

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Raul Marques Rodrigues

CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO LISADO PLAQUETÁRIO

Porto Alegre

2019

Raul Marques Rodrigues

CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO LISADO PLAQUETÁRIO

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Coorientadora: Dra. Vanessa de Souza Valim

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Raul Marques
Caracterização da composição do lisado plaquetário
/ Raul Marques Rodrigues. -- 2019.
52 f.
Orientadora: Lúcia Mariano da Rocha Silla.

Coorientadora: Vanessa de Souza Valim.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Lisado de plaquetas. 2. Célula-tronco
mesenquimal. 3. Terapia celular. 4. Proteômica. 5.
Partículas. I. Silla, Lúcia Mariano da Rocha, orient.
II. Valim, Vanessa de Souza, coorient. III. Título.

Raul Marques Rodrigues

CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO LISADO PLAQUETÁRIO

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 03 de Dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Bruna Amorim - UCS

Prof. Dr. José Artur Bogo Chies - UFRGS

Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla - UFRGS

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Luciana Marques Rodrigues**, que não mediu esforços diariamente para me proporcionar condições físicas e emocionais de dedicar meu tempo aos estudos; ao meu pai **Luis Gustavo Rodrigues**, que me incentivou a iniciar a graduação e me ajudou com diversos contratempos; a minha irmã **Bianca Marques Rodrigues**, por quem tenho um carinho especial e me serve de exemplo de coragem; e às minhas avós **Maria de Lourdes Marques** e **Julieta Escandiel**, que sempre torceram pelo meu sucesso e me deram suporte financeiro em momentos de necessidade durante os seis longos anos de graduação.

À minha orientadora **Professora Dra Lúcia Mariano Rocha da Silla**, que me acolheu no seu laboratório do Hospital de Clínicas desde 2015 e me ensinou a *fazer* ciência, além de ser um exemplo de coragem e persistência. Sou extremamente grato pela oportunidade e confiança para contribuir com a pesquisa; além de sempre incentivar e acreditar em minha capacidade de crescimento pessoal e profissional.

À minha coorientadora **Dra Vanessa de Souza Valim**, que foi extremamente importante para mim durante a faculdade como mentora e amiga; que sempre esteve acessível, me ensinou e acompanhou *na bancada* durante a realização de diversos experimentos, além de ter me inspirado a realizar esse trabalho.

Aos colegas de faculdade **Alexandre Roberto Hickmann**, exemplo ímpar de amizade, determinação e foco; **Maia Calzia**, pelo companheirismo durante os períodos estressantes da graduação; **Giovana Panta Rodrigues da Silva**, pelo incentivo nos momentos finais dos estudos; **Bruna Serrão de Oliveira**, pelos sábios conselhos de vida; **Lucas Z. Suardi**, **Franciele Adam**, **Eloisa T. Massignam**, **Mônia Sartor** e **Leticia B. Caus** pelo carinho, amizade e companheirismo.

Aos colegas do Centro de Processamento Celular Avançado (CPCA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre **Alice Dahmer**, **Annelise Martins Pezzi da Silva**, **Bruna Amorim**, **Filipe Sehn**, **Gabriele Lenhart**, **Ianaê Wilke**, **Jeniffer Beatriz Ramos dos Anjos**, **Lara Antônia S. Valente**, **Maria Aparecida Lima da Silva**, **Nicole Daitx Kilian** pela convivência enriquecedora durante anos.

Aos pesquisadores **Flávia da Silveira Nathiely Fachel**, **Markus Berger de Oliveira**, **Prof. John Yates II**, **Prof. Helder Teixeira**, **Lucélia Santi**, **Rafael Rosa**, **Santiago Tobar**, **Walter Beys da Silva** que contribuíram de alguma forma para tornar esse trabalho possível.

RESUMO

A cultura de células *in vitro* utiliza diversas formulações de meios de cultura, os quais contêm uma fonte de fatores de crescimento; o padrão ouro atualmente utilizado para essa finalidade é o soro fetal bovino (SFB). Entretanto, existem alternativas melhores que superam sua eficácia e limitações. O uso do suplemento lisado plaquetário (LP) humano como substituto do SFB na cultura de células-tronco mesenquimais (CTM) humanas, por exemplo, é particularmente importante pois elimina o risco de xenorreação em pacientes tratados com essas células, além de evitar a transmissão de zoonoses, como a encefalopatia espongiforme bovina. Diversas agências regulatórias como a Organização Mundial da Saúde solicitaram a não utilização de suplementos de origem animal na manipulação de produtos biológicos que têm como finalidade a terapia em humanos. Produzido a partir de bolsas de plaquetas humanas descartadas pelo banco de sangue devido ao prazo de validade, o lisado plaquetário é uma fonte alternativa de fatores de crescimento atualmente viável, sustentável e segura para cultivo celular. Ele promove crescimento acelerado de CTMs em especial, permitindo a obtenção de uma dose terapêutica em menos tempo, mantendo características celulares imunofenotípicas e diferenciativas. A análise do conteúdo desse suplemento, porém, carece de dados, já que ele é preparado *in-house*, com variações dependendo do protocolo utilizado, sendo muitos protegidos por patente. Sabe-se que a ativação e rompimento das plaquetas no processo de coagulação sanguínea promove a liberação de mais de trezentas moléculas intracelulares em grânulos heterogêneos para o sangue, orquestrando diversas funções fisiológicas, como regeneração tecidual e angiogênese. No Centro de Processamento Celular Avançado (CPCA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre é utilizada grande quantidade de LP para diversos ensaios clínicos. Este trabalho busca, portanto, caracterizar a composição desse produto por metodologias não convencionalmente descritas na literatura, ao passo em que permite futuras investigações sobre seu modo de ação. Através da dosagem de proteínas totais foi observado que o LP possui $49,57 \pm 3,65$ mg/mL, concentração significativamente maior que o SFB ($30,54 \pm 1,76$ mg/mL); além disso, a análise proteômica por ontologia gênica e função proteica identificou proteínas relacionadas a proliferação, morfogênese, diferenciação, biossíntese, adesão e metabolismo celular, que estão sendo possivelmente metabolizadas ou recicladas pelas células. Ainda, foram detectadas proteínas responsáveis pela ligação e ativação dos fatores de crescimento TGF- β , HGF e IGF. Na análise de partículas por espalhamento dinâmico de luz observou-se a presença de um perfil heterogêneo e polidisperso de partículas, com dois padrões populacionais em 231 ± 96 d.nm com 61% de intensidade e em 30 ± 8 d.nm com 26% de intensidade; sendo possivelmente agregados proteicos ou distintas populações de vesículas, um importante meio de transporte de proteínas no microambiente celular. A realização de estudos como esse contribui essencialmente para a indústria biomédica, fornecendo dados para a melhor compreensão de diversos mecanismos moleculares envolvidos em terapia celular, impulsionando tecnologias na área da saúde e oferecendo alternativas melhores de tratamento para diversas patologias.

Palavras-chave: Lisado de plaquetas. Célula-tronco mesenquimal. Terapia celular. Proteômica. Partículas.

