada pelas fibras de estresse. (D) Desestabilização e liberação das adesões da extremidade oposta à direção da migração. (E) Integrinas são ligadas ao esqueleto de actina, incluindo FAK e proteínas de ligação a actina como vinculina, paxilina e α -actina (Adaptado de Chi Q, *et al.* 2014).

6 Secretoma de MSCs

A proteômica é uma importante ferramenta para o estudo de proteínas em larga escala. Essa abordagem tem permitido estudos de expressão proteica em diferentes tecidos e células corporais, em condições ou momentos distintos. A

análise proteômica do secretoma das MSCs é uma metodologia fundamental para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na terapia celular e para o conhecimento do conjunto de fatores solúveis proteicos responsáveis pelas funções celulares.

O secretoma das MSCs regula funções celulares importantes para a terapia celular como proliferação, diferenciação, comunicação e migração celular (Makridakis M, *et al.* 2013). As principais proteínas secretadas são de matriz extracelular, citoesqueleto, sistema imune e resposta a estímulos, como calor e lesão (Lee MJ, *et al.* 2010), porém a expressão de proteínas presentes no secretoma das MSCs pode ser modulada pelo meio de cultivo ou pelo ambiente *in vivo* (Makridakis M, *et al.* 2013, Lee MJ, *et al.* 2010; Kupcova Skalnikova H, *et al.* 2013). Portanto, é de extrema importância o estudo do secretoma das MSCs nos diferentes cenários da terapia celular.

1.7 Células-tronco Mesenquimais e Doenças Inflamatórias Intestinais

Estudos clínicos têm demonstrado a terapia celular com MSCs como promissora para uma variedade de doenças, incluindo lúpus sistêmico eritematoso, doença do enxerto versus hospedeiro, infarto do miocárdio, diabetes, cirrose, insuficiência renal aguda, doenças degenerativas e DIIs (Le Blanc K, *et al.* 2008; Martínez-Montiel MeP, *et al.* 2014; Flores AI, *et al.* 2015; Sensebé L, *et al.* 2010; Li N, *et al.* 2014; Wang D, *et al.* 2015; Yaochite JN, *et al.* 2015; Collino F, *et al.* 2015). A administração de MSCs em modelo murino de colite ulcerativa aguda induzida por DSS tem demonstrado redução da inflamação do cólon, dos sinais clínicos e histológicos da doença, além de induzir a apoptose de linfócitos T e apresentar potencial antioxidante (Goncalves F, *et al.* 2013; Lin Y, *et al.* 2015). As MSCs apresentam efeito supressor e modulador do sistema imune, através da secreção de moléculas bioativas, desempenhando papel regulador na resposta imunológica da colite experimental. Dessa forma, estudos clínicos têm focado nos benefícios e nos eventuais riscos dessas células para o tratamento das DIIs (Gonzalez-Rey E, *et al.* 2009; Gonzalez MA, *et al.* 2009; Lazebnik LB, *et al.* 2010; Ghannam AS, *et al.* 2010; De Miguel MP, *et al.* 2012; Flores AI, *et al.* 2015).

2 JUSTIFICATIVA

As DIIs são atualmente tratadas com drogas que visam manter o estado de remissão e aliviar seus sintomas clínicos, não havendo nenhum tratamento disponível que consiga promover a cura da doença até o momento. MSCs têm demonstrado eficácia em reduzir a inflamação e os sintomas clínicos das DIIs em modelos animais e em pacientes, porém, pouco é conhecido sobre o efeito de drogas convencionais sobre as MSCs. Levando em consideração que a terapia celular poderia ser afetada pelo tratamento medicamentoso de DIIs, torna-se necessário o estudo do efeito destas drogas na funcionalidade das MSCs.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito das drogas Dexametasona e Azatioprina no secretoma, ciclo celular e migração das células-tronco mesenquimais.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais de córion humano;
- Cultivar MSCs na presença de AZA ou DEX e avaliar:
 - Ciclo celular por citometria de fluxo;
 - Migração celular por ensaio de *transwell*;
 - As proteínas presentes no meio condicionado das MSCs por espectrometria de massas;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento e cultura de células-tronco mesenquimais

As MSCs foram isoladas a partir do córion humano de dois indivíduos . O córion humano foi obtido do projeto (11-0616), aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre após autorização das mães e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a retirada asséptica do córion a partir de placenta humana, o tecido foi submetido à digestão com colagenase tipo I (solução de 0,5 mg/mL em DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium - 10 mM HEPES) (Invitrogen, CA, USA) a 37°C por 1h e 45 min. A inativação da enzima foi realizada com a adição do meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen, CA, USA). A amostra foi centrifugada a 500 x g por 10min e o *pellet* ressuspensionado em DMEM suplementado com 20% SFB, 100un/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina (Gibco, NM, USA). As MSCs foram cultivadas em placas de cultura e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. A cultura foi expandida quando as MSCs apresentaram 80% de confluência, através remoção das células aderidas pela solução de 0.25% Tripsina-EDTA (Gibco, NM, USA). Células foram utilizadas entre as passagens P5-P8 e os resultados de cada condição experimental foi comparada entre células da mesma passagem.

4.2 Caracterização das células-tronco mesenquimais

As MSCs utilizadas nesse trabalho foram caracterizadas por morfologia, imunofenotipagem e diferenciações *in vitro*, de acordo com o Consenso publicado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (Dominici M, *et al.* 2006).

4.2.1 Imunofenotipagem

A caracterização da população de MSCs foi realizada por citometria de fluxo, baseada no fenótipo dos marcadores de superfície CD73, CD90, CD105, CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR (Dominici M, *et al.* 2006). MSCs foram removidas da

superfície das garrafas com 0.25% de Tripsina-EDTA (Gibco, NM, USA) e lavadas com PBS (300 x g por 5 min). As células (1×10^6) foram incubadas com os anticorpos (30 min a 4 °C), lavadas com PBS e analisadas com o citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton-Dickinson, NJ, USA). Os dados foram posteriormente analisados no *software* FlowJo (Ashland, OR, USA).

4.2.2 Diferenciação celular

No ensaio de diferenciação celular, as MSCs foram induzidas à diferenciação em adipócitos e osteócitos. O meio de cultivo utilizado para diferenciação osteogênica foi DMEM com baixa concentração de glicose 15 mM Hepes, suplementado com 10% de SFB, 1% de PS, 0,1 μ M de Dexametasona (Sigma, MO, USA), 50 μ M de Ácido Ascórbico 2-Fosfato (Sigma, MO, USA) e 10 mM de β -Glicerolfosfato (Sigma MO, USA). Foram induzidas a diferenciação 5×10^3 MSCs por poço em placa de 24 poços e o protocolo durou 21 dias. A detecção de diferenciação em osteócitos foi realizada por coloração especial com o corante vermelho de alisarina (Sigma-Aldrich, MO, USA), que marca depósitos de cálcio. Na diferenciação adipogênica, as MSCs foram cultivadas em DMEM com baixa concentração de glicose 15 mM Hepes, suplementado com 10% de SFB, 1% de OS, 1 μ M de Dexametasona, 10 μ g/mL de Insulina, 0,5 mM de isobutil metilxantina e 200 μ M de Indometacina (Sigma, MO, USA). A diferenciação adipogênica foi confirmada com o corante *Oil Red* (Sigma-Aldrich, MO, USA) que marca vesículas de gordura (Indumathi S, *et al.* 2013).

4.3 Cultivo das MSCs com as drogas AZA e DEX

MSCs foram cultivadas em placa de 6 poços (diâmetro de 35 mm, TPP) na concentração de 6×10^4 células por poço com AZA ou DEX (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 7 dias. Foram utilizadas concentrações clínicas de 1 μ M (AZA) e 10 μ M (DEX), de acordo com Schneider N e colaboradores (2015). Estas concentrações são comparadas às encontradas no soro de pacientes de DIIs sob utilização dos medicamentos (Duijvestein M, *et al.*, 2010). A AZA foi dissolvida em Dimetil sulfóxido

(DMSO; Sigma-Aldrich, MO, USA) na concentração final de 0.5% em meio DMEM completo (DMEM *low glucose*, 10% FBS, 1% PS), e a DEX em DMEM *low glucose*. As MSCs do grupo DMSO (veículo AZA) foram cultivadas com meio DMEM completo na concentração final de 0.5% de DMSO. O grupo controle foi cultivado com meio DMEM completo.

4.4 Análise de migração por *transwell*

Para análise do comportamento migratório das MSCs em direção a um quimioatratador, foram utilizados insertos *transwell* (Falcon, NC, USA) com poros de membrana de 8µm e fibronectina (2 µg/ml; Sigma-Aldrich, MO, USA). Após os 7 dias de cultivo na presença ou ausência das drogas, MSCs foram transferidas para a compartimento superior do *transwell* na concentração de 1×10^5 células por inserto. O SDF-1α (stromal cell-derived factor 1; 300 ng/mL) (Invitrogen, Oregon, USA) foi utilizado como quimioatratador e adicionado ao compartimento inferior do inserto. As placas foram mantidas por 16h em incubadora umidificada com 37°C e 5% CO₂. Em seguida, o meio foi removido, os insertos foram lavados com PBS, fixados com 4% de paraformaldeído por 15 min, novamente lavados com PBS e as células nele presentes foram marcadas com coloração Hematoxilina e Eosina. As células da câmara superior do *transwell* foram delicadamente removidas com um *swab* e as MSCs que migraram através dos poros para a parte inferior do *transwell* foram contadas em microscópio invertido (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Germany). O índice migratório (Nichols J E, *et al.* 2013) foi calculado como: o número de células que migraram em resposta a SDF-1/número de células que migraram de forma randômica em meio sem SDF-1. Como anteriormente demonstrado em Schneider N, *et al.* 2015, o grupo DMSO não alterou a migração das MSCs, por isso não está presente na análise de *transwell*.

4.5 Análise do ciclo celular

Para análise do ciclo celular, após o cultivo das MSCs com as drogas por 7 dias, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS, centrifugadas a 1200 rpm por 10 min e ressuspendidas em solução hipotônica contendo 0,5 µg/mL de iodeto de

propídeo, 0,1% de Triton x-100 e 0,1% de citrato de sódio a 1×10^6 células/mL. Em seguida, RNase A foi adicionada na concentração 50 µg/ml e as amostras foram protegidas da luz por 30 min a 4°C. A análise foi realizada por citometria de fluxo (BD FACSCalibur; Becton-Dickinson, NJ, USA) e pelo *software* FlowJo (Ashland, OR, USA).

4.6 Espectrometria de massas

As MSCs foram divididas em quatro grupos: grupo controle (células cultivadas com meio DMEM completo), grupo AZA (células cultivadas com Azatioprina), grupo DEX (células cultivadas com Dexametasona) e grupo DMSO (células cultivadas com DMSO – veículo usado para AZA). Para obtenção do meio condicionado, MSCs dos diferentes grupos foram cultivadas por 7 dias. Nas últimas 24h, as células foram cultivadas com meio DMEM sem *phenol red*, antibióticos ou SFB. Ao fim do protocolo, o meio condicionado foi separado, centrifugado a 200 x g por 7 min, submetido a filtração (0,22µm) e congelado a -20°C. As proteínas presentes no meio condicionado (12 mL) foram concentradas em filtro Amicon (3000 Da) através de repetidas centrifugações 3000 x g por 30 min a 4°C até a concentração de amostra final atingir 500µL. A concentração de proteínas foi quantificada pelo kit Qubit (Invitrogen, USA), a amostra foi precipitada em TCA20%/Acetona e armazenada a -20°C. Na sequência do protocolo, o TCA20%/Acetona foi removida e o precipitado submetido ao speed vac a 40°C. As proteínas foram ressuspendidas em tampão desnaturante (ureia 8M/ NH_4HCO_3 - pH 8.9), reduzidas com DTT (0,02µg/ 1µg de proteína) e alquiladas com iodocetamida (0,01µg/ 1µg de proteína). A digestão das proteínas foi realizada com tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, Madison, WI, USA) e a dessalinização da amostra foi realizada com coluna OASIS®HLB (Waters, Milford, MA, USA). Esta etapa do experimento foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, UFRGS. A espectrometria de massas foi realizada no Laboratório Nacional de Biociência (LNBio), Campinas, SP. Os peptídeos digeridos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS), com ionização por eletrospray e analisador do tipo quadrupolo por tempo de voo (ESI/Q-TOF).

4.7 Análise quantitativa e de bioinformática

Os dados de massas resultantes foram analisados pelo *software* MASCOT versão 2.2.1, contra a base de dados Uniprot. Foram utilizados os seguintes parâmetros para identificação de proteínas: máximo de uma perda de clivagem, carbamidometilação como modificação fixa dos resíduos de cisteína, oxidação dos resíduos de metionina como modificação variável, 0,2 Da como unidade de tolerância de peptídeo e 0,1 unidade de tolerância de massa. A validação da identificação de peptídeos e proteínas foi realizada através do *software* Scaffold versão 4.0 (Proteome *software*, Inc. Portland, OR, USA). Foram aceitos peptídeos e proteínas com as probabilidades de 95% e 99%, respectivamente, e contendo no mínimo um peptídeo único identificado. As proteínas identificadas foram analisadas quanto à sua probabilidade de secreção pelos algoritmos SignalP 4.1 (Bendtsen, *et al.* 2004) e SecretomeP 2.0 (Bendtsen, *et al.* 2004). A anotação funcional (Gene Ontology, GO) foi realizada através do *software* Cytoscape versão 3.1.1 (plugin BINGO).

4.8 Análise estatística

Os dados foram analisados e representados como média \pm DP, n representa o número de experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste ANOVA post-hoc Student-Newman-Keuls (SNK) para os resultados do ensaio *transwell* e ciclo celular. NSAF (*Normalized Spectral Abundance Factor*) foi utilizado para a comparação da abundância de proteínas individuais. Em seguida foi aplicado o teste t de *student* para resultados do secretoma de DEX e ANOVA *post-hoc Student-Newman-Keuls* (SNK) para o secretoma de AZA. Todos os dados foram analisados em GraphPad INSTAT (GraphPad *software*, San Diego, California, USA) e o valor P menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento e caracterização de MSCs

MSCs foram obtidas de córion humano, semeadas em placas de cultura e selecionadas a partir da propagação de células aderentes. As células cultivadas apresentaram morfologia fibroblástica característica de MSCs (Figura 4, A). O potencial de diferenciação em adipócitos e osteócitos foi avaliado *in vitro*, através do cultivo de MSCs com meios específicos para indução de diferenciação. As MSCs demonstraram preservar seu potencial de diferenciação através de marcação de depósitos de cálcio com *Alizarin red* e vesículas de gordura com *Oil red* (Figura 4, B e C). Na análise por citometria de fluxo, as MSCs apresentaram marcadores de superfície positivos para CD73 (99,4%), CD90 (99,9%) e CD105 (99,9%) (Figura 5, A-C); e marcadores negativos para CD45 (0,10%), CD34 (0,067%), CD14 (0,15%), CD19 (0,078%) e HLA-DR (0,15%) (Figura 5, D-H), demonstrando preservar seu fenótipo característico.

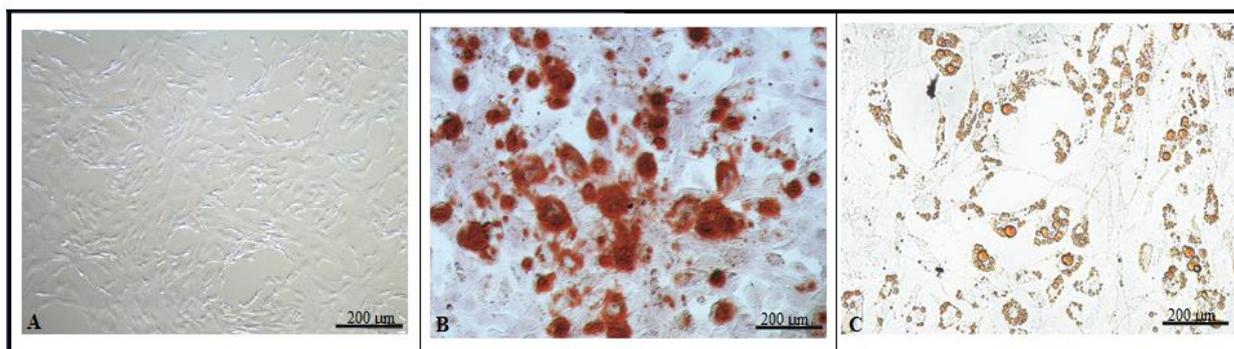


Figura 4. Caracterização de MSCs quanto à morfologia e diferenciação celular. (A) Morfologia fibroblástica de MSCs indiferenciadas; (B) MSCs diferenciadas em osteócitos, coloração *Alizarin Red*; (C) MSCs diferenciadas em adipócitos, coloração *Oil Red*. Barra=200µm. Fotos em aumento de 10x. (n=3)

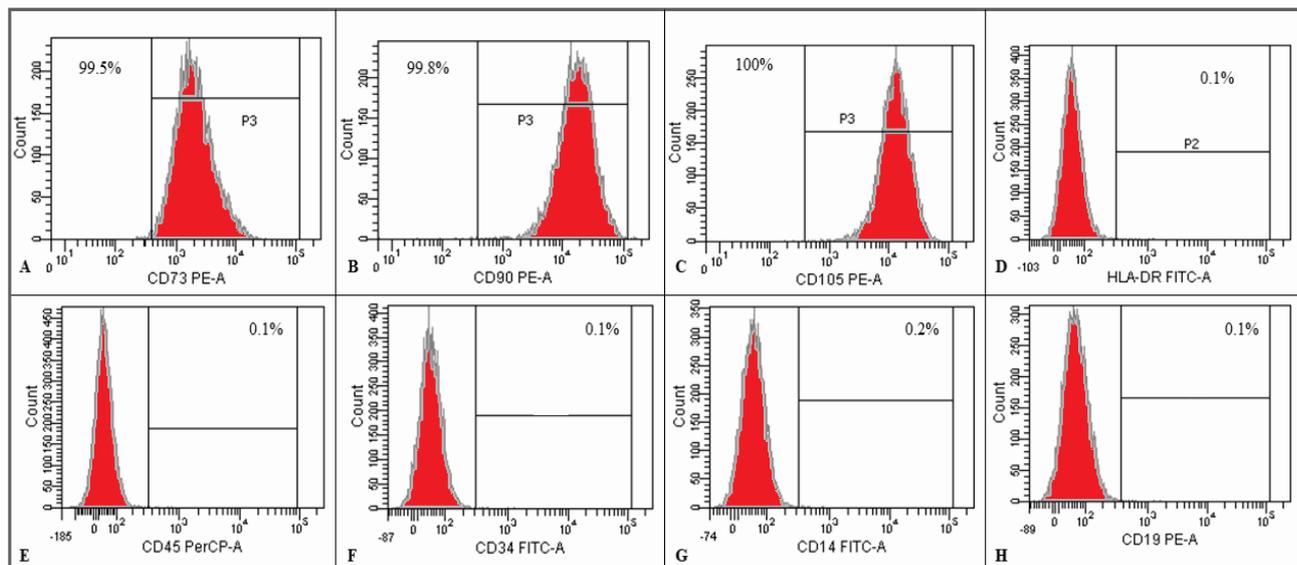


Figura 5. Imunofenotipagem das MSCs. A maioria das células preservou seus fenótipos característicos, resultando na presença dos marcadores CD73, CD90 e CD105; e na ausência dos marcadores CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR. (n=3).