ABSTRACT

In vitro cell culture make use of several culture media formulations, that contain a source of growth factors; the gold standard currently used to this aim is fetal bovine serum (FBS). However, there are better alternatives that outweigh its effectiveness and limitations. The use of human platelet lysate (PL) as a substitute for FBS in human mesenchymal stem cell (MSC) culture is particularly important because it eliminates the xenoreaction risk in patients treated with these cells, as well as avoiding the zoonosis transmission, like bovine spongiform encephalopathy. Several health regulatory agencies such as the World Health Organization requested that animal origin supplements are not to be utilized in the manipulation of biological products purposed as therapy in humans. Made from expired human platelet bags discarded by the blood bank, the platelet lysate is an alternative source of growth factors actually viable, sustainable and safe to cell culture. It promotes MSCs faster growth in particular, allowing to achieve the required therapeutic dose in a shorter period of time, maintaining the immunophenotypic and differential cellular characteristics. The analysis of this supplement content, besides, lack data, since it is prepared *in-house*, with variations according to the utilized protocol, many being patent protected. It is known that the platelet activation and lysis in the blood coagulation process promote the release of more than three hundred intracellular molecules contained in heterogeneous granules to the bloodstream, which coordinate many physiological functions like tissue regeneration and angiogenesis. At the Advanced Cellular Processing Center (CPCA) from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a large amount of PL is utilized in several clinical trials. This work aim, therefore, to characterize this product composition by unconventional literature-described methodologies, while allowing further investigations about its mechanism of action. Through total protein quantification, it was observed that PL has $49,57 \pm 3,65$ mg/mL, a significant higher amount than FBS ($30,54 \pm 1,76$ mg/mL); besides, the proteomics analysis by gene ontology and protein function identified proteins related to cellular proliferation, morphogenesis, differentiation, biosynthesis, adhesion and metabolism, which are possibly being metabolized or having its structure recycled by cells. Also, several proteins responsible for activating and binding of the growth factors TGF- β , HGF and IGF were detected. Particle analysis through dynamic light scattering showed a heterogeneous and polydisperse profile of particles, with two population patterns at 231 ± 96 d.nm with 61% of intensity and at 30 ± 8 d.nm with 26% intensity; possibly being protein aggregates or distinct vesicle populations, an important way of protein transportation through the cellular microenvironment. Making studies like this one contribute essentially to the biomedical industry, with data to better comprehend several molecular mechanisms involved in cellular therapy, pushing healthcare technologies forward and offering patients better treatment options for several pathologies.

Keywords: Platelet lysate. Mesenchymal stem cell. Cellular therapy. Proteomics. Particles.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	7
1.1 LISADO PLAQUETÁRIO	7
1.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES	9
1.3 PROTEÔMICA.....	13
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	7
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	28
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CELLBIO.....	36

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 LISADO PLAQUETÁRIO

As condições de cultivo de células-tronco humanas em laboratório têm sido alvo de pesquisa, sendo um ponto importante quando se busca a expansão em larga escala e segurança na utilização clínica. Fatores que se destacam nesse assunto, por exemplo, são a variação da tensão de oxigênio, que simula o ambiente dessas células *in vivo*, e possivelmente afeta seu crescimento e efeito terapêutico; (MADRIGAL; RAO; RIORDAN, 2014) e o uso de suplementos alternativos aos de origem animal, que permitem um cultivo celular sustentável em relação ao meio ambiente, além de possivelmente promover maior segurança terapêutica. As células-tronco mesenquimais (CTM), por exemplo, são usualmente isoladas e purificadas a partir de medula óssea por um método baseado na sua propensão física de aderir ao substrato plástico dos frascos de cultura. São cultivadas em incubadora umidificada a 37 °C com 5% de CO₂ e 20% de oxigênio em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), sendo suplementadas com uma fonte de fatores de crescimento e antibiótico. A troca frequente de meio de cultura durante a fase inicial e as tripsinizações promovem a expansão e pureza da cultura, eliminando outros tipos celulares provenientes da medula óssea, como fibroblastos e adipócitos. Esse método é eficiente, consolidado e bem documentado na literatura, sendo que as células são cultivadas até a obtenção de uma dose necessária. É preferível cultivar as células por menos tempo, pois isso diminui a chance de ocorrência de variabilidade genética devido à extensa manipulação *in vitro*. Além disso, é possível obter a quantidade necessária de células para cultura e posterior uso clínico através da eluição de bolsa e filtro descartados após transplante de medula óssea. (VALIM, 2012)

A cultura *in vitro* de células, de forma geral, necessita de uma suplementação adequada, incluindo uma fonte de fatores de crescimento. O padrão ouro utilizado atualmente é o soro fetal bovino (SFB). Entretanto, existem alternativas que superam sua eficácia e limitações. Nesse caso, o destaque se dá para a utilização de lisado plaquetário humano (LP) como fonte de fatores de crescimento em substituição ao soro fetal bovino. (BURNOUF et al., 2015) O uso desse suplemento na cultura de células humanas é importante pois elimina o risco da transmissão de zoonoses, como a encefalopatia espongiforme bovina; e de xenorreação, ou seja, o desenvolvimento de anticorpos contra proteínas bovinas em pacientes infundidos com células cultivadas em SFB. (SUNDIN et al., 2007a) A detecção de vírus se dá

por painéis através da técnica da visualização de anticorpos por microscopia fluorescente; além disso, é realizada uma filtragem tripla em filtro 0.1 micrometros, além de testes para endotoxina e micoplasma. Diversas agências regulatórias, incluindo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), solicitaram a não utilização de suplementos de origem animal na manipulação de produtos biológicos que serão utilizados como terapia em humanos. (AGUZZI et al., 1997; GSTRAUNTHALER; LINDL; VAN DER VALK, 2013) Além disso, o LP promove um crescimento celular maior e sua produção se mostra sustentável, pois utiliza bolsas de plaquetas vencidas descartadas pelo banco de sangue, as quais já passaram por diversos testes de controle de qualidade. (BIEBACK, 2013; HEMEDA; GIEBEL; WAGNER, 2014; OIKONOMOPOULOS et al., 2015) A análise do conteúdo desse suplemento, porém, carece de dados, já que ele é preparado *in-house*, variando dependendo da técnica utilizada, sendo muitas protegidas por patente. (VALIM; SILLA, 2013a) Todavia, sabe-se que a *lise* das plaquetas gera muitos fatores de crescimento, como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGF- β (fator de transformação de crescimento beta), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), sendo um processo fisiológico importante para a angiogênese, por exemplo. (BOOMSMA; GEENEN, 2012; EPPLEY; WOODSELL; JOEL HIGGINS, 2004; GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015; MERINO-GONZÁLEZ et al., 2016) Ainda, foi observado por estudos que o soro fetal bovino depletado de microvesículas não é capaz de aumentar a proliferação celular. Então, pode-se atribuir parte do seu mecanismo de transporte de fatores de crescimento à essas micropartículas. (EITAN et al., 2015) Também verificou-se que vesículas presentes no SFB contém artefatos de RNA, fator que pode interferir em vários processos biológicos, sendo possivelmente contaminante para a cultura. (TOSAR et al., 2017) Técnicas para cultivo celular com o meio de cultura livre de fatores de crescimento ainda não estão consolidadas para uso em larga escala, portanto, para uso clínico o lisado plaquetário se mostra vantajoso sobre o soro fetal bovino em situações específicas como a citada de acordo com diversos aspectos.

O lisado plaquetário desse estudo é preparado de acordo com o método protegido por patente depositada (VALIM; SILLA, 2013b), descrito por V. Valim. (AMORIM; M, 2013) Este método consiste na utilização de bolsas de plaquetas descartadas pelo Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Unidade Básica de Saúde) devido ao prazo de validade vencido (três dias), após aprovação dos testes sorológicos dos doadores para as doenças infecciosas através de metodologias muito mais sensíveis e específicas que a

microscopia de fluorescência. É feito o teste para detecção de hepatite B, C, HIV-1 e 2, HTLV, sífilis, zika vírus, babesia, doença de chagas e citomegalovírus. As plaquetas passam por ciclos de congelamento e descongelamento, para que haja sua ativação e consequente rompimento. Elas são separadas em lotes contendo várias bolsas de doadores diferentes e armazenadas em *ultrafreezer* prévio a preparação do suplemento. Para o preparo do lisado de plaquetas, o conteúdo das bolsas é centrifugado para remoção de *debris* (fragmentos celulares) e o sobrenadante obtido é filtrado através de unidades de filtração a vácuo estéreis, como as *Stericup* (Milipore). O produto resultante é acrescido de heparina e aliqotado para futuro uso, momento no qual os testes de esterilidade do controle de qualidade são realizados para constatação da ausência de contaminação. Todo o procedimento é feito de acordo com as Boas Práticas de Manufatura (BPM), seguindo as RDCs vigentes, em um ambiente isolado específico para esse fim.

1.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES

Vesículas extracelulares são nanopartículas esféricas (30 – 500 nm) delimitadas por uma membrana bilipídica. Essas organelas são enriquecidas em fosfolipídeos e carregam uma variedade de proteínas, lipídeos e RNAs. Possuem uma nomenclatura e composição diferentes dependendo da fonte e processo celular de origem. Células em crescimento constantemente secretam essas vesículas, sendo elas essenciais para a comunicação entre células e o ambiente ‘micro’ do organismo (“*nanocosmo*” ou “*microcosmo*”), processo fundamental para qualquer ser vivo. Falhas no processo de sinalização celular em humanos são constantemente atribuídos como a causa de várias doenças hematológicas e cânceres. O processo de liberação de vesículas é um fenômeno evolutivamente conservado, sendo observado pela primeira vez em seres humanos nas décadas de 40 e 60 em plaquetas e, mais recentemente, em fungos, plantas e bactérias. Pode-se atribuir a descoberta das vesículas celulares ao pesquisador *Christian de Duve*, prêmio Nobel de 1974, por seus estudos com lisossomos na década de 60. (DUVE, 2005)

Essas partículas há muito tempo eram tidas somente como carreadoras de resíduos das células, não tendo outra importância se não a de auxiliar no processo de reciclagem e eliminação de componentes. Hoje em dia, sabe-se que quase todas as células podem secretá-las e que são essenciais para a manutenção de diversos processos biológicos como a homeostasia e resposta imune, pois podem realizar a transferência de proteínas e material

genético funcional, além de apresentar antígenos para outras células. (RAPOSO et al., 1996; RATAJCZAK et al., 2006a; VALADI et al., 2007) As vesículas também são importantes biomarcadores de diversas patologias, pois podem ser encontrados em fluídos biológicos (urina, plasma, líquido sinovial) e possuem moléculas específicas da célula de origem. (SKOG et al., 2008) Além disso, podem estar presentes no ar ou em superfícies, constituindo fatores de risco ambiental (poeira, solo) e em alimentos fermentados (queijo, cerveja, vinho). (PARK et al., 2014)

Atualmente há uma nomenclatura consideravelmente aceita pela comunidade científica baseada no seu processo biológico de origem: exossomos, derivados da origem endocítica (exocitose); ectosomos (ou microvesículas) oriundos de brotações ou protuberâncias da membrana plasmática; e corpos apoptóticos, originados no processo de apoptose. (RAPOSO; STOOORVOGEL, 2013) Deve-se atentar ao fato de que elas apresentam diferenças morfológicas de tamanho e conseqüentemente, de conteúdo e função. Atualmente não há marcadores biológicos que permitem a diferenciação com total certeza e os métodos de isolamento não possibilitam a separação homogênea de apenas um subtipo de vesículas extracelulares (apenas o enriquecimento do produto final isolado com o subtipo vesicular de interesse). (JEPPESEN et al., 2014)

Todas as vesículas extracelulares possuem moléculas na superfície de sua membrana plasmática, as quais permitem que essas estruturas se anexem a células. Após ligadas, as vesículas podem induzir sinalização molecular através de interações entre ligante e receptor, ou podem ser internalizadas pela célula alvo. Esse processo é seguido pela “entrega” do conteúdo das vesículas para o citosol da célula, modificando o estado fisiológico da mesma. (TKACH; THÉRY, 2016) Já que estas vesículas podem conter diversas moléculas, incluindo proteínas, lipídeos e RNA (CHOI et al., 2013; PEGTELA et al., 2010) parecem ser agentes importantes na sinalização de processos fisiológicos no *microcosmo*, onde órgãos e tecidos precisam se comunicar para manter a homeostasia. Essa comunicação é feita por uma gama de processos envolvendo os sistemas endócrino, nervoso e imune. Com o recente avanço da tecnologia, essas partículas representam uma forma inovadora de pensar na ciência que promete mudanças no processo diagnóstico e terapêutico (KALRA; DRUMMEN; MATHIVANAN, 2016; RASHED et al., 2017).

A função mais notável das vesículas na comunicação celular é a sua capacidade de realizar uma mudança no fenótipo celular, bem como alterações epigenéticas. No câncer, a

comunicação entre microvesículas e células ajuda a fazer a transferência de um fenótipo maligno de células tumorais para células não-tumorais, estabelecendo o chamado “*nicho tumoral*” e promovendo a metástase do tumor através da angiogênese. (MILLIMAGGI et al., 2007) De forma análoga, na terapia, podem ser importantes agentes ao reprogramar células-tronco adultas, por exemplo; (RATAJCZAK et al., 2006b) prevenindo a ativação da sinalização responsável pela infecção pulmonar e o desenvolvimento de hipertensão pulmonar, promovendo a regeneração de hepatócitos; (LEE et al., 2012) estimulando a diferenciação de fibroblastos por células epiteliais após lesão; entre outros. (BORGES et al., 2013)

O processo de captação das vesículas é rápido, dependente de energia e necessita de uma atividade normal do citoesqueleto celular. As vesículas podem ser captadas pelas células através dos processos de endocitose, fagocitose, (FENG et al., 2010) pinocitose e fusão de membranas (CHEN; SCHELLER, 2001). As vesículas extracelulares podem ser isoladas a partir de várias fontes de acordo com o propósito de estudo, incluindo meio de cultura e fluídos biológicos como sangue (JAYACHANDRAN et al., 2012), leite materno (ZONNEVELD et al., 2014), urina (DIJKSTRA et al., 2014; PISITKUN; SHEN; KNEPPER, 2004) e líquido cerebrospinal. (PEGTEL; PEFEROEN; AMOR, 2014; TIETJE et al., 2014) O método mais comumente utilizado para a separação dessas partículas é a ultracentrifugação diferencial, devido ao seu baixo custo e escalabilidade; é baseado em uma série de centrifugações para a remoção de células e *debris*, até a obtenção de uma fração concentrada em exossomos e microvesículas. Esse processo, porém, não diferencia exossomos, microvesículas e agregados proteicos, sendo necessário a aplicação de um gradiente de densidade para a obtenção de vesículas lipídicas de forma purificada. (THÉRY et al., 2001) A quantificação das vesículas pode ser feita pelo método espalhamento dinâmico de luz, técnica que mede o movimento browniano de micropartículas em solução aquosa. (GARDINER et al., 2013; RA et al., 2011) Os protocolos para o isolamento ainda são, de certa forma, experimentais e necessitam de uma avaliação, adaptação e validação prévias. É importante o estabelecimento de metodologias padrão, pois o campo de micropartículas é relativamente novo, sendo elas ainda não completamente compreendidas. (HOEN et al., 2012; VLIST et al., 2012) Algumas técnicas e metodologias foram validadas recentemente para situações específicas e diversas encontram-se em desenvolvimento. Assim, pode haver variações de entre diversos experimentos, já que, além de protocolos, condições e equipamentos diferentes podem ser fontes de variabilidade, por exemplo, e deve-se buscar a otimização dos

procedimentos. (RAD et al., 2016) Dessa forma, podem-se garantir melhores estudos nessa área, assim como fidelidade aos resultados através de critérios mínimos de análise e validação sugeridos pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV). (LÖTVALL et al., 2014)

O conteúdo das vesículas extracelulares depende primeiramente da fonte e do método de isolamento utilizado. De uma forma geral, pode-se classificar este conteúdo em proteínas, lipídeos, RNA e DNA. Diversos estudos relatam esse conteúdo como sendo variável e heterogêneo. (KOWALA et al., 2016) O conteúdo das vesículas tem sido relatado como semelhante ao analisado em células de origem, principalmente no que diz respeito a marcadores de membrana.