5.2 Comportamento migratório

A migração de MSCs foi avaliada através de um ensaio *transwell*, que consiste em uma membrana permeável por onde as células podem migrar de um compartimento ao outro em direção a um quimioatratador. As células foram plaqueadas na parte superior do *transwell* e estimuladas a migrar através dos poros do inserto para a parte inferior, onde foi adicionado o quimioatratador SDF-1. Os resultados demonstraram que as MSCs do grupo AZA exibiram o maior índice de migração com diferença estatística significativa do grupo controle (Figura 6, A), apresentando o maior número de células capaz de migrar através dos poros em resposta a SDF-1 (Figura 6, B e C) ($P < 0.05$, $n = 3$), enquanto as células cultivadas com DEX apresentaram o menor índice de migração (Figura 6, A), com menos células capazes de migrar em direção a SDF-1, em comparação com o grupo controle (Figura 6, C e D) ($P < 0.05$, $n = 3$).

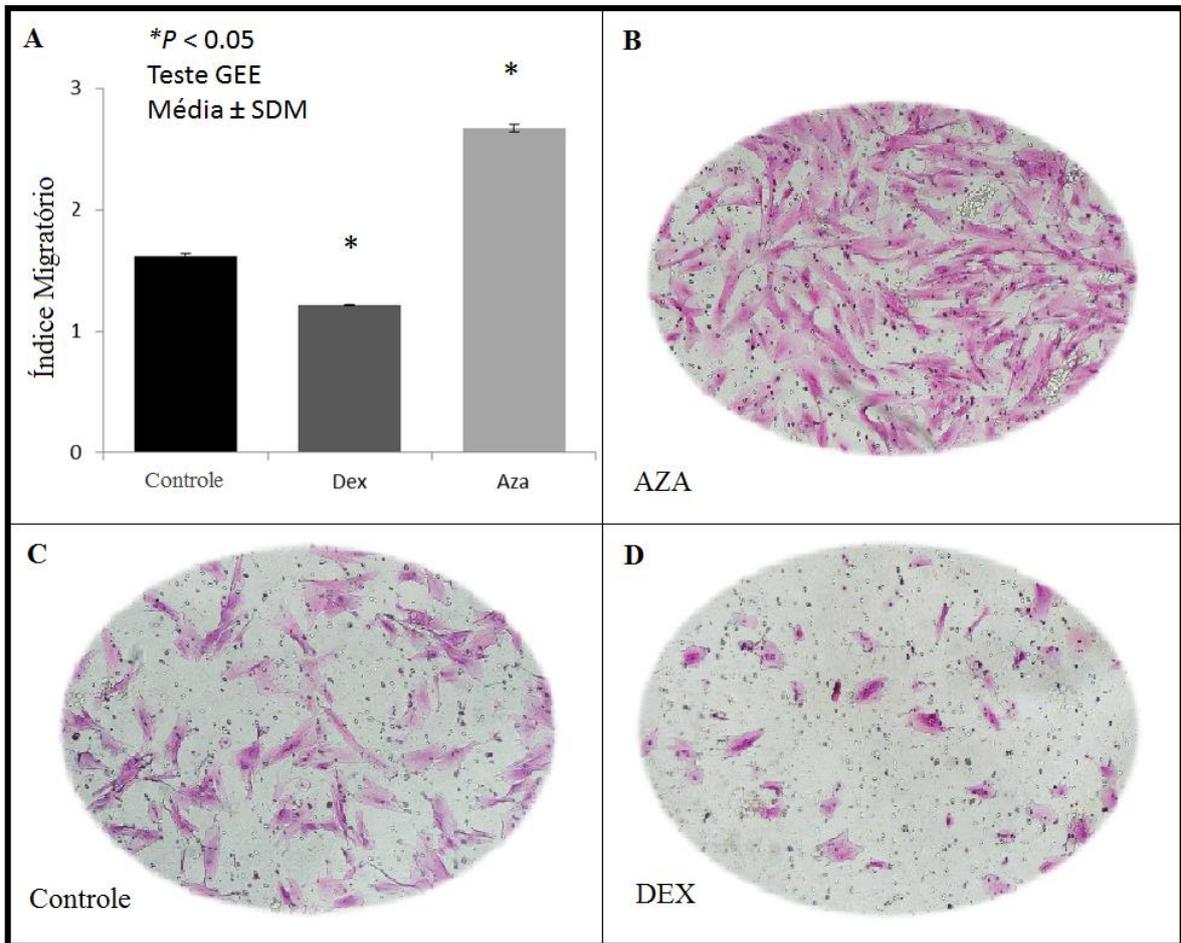


Figura 6. Comportamento migratório das MSCs. (A) Índice migratório de MSCs, demonstrando uma maior migração das células na presença de AZA e uma menor migração das células na presença de DEX. * P < 0,05, em comparação com o grupo controle. (B), (C) e (D) Fotografias dos grupos AZA, controle e DEX, respectivamente, mostrando MSCs coradas com H&E. As células migraram para a parte inferior da membrana *transwell*, em resposta a SDF-1. Fotos em aumento de 200x. O índice migratório foi calculado como: o número de células que migraram em resposta a SDF-1/número de células que migraram de forma randômica em meio sem SDF-1. (n=3).

5.3Ciclo celular

MSCs foram cultivadas com as drogas por 24h ou 7 dias. Fases do ciclo celular foram analisadas através de citometria de fluxo e do marcador nuclear iodeto de propídeo. Os grupos experimentais não apresentaram modificações no ciclo celular em nenhum dos diferentes tempos (Figura 7, A e B). Não foram detectadas alterações na porcentagem de células que estavam nas fases G0/G1, S ou M, indicando que o tratamento com AZA ou DEX não influencia na divisão de MSCs (Tabela 1).

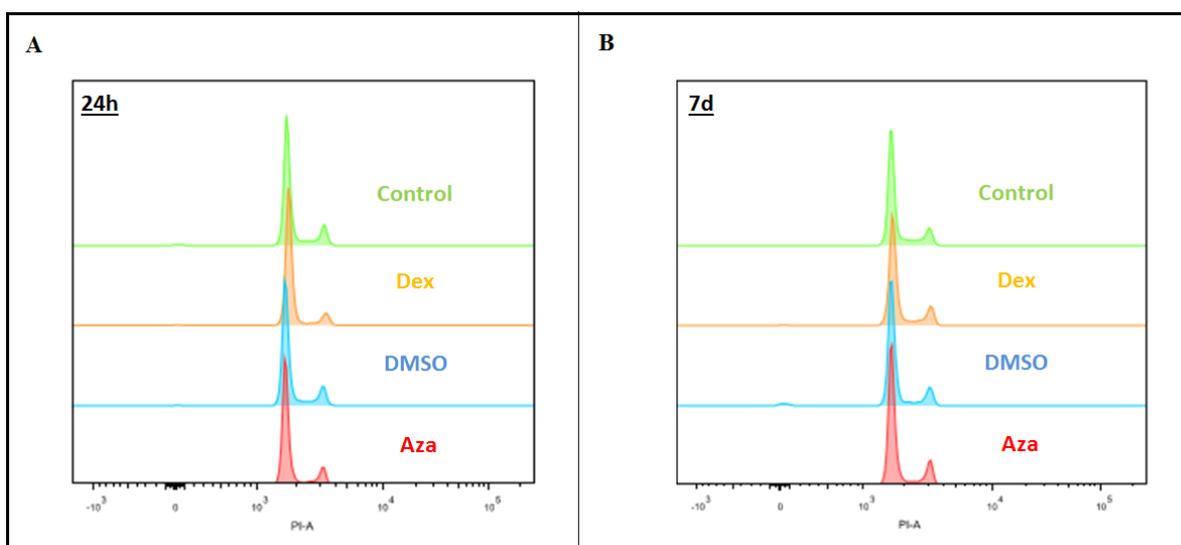


Figura 7. Ciclo celular de MSCs. MSCs cultivadas com AZA, DEX ou DMSO não apresentaram alterações na análise do ciclo celular. $P > 0,05$ (A) Cultivo por 24h. (B) Cultivo por 7 dias. (n=3).

Tabela 1. Análise do ciclo celular das MSCs. Não foram detectadas alterações na porcentagem de células que estavam nas fases G0/G1, S ou M. $P > 0,05$. Os valores da tabela estão representados em porcentagem.

Grupo	Tempo	G0-G1	S	G2-M
Controle	24h	71.73±2.36	8.76±1.20	19.03±1.86
	7d	74.66±1.79	7.57±0.51	16.86±1.52

Dex	24h	80.50±3.38	5.55±0.57	12.97±2.64
	7d	75.00±1.42	6.02±0.71	17.30±0.98
Aza	24h	76.43±2.40	7.44±0.69	15.56±1.55
	7d	72.66±2.94	8.16±1.38	18.00±2.70
DMSO	24h	77.73±3.03	7.15±0.47	14.18±2.96
	7d	72.13±2.29	8.60±1.26	18.00±0.90

5.4 Secretoma de MSCs cultivadas com AZA ou DEX

5.4.1 Identificação de proteínas

A identificação de proteínas pelo *software* MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) e sua filtragem pelo Scaffold resultaram na identificação de 67 proteínas, das quais 63 apresentaram no mínimo um peptídeo único. Foram identificadas 39 proteínas no grupo controle, 55 no grupo DMSO, 57 no grupo AZA e 50 no grupo DEX (Figura 18, A e B). Com o objetivo de verificar as proteínas secretadas pelas MSCs, foram utilizados os algoritmos SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), que prediz a probabilidade de secreção pela presença de peptídeo sinal (via clássica), e secretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>), que prediz secreção através de vias não clássicas. Dentre as 63 proteínas, 30 (48%) apresentaram peptídeo sinal e 11 (17%) apresentaram secreção não clássica. Os algoritmos não identificaram como secretadas o número de 22 (35%) proteínas, porém estas já haviam sido identificadas em outras análises de secretoma de MSCs por espectrometria de massas (Lee J W, *et al.* 2011), incluindo a análise proteômica de microvesículas de MSCs (Kim H S, *et al.* 2012).