A suplementação responsável pelos fatores de crescimento utilizados na cultura celular *in vitro* (tradicionalmente soro fetal bovino, plasma rico em plaquetas, lisado plaquetário ou semelhantes) é tida como fonte de vesículas extracelulares. Basicamente, um dos mecanismos pelo qual o suplemento realiza a transferência de várias moléculas para as células é através dessas organelas, já que estudos demonstrando a utilização de suplementação depletada de vesículas reduziu a proliferação celular. (SHELKE et al., 2014) Atualmente existem estudos relatando a composição vesicular de plaquetas (DEAN et al., 2009; GARCIA et al., 2005), de plasma rico em plaquetas (PAVLOVIC et al., 2016) e de lisado plaquetário (AATONEN et al., 2014), porém os suplementos são preparados e utilizados com diversas metodologias diferentes. Um deles demonstra que os exossomos são responsáveis pelo efeito da atividade do lisado plaquetário nas células-tronco mesenquimais (TORREGGIANI et al., 2014a), porém, o mesmo se preocupa apenas em provar a hipótese levantada sobre mecanismo, e não avaliar o suplemento ou as vesículas *per se*. De qualquer forma, o uso de lisado plaquetário para a produção de alguns tipos de células-tronco para uso terapêutico para humanos é relatado na literatura como seguro (VALIM, 2012) e benéfico comparado a outros suplementos (BIEBACK, 2013), porém sua composição e modo de ação devem ser investigados, não existindo dados sobre sua composição em relação a micropartículas na literatura.

As plaquetas são há muito tempo estudadas pela comunidade científica, sendo importantes componentes do sistema circulatório para a manutenção da hemostasia, sistema imune, reparo tecidual e desenvolvimento. A ativação das plaquetas no processo de coagulação sanguínea promove a liberação de fatores contidos em grânulos para o sangue, os

quais orquestram diversas funções fisiológicas. (HEIJNEN et al., 1999) Esses grânulos são partículas heterogêneas, tendo seu perfil e composição definidos pelo mecanismo molecular de ativação das plaquetas. Eles podem participar, por exemplo, na resposta do tecido a lesão, fazendo a comunicação entre o tecido e fibroblastos, células musculares e endoteliais, promovendo a regeneração tecidual. Porém, as plaquetas secretam mais de trezentas moléculas intracelulares, participando também de processos prejudiciais ao organismo, como a metástase tumoral e arteriosclerose. (BADIMON et al., 2016) O equilíbrio entre esses fatores plaquetários e processos ainda não é completamente entendido, sendo a interação entre a secreção das plaquetas e tecidos no microambiente alvo de futura investigação. (JONNALAGADDA; IZU; WHITEHEART, 2012) Com relação a regeneração de uma lesão tecidual, por exemplo, um processo importante envolvido é a mobilização de fibroblastos. Um estudo conseguiu apresentar evidências de que exossomos derivados de plaquetas carregam fatores como bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos), PDGF-BB, VEGF, e TGF- β , responsáveis por promover a angiogênese e melhorando a regeneração tecidual *in vitro* e *in vivo*, descrita em modelo animal de lesão cutânea crônica. (GUO et al., 2017)

1.3 PROTEÔMICA

A proteômica é uma área de estudo que visa identificar e caracterizar proteínas e suas propriedades, como nível de expressão, modificações e interações. De uma forma geral, sua aplicação obtém uma visão integrada de um processo celular ou patológico. A espectrometria de massas permanece a técnica mais comumente utilizada e se baseia na identificação do tamanho de fragmentos peptídicos após digestão enzimática, pela razão de sua massa e carga. Os fragmentos são então comparados com um banco de dados e, dessa forma, sabe-se de qual proteína fazem parte e quantas vezes foram identificados pelo equipamento. A técnica tem suas limitações, como a dificuldade em visualizar proteínas com baixa expressão (baixo número de cópias por célula) devido ao fato de que proteínas maiores ou de alta expressão ofuscam sua detecção. As aplicações são variadas e incluem, por exemplo, a caracterização de marcadores diagnósticos e alvos terapêuticos ou farmacológicos. Softwares de bioinformática fazem a análise, usando ferramentas para o grande volume de informações gerado. (ASLAM et al., 2017)

Mais de 1100 proteínas foram identificadas em plaquetas utilizando técnicas de proteômica, embora esse tipo celular possua síntese e expressão proteica limitadas devido a não possuir núcleo, muitas proteínas são armazenadas ou herdadas de megacariócitos.

(SENZEL; GNATENKO; BAHOU, 2009) A análise proteômica de plaquetas pode promover dados para o entendimento de processos bioquímicos importantes; em especial as modificações pós-translacionais que as proteínas liberadas realizam sob outros tipos celulares. (BURKHART et al., 2014) Tendo em vista que a principal função das plaquetas é realizar a coagulação sanguínea após lesão tecidual, durante esse fenômeno há a liberação instantânea de lipídeos, RNA e proteínas. Ainda, quando armazenadas, ocorrem mudanças que alteram sua forma celular, aumentam a liberação de grânulos e proteínas, assim como a expressão de glicoproteínas. (THON et al., 2008) Isso refina o conhecimento acerca das propriedades das plaquetas, juntamente com estudos bioquímicos clássicos que focam na descrição linear de rotas do estímulo até a geração de efeito na função de outras células. As duas principais classes de grânulos secretados pelas plaquetas contêm várias proteínas: glicoproteínas de membrana que são incorporadas a outros tipos celulares, quimiocinas que regulam a migração e diferenciação leucocitária, fatores de crescimento, moléculas de adesão que exercem efeito em monócitos e células endoteliais, receptores celulares e citocinas que têm sua atividade promovida por estímulos específicos e ativam diversas rotas de sinalização, caderinas que têm um papel na adesão e junção de outros tipos celulares quando imunoprecipitadas. (SENIS; GARCÍA, 2012) Estima-se que mais da metade de todas essas proteínas interaja diretamente ou indiretamente com membranas celulares. (SENIS; GARCÍA, 2012)

Dessa forma, uma análise da composição proteica de suplementos, como o lisado de plaquetas, pode fornecer dados experimentais interessantes sobre o efeito promovido por ele no crescimento de células *in vitro*. Pode-se relatar a composição do conteúdo de suas partículas e proteínas solúveis, obtendo uma visão ampla de moléculas e processos envolvidos na sinalização entre células.