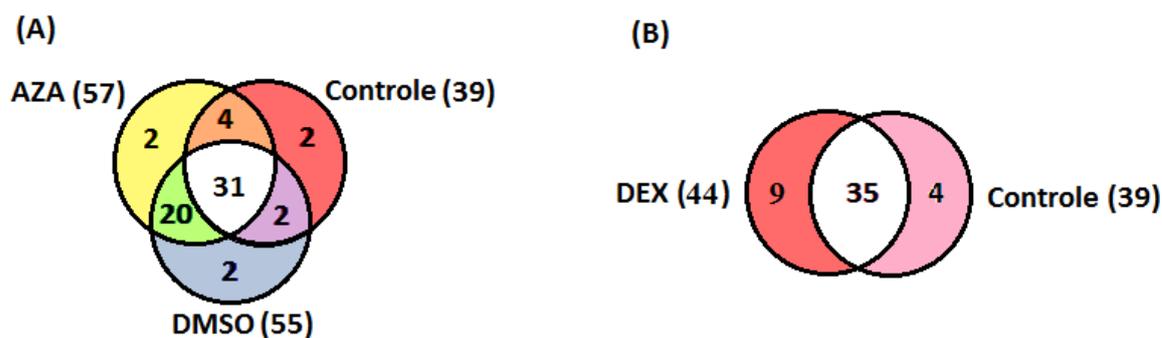


Figura 8. Diagrama de Venn das proteínas identificadas no secretoma das MSCs. (A) Diagrama de Venn das proteínas identificadas nos grupos AZA (57), controle (39) e DMSO (55) (B) Proteínas identificadas nos grupos DEX (44) e controle (39). (n=2).

5.4.2 Análise das proteínas secretadas

Para análise das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos DEX e controle ou AZA, controle e DMSO, MSCs foram cultivadas por 7 dias na presença ou ausência das drogas e o sobrenadante das culturas foi coletado para a análise por espectrometria de massas. Para análise do secretoma das MSCs cultivadas com AZA, foram selecionadas as proteínas que apresentaram diferença estatística entre os grupos (AZA .vs. controle) e (AZA .vs. DMSO), mas não apresentaram diferença estatística entre os grupos (DMSO .vs. Controle). As proteínas com $p < 0,05$ não se mostraram relevantes para as modificações observadas na migração de MSCs ou demais processos importantes para o efeito terapêutico de MSCs, por isso não foram objeto de análise neste trabalho. As proteínas encontradas na análise do secretoma dos grupos DEX e controle foram listadas (Tabela 4) e agrupados em um *Heat map* (Figura 9). Para a análise das proteínas presentes no grupo DEX e no grupo controle foi realizado o teste estatístico t de *student*, permitindo a identificação de 15 proteínas com $p < 0,05$. Estas proteínas foram analisadas quanto à ontologia (Tabela 3), sendo que somente 6 proteínas se mostraram envolvidas no processo migratório propriamente dito, destacadas na Tabela 2.

Tabela 2. Análise das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos DEX e controle. Proteínas secretadas pelas MSCs na presença de DEX e que tiveram diferença significativa do controle. $P < 0,05$. Em linhas cinzas as proteínas referentes à migração celular. Os valores do teste NSAF das repetições de DEX e controle são mostrados nas colunas 4,5,6 e 7.

Proteínas	ID	Peso molecular	DEX 1	DEX 2	Controle 1	Controle 2	Valor P (teste t)
Vimentina	B0YJC4	50 kDa	0,01104	0,01051	0	0	0,0078
<i>Glia-derived nexin</i>	C9JN98	30 kDa	0,012926	0,01477	0	0	0,0211
Profilina-1	PROF1	15 kDa	0,022048	0,02099	0	0	0,0078
<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2</i>	B4DIT7	69 kDa	0,005991	0,0057	0	0	0,0078
<i>Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3</i>	BGH3	75 kDa	0,003013	0,00287	0	0	0,0078
Colágeno alfa-1 (cadeia I)	CO1A1	139 kDa	0,039357	0,03948	0,01755	0,019051	0,0208
<i>Heat shock cognata 71kDa</i>	E9PKE3	69 kDa	0,011149	0,0091	0,055681	0,065897	0,0383
Colágeno alfa-1 (cadeia III)	CO3A1	139 kDa	0,000702	0	0,0046735	0,0030039	0,0439
Colágeno alfa-1 (cadeia XII)	COCA1	333 kDa	0	0	0,002796	0,0028754	0,0045
Glicose-6-fosfato isomerase	G6PI	63 kDa	0	0	0,0030696	0,0026307	0,0245
Tubulina cadeia beta	Q5JP53	48 kDa	0	0	0,0038578	0,0033061	0,0245
Queratina tipo I citoesquelético 9	K1C9	62 kDa	0	0	0,0027494	0,0023562	0,0245
Procolágeno-lisina,2-oxoglutarato 5-dioxigenase 1	B4DR87	88 kDa	0	0	0,002213	0,0018965	0,0245
Catepsina L1	CATL1	38 kDa	0	0	0,0051437	0,0044082	0,0245
Fator de crescimento semelhante à insulina 7	IBP7	29 kDa	0	0	0,0060739	0,0052054	0,0245

MSCs cultivadas com DEX apresentaram aumento de expressão das proteínas vimentina, profilina-1, *protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2* (TGM-2),

transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (TGFB1), bem como redução na expressão de catepsina L1 e *Heat shock cognata* 71KDa. Tais proteínas estão relacionadas com o movimento migratório de MSCs.

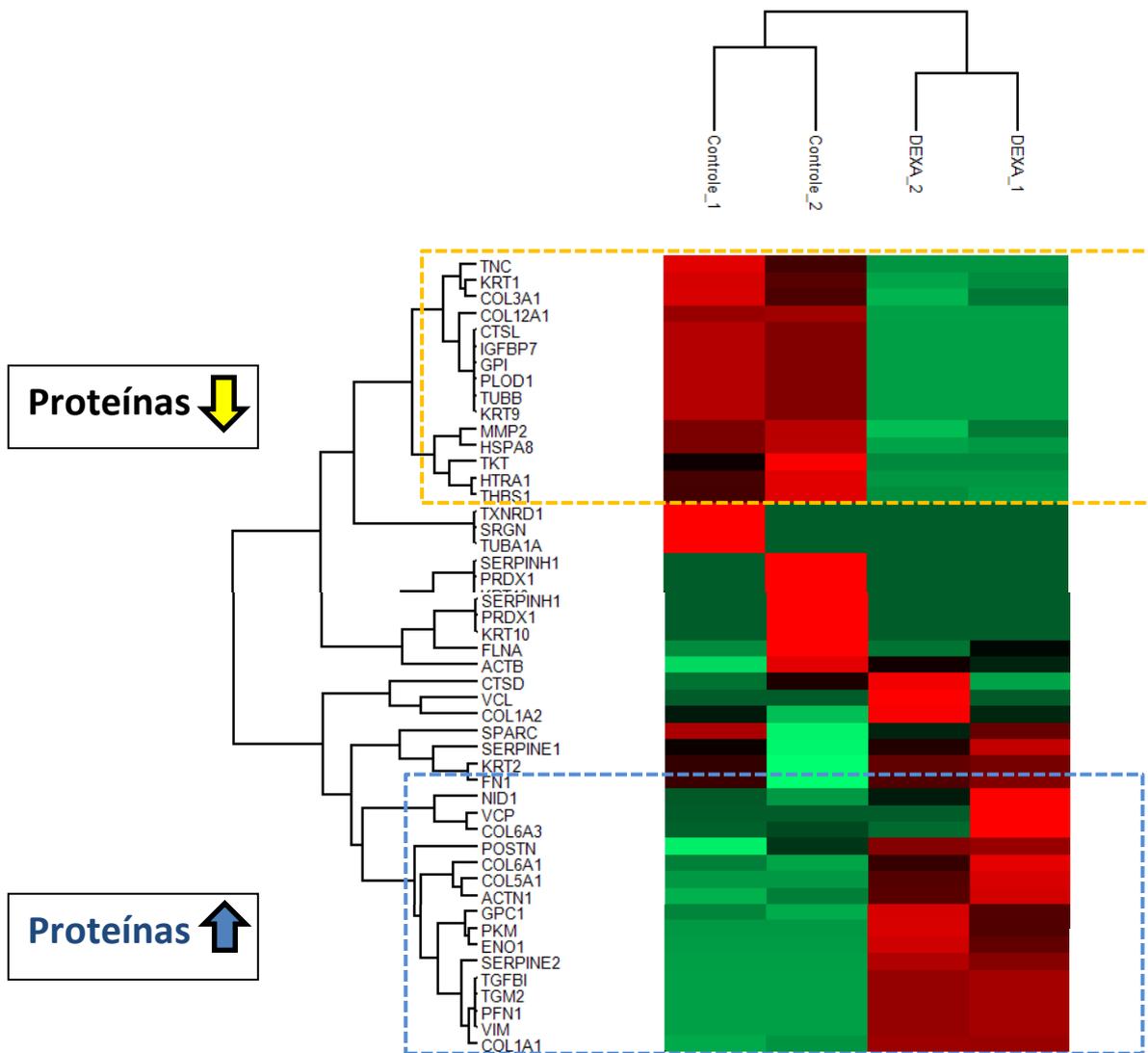


Figura 9. Diagrama esquemático das proteínas secretadas na presença ou ausência de DEX. As proteínas foram agrupadas conforme sua expressão nos grupos DEX e controle. As proteínas dentro da marcação pontilhada amarela apresentam baixa expressão em comparação com o grupo controle, enquanto as proteínas dentro da marcação pontilhada azul apresentam expressão aumentada em

comparação com o grupo controle. Entretanto, estes dados não significam diferença estatística, mas sim um panorama geral de expressão. Os níveis de expressão estão representados em vermelho, alta expressão e verde, baixa expressão.

6. DISCUSSÃO

As terapias medicamentosas atualmente utilizadas nas DIIs, como o glicocorticoide DEX e o imunossupressor AZA, visam induzir e manter a remissão dos pacientes. Porém, nem sempre são efetivas e causam, muitas vezes, efeitos colaterais (Pithadia AB, *et al.* 2011). A terapia celular baseada em MSCs é uma promissora alternativa para o tratamento de DIIs (Flores AI, *et al.* 2015), devido à sua capacidade de modular o sistema imune e sua migração seletiva à sítios de inflamação. Todavia, há poucos estudos encontrados na literatura sobre a interação das MSCs com drogas utilizadas em pacientes com DIIs.

Glicocorticoides e Azatioprina são drogas conhecidas por afetar o ciclo celular. Dessa maneira, efeitos citotóxicos são observados nos pacientes, sendo os mais comuns a depressão da medula óssea (diminuição de glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas) e efeitos tóxicos no fígado pela morte de hepatócitos (Dubinsky M C, *et al.* 2003). O glicocorticoide DEX inibe a síntese de DNA e bloqueia o ciclo celular de algumas células, tendo se mostrado eficaz em suprimir o crescimento da linhagem células Con8 de tumor mamário e SUP-T1 linfoblastóide (Cataldi S, *et al.* 2014; Goya L, *et al.* 1993). Levando em consideração o efeito das drogas em algumas linhagens celulares e o fato de que pacientes com DIIs podem receber doses diárias de AZA ou DEX (Pithadia AB, *et al.* 2011) a interação das drogas com as MSCs dos pacientes poderia afetar um futuro transplante autólogo, bem como um transplante alogênico administrado em conjunto com as células.

No presente estudo, o ciclo celular das MSCs cultivadas com DEX ou AZA (24h ou 7 dias) foi analisado por citometria de fluxo com o marcador nuclear iodeto de propídeo. Os resultados não demonstraram diferença estatística entre os grupos, indicando que as drogas AZA e DEX não prejudicaram a divisão celular no cultivo *in vitro* nas doses testadas. Estudos prévios demonstraram que DEX não afeta a proliferação e ciclo celular das MSCs (Alm J J, *et al.* 2012; Xiao Y, *et al.* 2010), enquanto, no trabalho de Huang e colaboradores (2014), AZA demonstrou alterar a proliferação e ciclo celular das MSCs somente nas concentrações de 0,20 e 0,30 mg/mL bem superiores as utilizadas em nosso estudo (0,28 µg/mL) (Huang H R, *et*

al. 2014). Dessa forma, nossos resultados sugerem que doses terapêuticas de AZA ou DEX não influenciam no ciclo celular de MSCs. Podendo ser utilizadas concomitantemente à terapia celular sem prejuízos de proliferação.

O contato das MSCs com o microambiente inflamatório do organismo do paciente promove sua ativação e aumento de migração, de modo que alterações neste processo poderiam influenciar na eficiência do efeito terapêutico (Fu X, *et al.* 2009). O *homing* das MSCs é mediado pela interação de quimiocinas com os receptores presentes na membrana plasmática das células, sinalizando sua migração aos sítios de inflamação. Tal processo envolve o movimento do citoesqueleto de actina e a indução da polarização celular. Como previamente observado no estudo desenvolvido por nosso grupo, AZA e DEX alteram estes elementos nas MSCs quando em concentrações terapêuticas (Schneider N, *et al.* 2015). A AZA foi capaz de aumentar a velocidade de migração, sendo observado um aumento do alongamento celular, da presença de fibras de estresse ventrais, preservação da distribuição de FAK e de lamelipódios. Entretanto, DEX provocou diminuição da migração, resultando em uma morfologia celular arredondada, aumento ainda maior de fibras de estresse ventrais, ausência de FAK nas projeções de membrana e perda de lamelipódios. Entretanto, estes ensaios analisaram a migração intrínseca das células, ou seja, sem estímulo quimioatratador.

No presente estudo, observamos resultados similares ao analisar o comportamento migratório das MSCs na presença do quimioatratador SDF-1. AZA foi capaz de induzir uma maior migração de células, enquanto a DEX diminuiu o número de células que atravessaram a membrana em direção ao quimioatratador. Esses resultados sugerem que as alterações observadas na migração celular não estão relacionadas à sinalização da quimioatração, mas a outros mecanismos celulares, provavelmente envolvidos no remodelamento do citoesqueleto de actina e na regulação das adesões celulares. Estudos anteriores demonstraram que DEX induz rigidez da estrutura celular e prejudica a migração de células T, envolvendo a ativação do complexo ERM, que está relacionado ao rearranjo do citoesqueleto (Müller N, *et al.* 2013). Em adição a este efeito, o estudo de Chen X e colaboradores (2014), mostrou que DEX inibe o efeito terapêutico das MSCs *in vivo*, em modelo

experimental de inflamação de fígado, inibindo a imunossupressão e afetando o comportamento migratório. Apesar de DEX não se mostrar efetiva na alteração do ciclo celular, a terapia combinada de DEX com as MSCs não se mostra interessante para pacientes com DIIs, visto que DEX prejudica o efeito imunossupressor e altera o processo de migração celular, podendo prejudicar sua eficiência. Ao contrário de AZA, que apesar de necessitar de mais estudos, abre novas possibilidades para a terapia combinada, podendo melhorar o resultado da terapia celular nas DIIs.

O secretoma das MSCs regula funções celulares importantes para a terapia celular, incluindo proliferação, diferenciação, comunicação e migração celular (Makridakis M, *et al.* 2013). Sabendo que o secretoma das MSCs pode ser alterado de acordo com o microambiente e meio de cultivo, propusemos a avaliação proteômica do meio condicionado de MSCs cultivadas com AZA ou DEX, de nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avalia alterações causadas pelas drogas no secretoma das MSCs, uma vez que não foram encontrados trabalhos similares nas bases de dados de literatura científica. As proteínas identificadas no grupo AZA não apresentaram alterações de funções ou vias relevantes para a migração celular. Entretanto, as MSCs cultivadas na presença da droga DEX apresentaram aumento na secreção de vimentina, profilina-1, *protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2* (TGM-2) e *transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3* (TGFB1) e baixa expressão das proteínas catepsina L1 e *Heat shock cognata 71KDa* (HSPA8).

A Vimentina pertence à família dos filamentos intermediários, é associada à migração celular e apresenta papel importante na adesão celular (Chernoivanenko I S, *et al.* 2013). Esta proteína atua na formação de estruturas adesivas, como as integrinas, as moléculas de adesão celular, as proteínas de ligação com o citoesqueleto e a regulação da expressão de FAK (Ivaska J, *et al.* 2007; Chernoivanenko I S, *et al.* 2013; Dave J M, *et al.* 2014). Corroborando com nossos resultados, já foi demonstrado que o tratamento com DEX inibiu o movimento celular e alterou a distribuição de FAK pelo corpo da célula (Schneider N, *et al.* 2015), o que pode estar relacionado com o aumento da adesão celular provocado pelos altos níveis de vimentina. Além disso, esta proteína é encontrada associada com actina e

integrinas, nas estruturas chamadas VAMs (Vimentin associated matrix adhesions), que atuam de forma semelhante a adesões focais (Ivaska J, *et al.* 2007), outro fator que pode estar associado com a diminuição da migração das MSCs.

A Profilina-1 é conhecida por se ligar aos monômeros de actina, atuando no controle de sua polimerização e da migração celular (Ding Z, *et al.* 2012). Em alguns tipos de carcinomas a profilina-1 promove inibição da motilidade celular. A superexpressão de profilina-1 é associada à expressão diferencial de marcadores proteômicos de mobilidade celular, como o NME2, que diminui a migração celular (Coumans J V, *et al.* 2014). Apesar de nossas análises não demonstrarem diferença estatística nos níveis de NME2, o aumento da polimerização de actina corrobora com o fato de que DEX aumentou a presença de fibras de estresse ventrais (Schneider N, *et al.* 2015) aumentando a rigidez celular e inibindo a migração tanto intrínseca quanto em resposta ao quimioatratador. A resposta celular à profilina-1 é distinta em diferentes tipos celulares, podendo estimular ou inibir a migração celular (Ding Z, *et al.* 2012), mas neste cenário o aumento de profilina-1 pode estar relacionado à diminuição da migração das MSCs.