2 JUSTIFICATIVA

O soro fetal bovino é tradicionalmente um componente de meios de cultura celular, utilizado há mais de cinquenta anos na pesquisa biomédica. Ele é um “coquetel” natural composto por proteínas e metabólitos necessários para promover o crescimento, adesão e proliferação celular *in vitro*. Apesar disso, sua composição nunca foi completamente definida e possui certas questões controversas:

a) o método de obtenção vai contra os princípios de bem-estar animal e sustentabilidade no uso de recursos naturais. Por ser um subproduto da indústria da carne está sujeito a variações sazonais, geográficas e econômicas, além de políticas governamentais e ambientais;

b) a observação de anticorpos anti-proteína bovina em pacientes que participaram de ensaios clínicos para o tratamento de diversas doenças, recebendo infusões de células cultivadas na presença de SFB, ou seja, há risco de xenoreação;

c) seu uso em diversos produtos da indústria farmacêutica que têm como público-alvo os seres humanos gera preocupações quanto a aspectos de biossegurança, pois pode conter zoonoses ou contaminantes desconhecidos;

Dessa forma, existe um consenso global para a diminuição da utilização ou substituição desse reagente na produção de produtos para humanos. Nesse contexto, a produção de um suplemento sustentável e de origem humana ganha espaço, pois permite que questões financeiras, éticas, ambientais e biotecnológicas sejam resolvidas.

O lisado de plaquetas surge como um promissor substituto ao soro fetal bovino para o cultivo de alguns tipos celulares; entre eles, as células-tronco mesenquimais, que são possibilidade terapêutica para uma gama de doenças hematopoiéticas, lesões renais, hepáticas, pulmonares e ortopédicas. Em comparação a outros suplementos, o produzido localmente pelo grupo de pesquisa se destaca por sua eficácia, esterilidade e método de produção patenteado.

Entretanto, a composição e modo de ação desse suplemento permanecem desconhecidos, sabendo-se apenas que é baseado em partículas e proteínas. Se torna interessante estudar e avaliar esse produto, visando fornecer dados para o entendimento do seu conteúdo e como isso afeta as células *in vitro*. Dessa forma, pode-se aprimorar a preparação desse suplemento, assim como o produto final utilizado em terapia, melhorando tecnologias e tratamentos. Ao realizar uma busca na literatura, contata-se que não existem estudos realizando uma análise proteômica e de partículas totais desse tipo de suplemento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa caracterizar o suplemento lisado de plaquetas quanto ao seu conteúdo proteico e de partículas, visto que são suas características mais notáveis. Para isso, fará uso de metodologias não convencionais em comparação com as atualmente descritas na literatura. Dessa forma, busca-se primeiramente investigar fatores, aquém dos já conhecidos, que podem estar influenciando no seu modo de ação sob o crescimento celular *in vitro*.

Como consequência, haverá o desenvolvimento tecnológico de um produto biológico patenteado a base do conteúdo de plaquetas humanas, o qual já é utilizado tanto como agente terapêutico quanto como fonte de fatores de crescimento, substituindo produtos de origem animal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Identificar, de forma qualitativa, o conteúdo proteico do lisado de plaquetas através de espectrometria de massas acoplada a cromatografia multidimensional (tecnologia MudPit), buscando uma descrição ampla e variada da sua composição;

b) Determinar quantitativamente a concentração de proteínas totais do lisado plaquetário produzido pelo método patenteado;

c) Observar a presença relativa de partículas em amostras do suplemento e caracterizá-las em populações de acordo com o tamanho e frequência pela técnica de espalhamento dinâmico de luz;

d) Comparar os resultados com dados na literatura em relação a outros suplementos biológicos ou metodologias diferentes de produção, discutindo sua utilização como alternativa a outros produtos.

Human platelet lysate composition: what are we feeding cells with?

Raul Marques Rodrigues¹, Vanessa de Souza Valim¹, Annelise Pezzi Martins da Silva¹, Markus Berger³, Lúcia Mariano da Rocha Silla^{1,2}

¹ Advanced Cellular Processing Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

² Clinical Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³ Laboratory of Pharmacological Biochemistry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to: lsilla@hcpa.edu.br

How to cite this paper: Author 1, Author 2 and Author 3 (2019) Paper Title. *****, *, *.*.

http://dx.doi.org/10.4236/****.2019.****

Received: **** **, ***

Accepted: **** **, ***

Published: **** **, ***

Copyright © 2019 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Years ago, health regulatory agencies requested that animal origin supplements use should be avoided in biological products purposed as therapy in humans in order to avoid contamination and xenoreaction. Even though platelet lysate (PL) and several other growth factors sources are better alternatives to the current gold standard, fetal bovine serum (FBS), for clinical grade cell expansion, the alternative supplements content sometimes lacks data. They are made by non-standardized methods, with different protocols, many being patent-protected. It is known that activation and lysis of platelets in the blood coagulation process promote the release of proteins to the bloodstream, some contained in heterogeneous granules which coordinate many biological functions. At the Advanced Cellular Processing Center from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre in southern Brazil, a large amount of PL is utilized in several clinical trials. This work aims therefore to characterize this product rich composition by unconventional literature-described methodologies such as mass spectrometry and dynamic light scattering. Data revealed a diversified and high protein level, with some being related to growth factors and essential cellular processes. PL had $49,57 \pm 3,65$ mg/mL total protein, a significant higher amount than FBS ($30,54 \pm 1,76$ mg/mL); besides, the proteomics analysis by gene ontology and protein function identified proteins related to cellular proliferation, morphogenesis, differentiation, biosynthesis, adhesion and metabolism, which are possibly being metabolized or having its structure recycled by cells with higher affinity than its animal counterparts. Also, several proteins responsible for activating and binding of the TGF- β , HGF and IGF were detected. Two major nanoparticle populations with high dispersion level were found, at 231 ± 96 d.nm with 61% of intensity and at 30 ± 8 d.nm with 26% intensity; possibly being proteic aggregates or distinct vesicle populations, an important way of protein transportation through the cellular microenvironment. This kind of experimental analysis is important to the biomedical industry and environment, aiming to improve technologies, treatments, animal wellbeing and the basic knowledge about essential molecular processes.

Keywords

Platelet Lysate; Cellular Therapy; Proteomics; Mesenchymal Stem Cell; Growth Factors;

1. Introduction

Almost 40 years ago, it was found that platelet concentrates could support the proliferation of fibroblasts *in vitro* [1] due to their physiological function of wound healing – when activated, they undergo degranulation, releasing pro-inflammatory cytokines and chemokines that attract macrophages and granulocytes, causing the remodeling of vessels and tissue repair due to inflammation [2]. Their content, first called as ‘platelet dust’ by Wolf in 1967 [3], is composed by coagulation factors, adhesion molecules, growth factors, immunological molecules, chemokines and several other substances, which are either soluble or inside granules [4].

The gold standard source of growth factors for cell culture is fetal bovine serum (FBS), even though there are better alternatives that outweigh its limitations. Safety is a concern because it presents bovine antigens and can be a potential source for unknown pathogen transmission. Also, it has limited availability and ethical issues regarding its production method [5]–[7]. There is an urgent need for a replacement in clinical therapeutic product’s manufacturing, following health international guidelines and regulations [8]. It is already proven that platelet lysate, made by platelet content released upon lysis, is a viable and more efficient option than FBS, promoting faster cell growth, for example, in specific cases such as human mesenchymal stem cell culture [9].