A proteína TGM-2 atua em diversos processos celulares como adesão, migração celular, proliferação, apoptose, diferenciação e remodelamento da matriz extracelular (Nurminskaya M V, *et al.* 2012; Odii B O, *et al.* 2014). Quando presente na superfície celular fortalece a ligação da célula à fibronectina, mediando a ligação entre integrinas e fibronectina, também resultando na sinalização para o aumento da FAK (Nurminskaya M V, *et al.* 2012). Nossos dados vão ao encontro da literatura, pois DEX provocou a redistribuição de FAK nas MSCs por todo o corpo celular (Schneider N, *et al.* 2015), e como utilizamos fibronectina como matriz para a migração, a ligação entre integrinas e a fibronectina pode ter sido intermediada pela TGM-2. Também foi demonstrado em fibroblastos que o aumento dos níveis de TGM-2 provocaram maior adesão celular e consequente diminuição da migração (Balklava Z, *et al.* 2002), o que sugere que o aumento da adesão das MSCs ao substrato pode explicar a inibição da migração destas células. Além disso, o secretoma das MSCs na presença de DEX resultou no aumento de TGFBI, a qual é uma proteína de matriz extracelular induzida por TGF- β e envolvida nos processos

de adesão celular, migração e proliferação, e que interage com as integrinas, de modo a estimular a adesão celular (Park J Y, *et al.* 2004). Juntamente com a TGM-2, esta proteína pode ter estimulado a adesão das MSCs, de modo a inibir o movimento celular.

O secretoma do grupo DEX também apresentou baixa expressão das proteínas catepsina L1 e HSPA8. Catepsina L1 é uma protease lisossômica que age na regulação da degradação e remodelação da matriz extracelular, motilidade, angiogênese e sinalização celular. Já foi visto que MSCs secretaram maior quantidade de catepsina quando estimuladas por TNF- α , sugerindo que esta protease seja secretada em resposta a um ambiente inflamatório *in vivo* (Lee M J, *et al.* 2010). Nossas observações foram feitas *in vitro* sem a estimulação por fatores inflamatórios, e neste cenário a DEX inibiu a secreção de catepsina L1. Estudos observaram que a inibição de catepsina L1 provoca a diminuição da migração de células cancerígenas, possivelmente resultando na inibição de outras proteases importantes para a invasão celular e degradação da matriz extracelular (Tsai J Y, *et al.* 2014; Navab R, *et al.* 2008). Além disso, a HSPA8 também teve seus níveis reduzidos. Esta proteína é uma chaperona importante na degradação de proteínas como a actina, via proteassomo. (Stricher F, *et al.* 2013). A inibição de HSPA8 em células do músculo liso vascular diminui a migração celular por sua influência no canal iônico ASIC2. (Grifoni S C, *et al.* 2008). Corroborando com nossos dados de reduzida migração celular na presença de DEX, a inibição da secreção de ambas as proteínas Catepsina L1 e HSPA8 possivelmente interferiu na degradação de matriz extracelular e de actina. Tais fatores podem influenciar o movimento da célula na matriz e aumentar a rigidez celular, afetando a migração das MSCs.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das drogas AZA ou DEX no ciclo celular, migração e secretoma de MSCs, sendo esses, aspectos importantes para uma terapia celular bem sucedida. Os resultados de ciclo celular não demonstraram diferença estatística entre os grupos. Entretanto, a DEX provocou uma diminuição na motilidade celular, enquanto a AZA potencializou a migração celular. Na análise do secretoma das MSCs cultivadas com DEX, foram identificadas proteínas relacionadas à migração e adesão. Esses resultados corroboram com o

comportamento migratório observado no grupo DEX, sugerindo que as proteínas diferencialmente expressas desempenham papel importante nas MSCs, diminuindo sua migração. Acreditamos que mais estudos são necessários para o melhor entendimento destes processos. Ao passo que AZA necessita experimentos adicionais aprofundados para esclarecer o seu papel no perfil funcional das MSCs, nossos achados fornecem dados importantes para o uso concomitante da terapia medicamentosa com DEX e MSCs.

7. CONCLUSÃO

- Foi possível isolar, expandir e caracterizar células-tronco mesenquimais de membrana coriônica humana de acordo com as normas da Sociedade Internacional de Terapia Celular;

- As drogas AZA e DEX nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M, respectivamente, não alteraram o ciclo celular das MSCs.

- A análise da migração celular por *transwell* demonstrou que MSCs tratadas com AZA apresentam maior migração de células em resposta a SDF-1, enquanto as MSCs cultivadas com DEX apresentam redução no comportamento migratório.

- O secretoma das MSCs foi alterado por DEX, apresentando proteínas envolvidas nos processos de migração e adesão celular, podendo estar relacionadas à motilidade prejudicada observada na análise do comportamento migratório das MSCs.

8. PERSPECTIVAS

Como sequência a este trabalho, serão realizadas:

- Avaliações morfológicas de MSCs cultivadas com AZA ou DEX por microscopia eletrônica;
- Avaliações do efeito terapêutico das MSCs em combinação com AZA ou DEX em modelo animal de colite ulcerativa aguda induzida por DSS.

9. REFERÊNCIAS

1. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105:1815-1822
2. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, *et al.* Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:341-352
3. Alm JJ, Heino TJ, Hentunen TA, *et al.* Transient 100 nM dexamethasone treatment reduces inter- and intraindividual variations in osteoblastic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18:658-666
4. Baghaban Eslaminejad M, Malakooty Poor E. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration. *World J Stem Cells*. 2014;6:344-354
5. Balklava Z, Verderio E, Collighan R, *et al.* Analysis of tissue transglutaminase function in the migration of Swiss 3T3 fibroblasts: the active-state conformation of the enzyme does not affect cell motility but is important for its secretion. *J Biol Chem*. 2002;277:16567-16575
6. Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, *et al.* Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17:1095-1107
7. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. 2012;380:1590-1605
8. Bernardo ME, Cometa AM, Pagliara D, *et al.* Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24:73-81
9. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:521-533

10. Burisch J, Munkholm P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013;29:357-362
11. Cataldi S, Codini M, Cascianelli G, *et al.* Nuclear lipid microdomain as resting place of dexamethasone to impair cell proliferation. *Int J Mol Sci.* 2014;15:19832-19846
12. Chen X, Gan Y, Li W, *et al.* The interaction between mesenchymal stem cells and steroids during inflammation. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1009
13. Chernoiivanenko IS, Minin AA. [Role of vimentin in cell migration]. *Ontogenez.* 2013;44:186-202
14. Chi Q, Yin T, Gregersen H, *et al.* Rear actomyosin contractility-driven directional cell migration in three-dimensional matrices: a mechano-chemical coupling mechanism. *J R Soc Interface.* 2014;11:20131072
15. Collino F, Bruno S, Incarnato D, *et al.* AKI Recovery Induced by Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Carrying MicroRNAs. *J Am Soc Nephrol.* 2015
16. Coumans JV, Gau D, Poljak A, *et al.* Profilin-1 overexpression in MDA-MB-231 breast cancer cells is associated with alterations in proteomics biomarkers of cell proliferation, survival, and motility as revealed by global proteomics analyses. *OMICS.* 2014;18:778-791
17. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-2213
18. Dave JM, Bayless KJ. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation.* 2014;21:333-344
19. De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, *et al.* Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med.* 2012;12:574-591

20. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99:3838-3843
21. Ding Z, Bae YH, Roy P. Molecular insights on context-specific role of profilin-1 in cell migration. *Cell Adh Migr*. 2012;6:442-449
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-317
23. Dubinsky MC. Optimizing immunomodulator therapy for inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2003;5:506-511
24. Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, *et al.* Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*. 2010;59:1662-1669
25. Feng T, Qin H, Wang L, *et al.* Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J Immunol*. 2011;186:6313-6318
26. Flores AI, Gómez-Gómez GJ, Masedo-González Á, *et al.* Stem cell therapy in inflammatory bowel disease: A promising therapeutic strategy? *World J Stem Cells*. 2015;7:343-351
27. Fu X, Han B, Cai S, *et al.* Migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by tumor necrosis factor-alpha and its possible role in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2009;17:185-191
28. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, *et al.* Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*. 1996;157:1261-1270

29. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, *et al.* Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1:2
30. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005;105:2821-2827
31. Gonçalves FaC, Schneider N, Pinto FO, *et al.* Intravenous vs intraperitoneal mesenchymal stem cells administration: what is the best route for treating experimental colitis? *World J Gastroenterol.* 2014;20:18228-18239
32. Gonçalves FdCS, Natália. Mello, Helena Flores. Passos, Eduardo Pandolfi., Meurer LC-L, Elizabeth. Paz, Ana Helena da Rosa. Characterization of Acute Murine Dextran Sodium Sulfate (DSS) Colitis: Severity of Inflammation is Dependent on the DSS Molecular Weight and Concentration *Acta Scientiae Veterinariae.* 2013;41 pp. 1142
33. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, *et al.* Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology.* 2009;136:978-989
34. Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, *et al.* Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut.* 2009;58:929-939
35. Goya L, Maiyar AC, Ge Y, *et al.* Glucocorticoids induce a G1/G0 cell cycle arrest of Con8 rat mammary tumor cells that is synchronously reversed by steroid withdrawal or addition of transforming growth factor-alpha. *Mol Endocrinol.* 1993;7:1121-1132
36. Grifoni SC, McKey SE, Drummond HA. Hsc70 regulates cell surface ASIC2 expression and vascular smooth muscle cell migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H2022-2030