Despite being a “cell nutritional cocktail”, the observed effect of the supplement’s in cell growth is mainly attributed to its rich content of soluble proteins such as growth factors, which can be also contained in released granules. *Torreggiani et al. (2014)*, proposed that microparticles constitute an efficient transport system from biomolecules on this context and can be the main effectors of PL activity, having an enriched content of bFGF, TGF- β 1, PDGF-BB and VEGF [10]. Today there are studies describing the vesicle content of platelets (6,7), platelet-rich-plasma [13] and platelet lysate [14], [15]; but they are prepared with different methodologies and have its limitations, for example, the latter focusing only in the expressed differential factors that may promote mesenchymal stem cell proliferation. The complete molecular mechanism of the supplements action remains unclear; even though it can be related to a higher protein affinity because of them having the same organism origin, for example, when cells bind and metabolize media proteins, possibly recycling some of their structure. *Burnouf et al. (2016)*, while reviewing several studies about platelet lysate composition, states that “*Proteomic analyses by two-dimensional electrophoresis and mass spectroscopy will likely be instrumental to further unveil the composition of HPL, being useful to its characterization and standardization*”.

There are several protocols to produce the platelet lysate that directly affect its content and regenerative potential. While FBS is also ill-defined, with significant content differences among batches [16]. Due to that, it is important to define PL content, quality and safety criteria as establishing a GMP-compliant supplement for clinical applications. Analyzing several batches of PL produced by a standardized production method would be useful for technological development, as it characterizes the composition and enriches the knowledge about essential molecular processes related to its mechanism of action on cultured cells. Based upon that, this work aims to investigate the protein and particle content, using proteomics (mass spectrometry through multidimensional protein identification technology - MudPit) and dynamic light scattering as experimental tools, being two non-conventional qualitative methods described in literature [17].

2. Materials and Methods

2.1. Platelet Lysates Preparation

The PL was prepared under Good Manufacturing Practices (GMP) conditions, based on the method described elsewhere [18], [19]. Briefly, platelet concentrate bags from 6 donors were obtained from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Blood Bank immediately before their expiration time. The bags were frozen at -80°C overnight and thawed at 37°C in the next day. This cycle was repeated five times. Next, the lysed product was transferred to 50 mL centrifuge tubes with 100 μm nylon cell strainers attached (CA21008-950, Falcon® Corning®) and centrifuged four times at 3220 g for 30 minutes. The supernatant was vacuum filtered through 0.22 μm filters (Millipore® Stericup™ filter units) and heparinized. The final product was negative for endotoxin (Endosafe® PTS™, Charles River) and bacteria (BacT/ALERT® aerobic and anaerobic Culture Media, bioMérieux). It was stored in aliquots at -80°C for up to 3 months prior to analysis. Twenty-one different batches' samples were used in this study.

2.2. Albumin Depletion

Two pools of PL were made, using batches one to five. One of them had its albumin content depleted. To do so, a volume of 1 mL from each sample was incubated at 1:1 proportion for 1 hour with Cibacron Blue 3GA agarose saline suspension (C1535, type 3000-CL, Sigma-Aldrich) at room temperature with constant agitation. After albumin bounding, the resin was removed washing the samples three times with 1 mL of a Tris HCl 50 MM solution and centrifugation at 7000 rpm for 5 minutes. Protein was quantified by BCA method (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) according to the manufacturer's protocol and read at a 96-well microplate reader (SpectraMax® 250, Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA) to ensure that samples had enough protein to the following analysis. To visualize the experimental albumin depletion protocol, a polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was made (*data not shown*).

2.3 Sample Preparation for Mass Spectrometry

Proteins were extracted in PBS buffer pH 7,4 containing 1 % of Triton X-100 with protease and phosphatase inhibitors (aprotinin 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptin 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pepstatin A 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PMSF 1 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM and DTT 1 mM). Samples (100 μg protein) were re-suspended on digestion buffer (100mM Tris-HCl pH 8.5 containing 8M urea). [20] Proteins were digested with 2 μg trypsin (Promega, Madison, WI) during 16 hours at 37°C . Digestion reaction was ended with the addition of 5% formic acid and samples were kept at -80°C prior to mass spectrometry analysis.

2.4 Mass Spectrometry and Bioinformatics Analysis

Mass spectrometry analysis was made with the MudPIT technology (Multidimensional Protein Identification Technology). The digested proteins were packed in a biphasic column containing 2,5 cm ionic exchange resin (Partisphere SCX) and 2 cm reversed phase resin (Acqua C18). [20] Twelve steps of NaCl separation were utilized, with a variant gradient between 0 and 100% of B buffer (80% acetonitrile/0.1 % formic acid). The peptides were loaded on a LTQ-XL-Orbitrap system (Thermo Fisher, USA), according to the manufacturer's protocol. MS/MS spectra were analyzed, with 3 Da tolerance, using the IP2

analysis package (www.integratedproteomics.com) to protein/peptide quantification and identification. The protein sequences stored at UniProt (www.uniprot.org) were used as database to identification, according to human species. Blast2GO (www.blast2go.org) [21] and PANTHER (www.pantherdb.org) [22] tools were used to categorize the detected proteins through Gene Ontology annotation (GO) according to biological process and molecular function.

2.5 Total Protein Quantification

Protein was quantified by BCA method (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) in all batches, according to the manufacturer's protocol and read at a 96-well microplate reader as triplets (SpectraMax® 250, Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA). Samples were previously diluted with Milli-Q water at 1:50 to match the kit detection's range.

2.6 Dynamic Light Scattering

Samples one to five were diluted 1:1000 in Milli-Q water on a volumetric flask and individually analyzed by dynamic light scattering. Three measurements were made for each sample. The droplet size and PDI were determined by photon correlation spectroscopy at 25 °C after appropriate dilution of samples in water. Measurements were performed using a Zetasizer Nano-ZS90® (Malvern Instruments, England, GB) equipment. Data was analyzed using the equipment's own software, version 7.12 [23].

3. Results

3.1 Proteomics

A total of 249 proteins were identified in both platelet lysate pools. The sample which content was albumin depleted revealed 37 additional proteins than the other one. A complete list of the identified proteins is provided in the **Supplementary Table 1**.

Even though it was a qualitative analysis, the major proteins found according to spectral count were serum albumin, serotransferrin, haptoglobin, apolipoproteins A/B, C3/C4 complements, hemopexin, ceruloplasmin, immunoglobulin chains, fibrinogen chains, actin, glycoproteins and plasminogen [14].

The most notable finding was six proteins associated with growth factors binding, transforming and activating, as follows: insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3), insulin-like growth factor-binding protein subunit (IGFALS), hepatocyte growth factor activator (HGFAC), hepatocyte growth factor-like protein (MST1), latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 (LTBP1) and transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (TGFBI).

Gene ontology score distribution by biological process (**Figure 1**) revealed more than a hundred genes related to stress response and vesicle-mediated transport, the main events upon platelet lysis; and many related to cell differentiation, morphogenesis, proliferation, adhesion and motility. Also, signal transduction and metabolic processes gene-related proteins were found.

Protein interaction and metabolic analysis were made but neither showed any significant results (*data not shown*). Regarding protein function, most of them were cytoskeletal, enzyme modulators, carriers, nucleic acid binders and signaling molecules. (**Figure 2**).