37. Hass R, Kasper C, Böhm S, *et al.* Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011;9:12
38. Huang HR, Zan H, Lin Y, *et al.* Effects of azathioprine and infliximab on mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of rats in vitro. *Mol Med Rep.* 2014;9:1005-1012
39. Indumathi S, Harikrishnan R, Mishra R, *et al.* Comparison of feto-maternal organ derived stem cells in facets of immunophenotype, proliferation and differentiation. *Tissue Cell.* 2013;45:434-442
40. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, *et al.* Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res.* 2007;313:2050-2062
41. Kholodenko IV, Yarygin KN, Gubsky LV, *et al.* Intravenous xenotransplantation of human placental mesenchymal stem cells to rats: comparative analysis of homing in rat brain in two models of experimental ischemic stroke. *Bull Exp Biol Med.* 2012;154:118-123
42. Kim HS, Choi DY, Yun SJ, *et al.* Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res.* 2012;11:839-849
43. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 1996;84:359-369
44. Lazebnik LB, Kniazev OV, Konopliannikov AG, *et al.* [Allogeneic mesenchymal stromal cells in patients with ulcerative colitis: two years of observation]. *Eksp Klin Gastroenterol.* 2010:3-15
45. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371:1579-1586

46. Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, *et al.* Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells.* 2011;29:913-919
47. Lee MJ, Kim J, Kim MY, *et al.* Proteomic analysis of tumor necrosis factor- α -induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Proteome Res.* 2010;9:1754-1762
48. Li G, Zhang XA, Wang H, *et al.* Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord and placenta: implication in the migration. *Adv Exp Med Biol.* 2011;720:51-68
49. Li N, Wang C, Jia L, *et al.* Heart regeneration, stem cells, and cytokines. *Regen Med Res.* 2014;2:6
50. Li X, Bai J, Ji X, *et al.* Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med.* 2014;34:695-704
51. Lin Y, Lin L, Wang Q, *et al.* Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015;42:76-86
52. Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: insights into the secretome. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1834:2380-2384
53. Martínez-Montiel MeP, Gómez-Gómez GJ, Flores AI. Therapy with stem cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:1211-1227
54. Müller N, Fischer HJ, Tischner D, *et al.* Glucocorticoids induce effector T cell depolarization via ERM proteins, thereby impeding migration and APC conjugation. *J Immunol.* 2013;190:4360-4370
55. Múzes G, Molnár B, Sipos F. Regulatory T cells in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2012;18:5688-5694

56. Múzes G, Molnár B, Tulassay Z, *et al.* Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2012;18:5848-5861
57. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007;110:3499-3506
58. Navab R, Pedraza C, Fallavollita L, *et al.* Loss of responsiveness to IGF-I in cells with reduced cathepsin L expression levels. *Oncogene.* 2008;27:4973-4985
59. Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH, *et al.* Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2013;62:630-649
60. Nichols JE, Niles JA, DeWitt D, *et al.* Neurogenic and neuro-protective potential of a novel subpopulation of peripheral blood-derived CD133+ ABCG2+CXCR4+ mesenchymal stem cells: development of autologous cell-based therapeutics for traumatic brain injury. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4:3
61. Nurminskaya MV, Belkin AM. Cellular functions of tissue transglutaminase. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;294:1-97
62. Odii BO, Coussons P. Biological functionalities of transglutaminase 2 and the possibility of its compensation by other members of the transglutaminase family. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:714561
63. Ong WK, Sugii S. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45:1083-1086
64. Ordas I, Eckmann L, Talamini M, *et al.* Ulcerative colitis. *Lancet.* 2012;380:1606-1619
65. Park JY, Park MH, Park H, *et al.* TNF-alpha and TGF-beta1 gene polymorphisms and renal allograft rejection in Koreans. *Tissue Antigens.* 2004;64:660-666
66. Pearson DC, May GR, Fick GH, *et al.* Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med.* 1995;123:132-142

67. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, *et al.* NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:9-23
68. Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep.* 2011;63:629-642
69. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (1). *N Engl J Med.* 1991;325:928-937
70. Ponder A, Long MD. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin Epidemiol.* 2013;5:237-247
71. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med.* 2005;353:1711-1723
72. Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006;108:3938-3944
73. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008;64:753-767
74. Schneider N, Gonçalves FaC, Pinto FO, *et al.* Dexamethasone and azathioprine promote cytoskeletal changes and affect mesenchymal stem cell migratory behavior. *PLoS One.* 2015;10:e0120538
75. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut.* 1998;42:477-484
76. Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, *et al.* Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 2010;98:93-107
77. Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 2011;164:1-8

78. Sobczak M, Fabisiak A, Murawska N, *et al.* Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Rep.* 2014;66:766-775
79. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int.* 2013;2013:130763
80. Stricher F, Macri C, Ruff M, *et al.* HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy.* 2013;9:1937-1954
81. Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, *et al.* Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312:537-545
82. Tiede I, Fritz G, Strand S, *et al.* CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2003;111:1133-1145
83. Tsai JY, Lee MJ, Dah-Tsyr Chang M, *et al.* The effect of catalase on migration and invasion of lung cancer cells by regulating the activities of cathepsin S, L, and K. *Exp Cell Res.* 2014;323:28-40
84. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, *et al.* Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:6-21
85. Wang D, Sun L. Stem cell therapies for systemic lupus erythematosus: current progress and established evidence. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11:763-769
86. Wang X, Nelin LD, Kuhlman JR, *et al.* The role of MAP kinase phosphatase-1 in the protective mechanism of dexamethasone against endotoxemia. *Life Sci.* 2008;83:671-680
87. Xiao Y, Peperzak V, van Rijn L, *et al.* Dexamethasone treatment during the expansion phase maintains stemness of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010;4:374-386

88. Yaochite JN, Caliari-Oliveira C, de Souza LE, *et al.* Therapeutic efficacy and biodistribution of allogeneic mesenchymal stem cells delivered by intrasplenic and intrapancreatic routes in streptozotocin-induced diabetic mice. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:31
89. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.* 2012;35:213-221
90. Zhu Y, Yang Y, Zhang Y, *et al.* Placental mesenchymal stem cells of fetal and maternal origins demonstrate different therapeutic potentials. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5:48

10. APÊNDICE

Tabela 3. Anotação funcional das proteínas diferencialmente expressas nos grupos DEX e controle. Proteínas que apresentaram diferença estatística entre os grupos DEX e controle foram analisadas quanto à sua ontologia. Tabela mostrando a relação dos processos biológicos, divididos em proteínas com baixa expressão e alta expressão no grupo DEX, em comparação com o controle.

GO-ID	valor <i>P</i>	Processo biológico	Proteínas com baixa expressão no grupo DEX
30155	3,76E-03	regulation of cell adhesion	TGM2_HUMAN GDN_HUMAN CO1A1_HUMAN BGH3_HUMAN
7162	1,23E-02	negative regulation of cell adhesion	GDN_HUMAN CO1A1_HUMAN BGH3_HUMAN
48729	2,32E+00	tissue morphogenesis	TGM2_HUMAN PROF1_HUMAN CO1A1_HUMAN
35148	2,49E+00	tube formation	TGM2_HUMAN PROF1_HUMAN
90331	4,89E+00	negative regulation of platelet aggregation	GDN_HUMAN
90330	4,89E+00	regulation of platelet aggregation	GDN_HUMAN
48646	5,78E+00	anatomical structure formation involved in morphogenesis	TGM2_HUMAN PROF1_HUMAN CO1A1_HUMAN
18153	9,78E+00	isopeptide cross-linking via N6-(L-isoglutamyl)-L-lysine	TGM2_HUMAN
34111	9,78E+00	negative regulation of homotypic cell-cell adhesion	GDN_HUMAN
60346	9,78E+00	bone trabecula formation	CO1A1_HUMAN
18262	9,78E+00	isopeptide cross-linking	TGM2_HUMAN
18199	9,78E+00	peptidyl-glutamine modification	TGM2_HUMAN
30198	1,05E+01	extracellular matrix organization	CO1A1_HUMAN BGH3_HUMAN
90084	1,47E+01	negative regulation of inclusion body assembly	P08107
48711	1,47E+01	positive regulation of astrocyte differentiation	GDN_HUMAN
10757	1,47E+01	negative regulation of plasminogen activation	GDN_HUMAN
34505	1,47E+01	tooth mineralization	CO1A1_HUMAN
60605	1,47E+01	tube lumen cavitation	TGM2_HUMAN
60662	1,47E+01	salivary gland cavitation	TGM2_HUMAN
34110	1,96E+01	regulation of homotypic cell-cell adhesion	GDN_HUMAN
10755	1,96E+01	regulation of plasminogen activation	GDN_HUMAN
90083	2,44E+01	regulation of inclusion body assembly	P08107

43589	2,44E+01	skin morphogenesis	CO1A1_HUMAN
32964	2,44E+01	collagen biosynthetic process	CO1A1_HUMAN
1957	2,44E+01	intramembranous ossification	CO1A1_HUMAN
43062	2,52E+01	extracellular structure organization	CO1A1_HUMAN BGH3_HUMAN
9887	2,66E+01	organ morphogenesis	TGM2_HUMAN PROF1_HUMAN CO1A1_HUMAN
10955	2,93E+01	negative regulation of protein maturation by peptide bond cleavage	GDN_HUMAN
60351	2,93E+01	cartilage development involved in endochondral bone morphogenesis	CO1A1_HUMAN
32101	3,56E+01	regulation of response to external stimulus	TGM2_HUMAN GDN_HUMAN
48710	3,91E+01	regulation of astrocyte differentiation	GDN_HUMAN
35239	3,94E+01	tube morphogenesis	TGM2_HUMAN PROF1_HUMAN
2009	4,13E+01	morphogenesis of an epithelium	TGM2_HUMAN PROF1_HUMAN
9888	4,28E+01	tissue development	TGM2_HUMAN PROF1_HUMAN CO1A1_HUMAN
43277	4,40E+01	apoptotic cell clearance	TGM2_HUMAN
42026	4,40E+01	protein refolding	P08107
7601	4,57E+01	visual perception	CO1A1_HUMAN BGH3_HUMAN
50953	4,57E+01	sensory perception of light stimulus	CO1A1_HUMAN BGH3_HUMAN
51482	4,88E+01	elevation of cytosolic calcium ion concentration involved in G-protein signaling coupled to IP3 second messenger	TGM2_HUMAN
10953	4,88E+01	regulation of protein maturation by peptide bond cleavage	GDN_HUMAN
22408	4,88E+01	negative regulation of cell-cell adhesion	GDN_HUMAN
60343	4,88E+01	trabecula formation	CO1A1_HUMAN
70613	4,88E+01	regulation of protein processing	GDN_HUMAN
60325	5,37E+01	face morphogenesis	CO1A1_HUMAN
71363	5,37E+01	cellular response to growth factor stimulus	CO1A1_HUMAN
10543	5,37E+01	regulation of platelet activation	GDN_HUMAN
1958	5,86E+01	endochondral ossification	CO1A1_HUMAN
45687	6,35E+01	positive regulation of glial cell differentiation	GDN_HUMAN
1568	6,75E+01	blood vessel development	TGM2_HUMAN CO1A1_HUMAN
14015	6,83E+01	positive regulation of gliogenesis	GDN_HUMAN
48523	6,97E+01	negative regulation of cellular process	P08107 GDN_HUMAN CO1A1_HUMAN BGH3_HUMAN