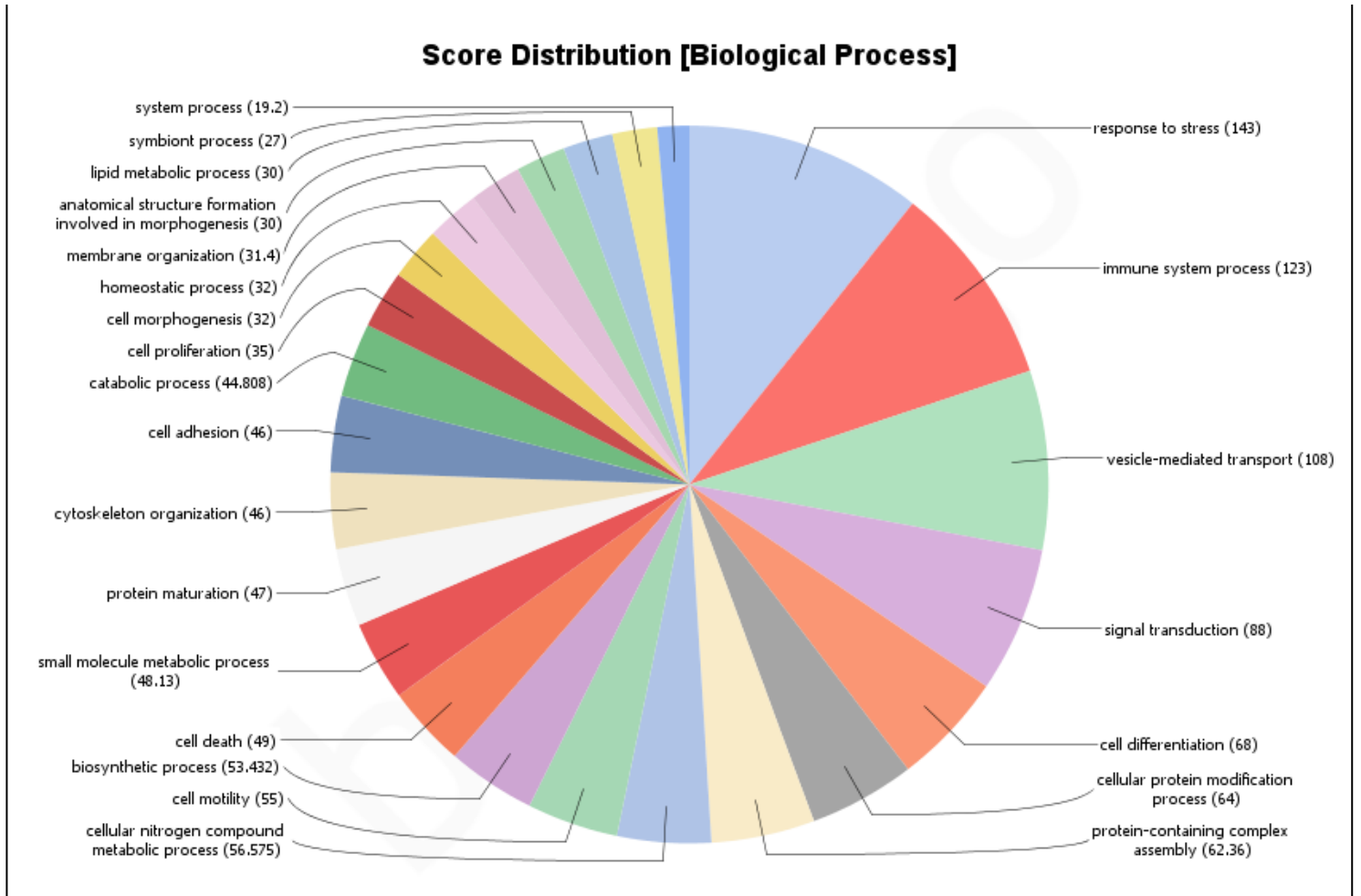


Figure 1. Blast2GO Gene Ontology.

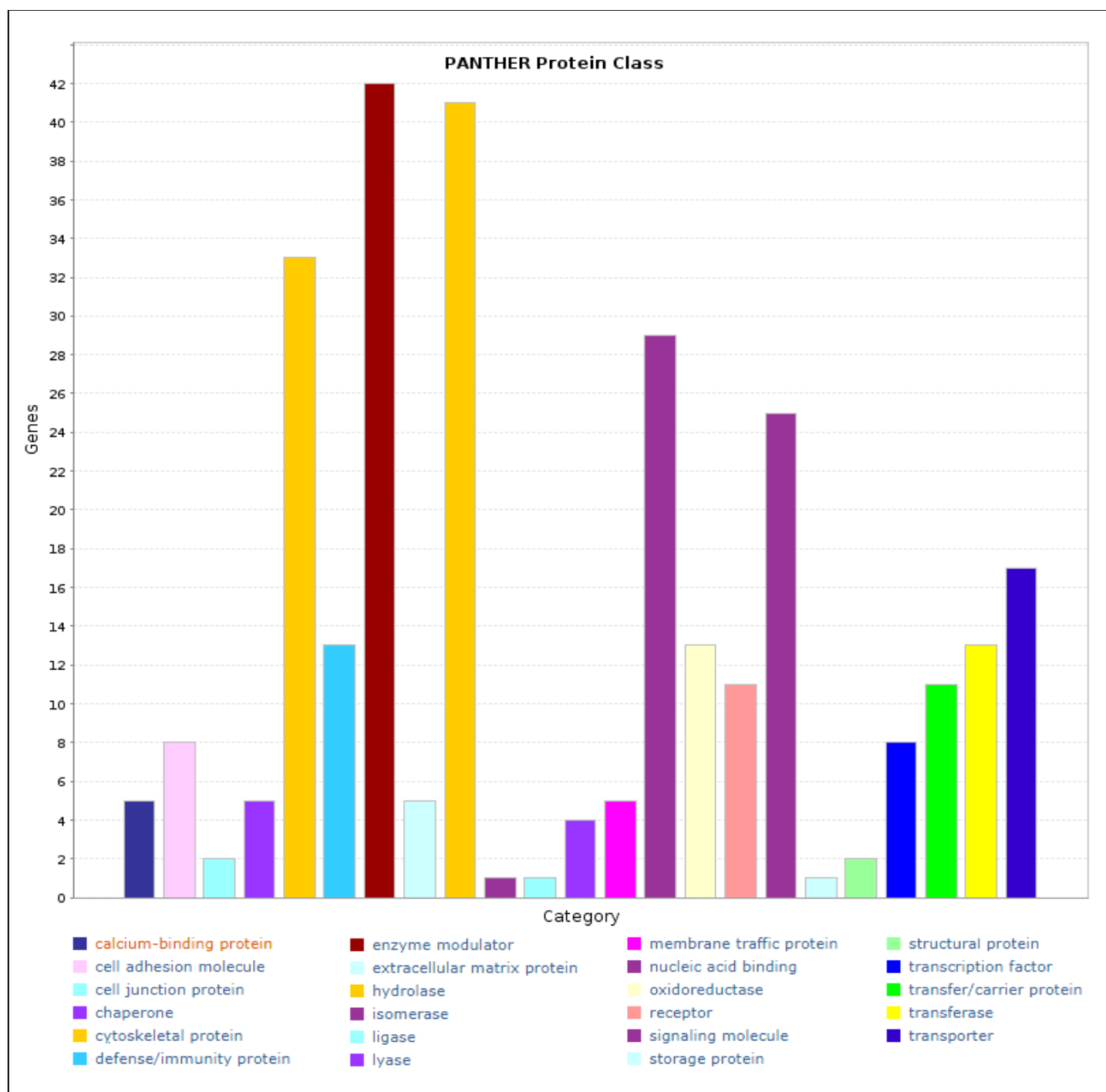


Figure 2. PANTHER classification for protein function.

3.2 Protein Quantification

Table 1. Protein levels.