1944	7,15E+01	vasculature development	TGM2_HUMAN CO1A1_HUMAN
GO-ID	Valor P	Processo biológico	Proteínas com alta expressão no grupo DEX
30199	9,54E-01	collagen fibril organization	CO3A1_HUMAN COCA1_HUMAN
7275	1,09E+00	multicellular organismal development	P07437 IBP7_HUMAN CO3A1_HUMAN PLOD1_HUMAN COCA1_HUMAN K1C9_HUMAN G6PI_HUMAN
8544	1,15E+00	epidermis development	CO3A1_HUMAN PLOD1_HUMAN K1C9_HUMAN
7398	1,47E+00	ectoderm development	CO3A1_HUMAN PLOD1_HUMAN K1C9_HUMAN
43588	1,52E+00	skin development	CO3A1_HUMAN K1C9_HUMAN
32502	1,93E+00	developmental process	P07437 IBP7_HUMAN CO3A1_HUMAN PLOD1_HUMAN COCA1_HUMAN K1C9_HUMAN G6PI_HUMAN
48731	4,80E+00	system development	P07437 CO3A1_HUMAN PLOD1_HUMAN COCA1_HUMAN K1C9_HUMAN G6PI_HUMAN
46947	5,59E+00	hydroxylysine biosynthetic process	PLOD1_HUMAN
46946	5,59E+00	hydroxylysine metabolic process	PLOD1_HUMAN
48856	8,08E+00	anatomical structure development	P07437 CO3A1_HUMAN PLOD1_HUMAN COCA1_HUMAN K1C9_HUMAN G6PI_HUMAN
30198	1,40E+01	extracellular matrix organization	CO3A1_HUMAN COCA1_HUMAN
32501	1,46E+01	multicellular organismal process	P07437 IBP7_HUMAN CO3A1_HUMAN PLOD1_HUMAN COCA1_HUMAN K1C9_HUMAN G6PI_HUMAN
7599	1,56E+01	hemostasis	CO3A1_HUMAN G6PI_HUMAN
50878	2,78E+01	regulation of body fluid levels	CO3A1_HUMAN G6PI_HUMAN
32964	2,79E+01	collagen biosynthetic process	CO3A1_HUMAN
43062	3,33E+01	extracellular structure organization	CO3A1_HUMAN COCA1_HUMAN

Tabela 4. Proteínas identificadas no secretoma dos grupos DEX e controle. Proteínas secretadas pelas MSCs na presença de DEX. Os valores do teste NSAF das repetições de controle (C) e DEX são mostrados nas colunas 4,5,6 e 7.

Proteínas identificadas	Número de acesso	Peso molecular	DEX 1	DEX 2	C1	C2	Valor P
<i>Glia-derived nexin</i>	C9JN98	30 kDa	0,012926	0,014767	0	0	0,0211
<i>Profilina-1</i>	PROF1	15 kDa	0,022048	0,020991	0	0	0,0078
<i>Alfa-enolase</i>	ENOA	47 kDa	0,0047415	0,006771	0	0	> 0,05
<i>Vimentina</i>	B0YJC4	50 kDa	0,011104	0,01051	0	0	0,0078
<i>Vinculina</i>	VINC	124 kDa	0	0,000864	0	0	> 0,05
<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2</i>	B4DIT7	69 kDa	0,0059907	0,005704	0	0	0,0078
<i>Colágeno alfa-1 (cadeia V)</i>	CO5A1	184 kDa	0,0016794	0,001066	0	0	> 0,05
<i>Piruvato Kinase</i>	KPYM	58 kDa	0,005813	0,009224	0	0	> 0,05

PKM							
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	BGH3	75 kDa	0,0030129	0,002868	0	0	0,0078
ATPase do retículo endoplasmático	TERA	89 kDa	0,0025531	0	0	0	> 0,05
Queratina tipo II, citoesquelético 2 (epidérmico)	K22E	65 kDa	0,0032203	0,003066	0,002681	0	> 0,05
Periostina	B1ALD9	90 kDa	0,0073844	0,00703	0	0,0035118	> 0,05
Colágeno alfa-1 (cadeia I)	CO1A1	139 kDa	0,039357	0,039477	0,01755	0,019051	0,0208
Colágeno alfa-1 (cadeia VI)	CO6A1	109 kDa	0,0040035	0,002859	0,001666	0,0014279	> 0,05
Queratina tipo II, citoesquelético 1	K2C1	66 kDa	0,0015977	0,001521	0,00266	0,0022794	> 0,05
Glypican-1	GPC1	62 kDa	0,0055317	0,007022	0,00307	0,0026307	> 0,05
Nidogênio-1	NID1	136 kDa	0,0024753	0,001571	0,001374	0,0011772	> 0,05
Alfa-actina 1	ACTN1	103 kDa	0,00632	0,004919	0,00188	0,0024513	> 0,05
Alfa-actina 4	ACTN4	105 kDa	0,00632	0,004919	0,00188	0,0024513	> 0,05
Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI 1)	PAI1	45 kDa	0,035832	0,026804	0,025565	0,010955	> 0,05
Filamina-A	FLNA	281 kDa	0,0011661	0,000735	0,000647	0,0022182	> 0,05
Filamina-C	FLNC	291 kDa	0,0011661	0,000735	0,000647	0,0022182	> 0,05
Colagenase tipo IV 72 kDa	MMP2	74 kDa	0,010913	0,008905	0,018167	0,020017	> 0,05
SPARC	SPRC	35 kDa	0,020374	0,016165	0,022612	0,0096892	> 0,05
Catepsina D (cadeia leve - fragmento)	C9JH19	33 kDa	0,007492	0,014266	0,008315	0,010689	> 0,05
Fibronectina	F8W7G7	243 kDa	0,018543	0,017654	0,017229	0,011074	> 0,05
Colágeno alfa-3 (cadeia VI)	CO6A3	344 kDa	0,011335	0,008017	0,008087	0,0083168	> 0,05
Trombopodina-1	TSP1	129 kDa	0,012312	0,012559	0,016104	0,018819	> 0,05
Colágeno alfa-2 (cadeia I)	CO1A2	129 kDa	0,015818	0,02725	0,016301	0,0096715	> 0,05
Actina (citoplasmática I)	ACTB	42 kDa	0,032925	0,036571	0,020548	0,050888	> 0,05
Colágeno alfa-1 (cadeia III)	CO3A1	139 kDa	0,0007018	0	0,004674	0,0030039	0,0439
Heat shock cognata 71KDa	E9PKE3	69 kDa	0,011149	0,009098	0,055681	0,065897	0,0383
Peroxirredoxina-1	PRDX1	22 kDa	0	0	0	0,0073765	> 0,05
Serpina	E9PIG2	17 kDa	0	0	0	0,0088965	> 0,05
Queratina tipo I, citoesquelético 10	K1C10	59 kDa	0	0	0	0,0025136	> 0,05
Serglicina	SRGN	18 kDa	0	0	0,021682	0	> 0,05
Tioredoxina Redutase 1	B2R5P6	55 kDa	0	0	0,006893	0	> 0,05
Tubulina (Cadeia alfa-1C)	F5H5D3	58 kDa	0	0	0,003798	0	> 0,05
Colágeno alfa-1 (cadeia XII)	COCA1	333 kDa	0	0	0,002796	0,0028754	0,0045
Glicose-6-fosfato isomerase	G6PI	63 kDa	0	0	0,00307	0,0026307	0,0245
Tenascina	F5H7V9_HUMAN	201 kDa	0	0	0,004669	0,0026677	> 0,05
Tubulina cadeia	Q5JP53_HUMAN	48 kDa	0	0	0,003858	0,0033061	0,0245

beta							
Transquetolase	B4E022_HUMAN	63 kDa	0	0	0,002749	0,0070686	> 0,05
Serina protease HTRA1 (fragmento)	H0Y7G9_HUMAN	24 kDa	0	0	0,007751	0,013284	> 0,05
Queratina tipo I citoesquelal 9	K1C9_HUMAN	62 kDa	0	0	0,002749	0,0023562	0,0245
Procolágeno-lisina,2-oxoglutarato 5-dioxigenase 1	B4DR87_HUMAN	88 kDa	0	0	0,002213	0,0018965	0,0245
Catepsina L1	CATL1_HUMAN	38 kDa	0	0	0,005144	0,0044082	0,0245
Fator de crescimento semelhante à insulina 7	IBP7_HUMAN	29 kDa	0	0	0,006074	0,0052054	0,0245