Sample	Total protein^a
1	60,43
2	54,90
3	52,49
4	44,66
5	53,72
6	44,90
7	51,04
8	51,43
9	53,81
10	44,11
11	45,56
12	52,88
13	43,23
14	45,45
15	49,54
16	52,11
17	48,68
18	51,19
19	46,86
20	47,42
21	46,51
FBS1	34,00
FBS2	29,39
FBS3	30,00
FBS4	28,77

a. Units = mg/mL

LP mean = 49,57; SD = 3,65; Median = 49,54;

FBS mean = 30,54; SD = 1,73; Median = 29,69;

FBS1 = GIBCO lot 210390K; FBS2 = lot 210420K; FBS3 = lot 2130450K; FBS4 = lot 210475K.

3.3 Dynamic Light Scattering

Samples displayed heterogeneous Z-average values, with an asymmetrical pattern of two different sized peaks (**Figure 3**). The first at 231 d.nm with 61% intensity and a significant deviation of 96 d.nm; the second at 30 d.nm with 26% intensity and 8 d.nm deviation; the left 13% particles were spread across the 2000 to 5000 d.nm range.

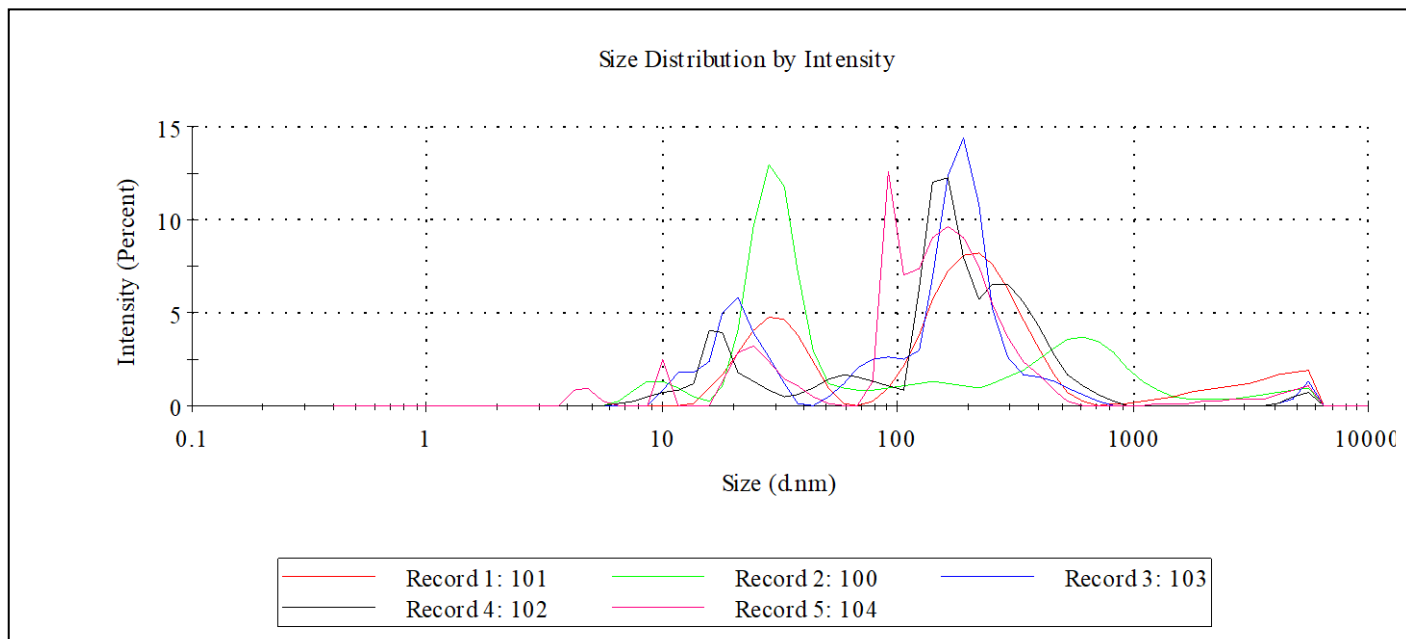


Figure 3. Particle characterization using ZetaSizer's Dynamic Light Scattering. Each color (line) represents a different batch mean.

When analyzing each sample results individually, there is no particle size with intensity above 30%. Particles were polydisperse according to a mean PdI of 0.6. Zeta potential was not measured.

4. Discussion

Albumin was depleted from samples because as a major plasma component, it could potentially hide less expressed proteins detection during mass spectrometry analysis. Although, the *in house* experimental protocol could not eliminate all albumin from samples because of its limitations, for example, resin capacity. Many found proteins are albumin-bound and were eliminated together with it from the depleted sample, because their spectral count decreased.

It was possible to identify a broad group of proteins with both pools. Together, these proteins could be making some kind of immunological and enzymatic environment that allows cells to grow and properly acquire their functions [14]. For example, an inflammatory microenvironment leads to a massive amplification of the paracrine capacity of MSCs and can be built by several proteins found, like CXC chemokines, CCL5, immunoglobulins [24, 25], fibroblast growth factor (FGF)-2, platelet-derived growth factor (PDGF)-BB and epidermal growth factor (EGF) highly increased proliferation rate and number of cell

doublings before reaching senescence [26]. The FGF family of molecules is associated with cell protection and survival under stress. Also, PDGF is a central molecule in wound healing [26].

Regarding TGF β family, important roles in tissue differentiation, homeostasis and repair are associated, which can change the proliferation, differentiation and migration of many cell types [27], [28]. It can upregulate insulin-like growth factor (IGF) and its binding protein (IGFBP)-3. The IGF system plays an important role in wound healing, and both IGF-I and IGFBP-3 are present in wound fluids, enhancing protein expression by tissue cells [29].

Rap1-mediated nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activity is capable of regulating the paracrine capacity of MSCs [29] and can promote cellular chemokine synthesis and MSCs migration [30]. Proteins associated with the glycoprotein fibrin, for example, thrombospondin, fibronectin, and vitronectin can bind to its matrix and be associated with vascularization, delaying fibrinolysis and increasing growth factors bioavailability and half-life.

As a hypothesis, cells supplied with platelet lysate could potentially recycle the structure of platelet proteins or make use of them, allowing them to grow faster than animal supplements, because of structure similarity. Some proteins could interact with higher affinity with cells for being from the same organism of origin, triggering growth factor binding, activating, cell signaling, metabolism and several other essential processes. It can occur through protein modifications such as phosphorylation, methylation, acetylation, glycosylation, sulphonation, alternative splicing or protein cleavage, giving rise to different protein forms.

The total protein content of several PL batches was quantified, stating that there is no significant difference among them. Regarding the difference observed from FBS, it is notable that total protein levels and mean from PL exceed with a significant value, which is already stated in several studies. Therefore, it should influence the difference in cell growth rate, which could also be related to other factors.

Even though the platelet particles were polydisperse and their size heterogeneous, two main peaks and their frequencies were determined, which could be protein aggregates after filtration or cellular vesicles [30]. Temperature could be interfering in its formation because in PL batches stored for a longer period of time than three months it was observed more particle frequency (*data not shown*). Its role as a signaling and delivery system is essential to cells and they can be further isolated and studied, having its potential exploited as many studies.

5. Conclusion

The view of the supplements protein content in a qualitative and differential manner was successful and gives data to better understand molecular processes that occurs in cell microenvironments. Also, the total protein content of several batches was quantified. It can be thought of that not only proteins as growth factors are important to the action of platelet lysate as a cell growth supplement, but also many other proteins that it contains; and its particles that act as a molecule delivery system. The main reason to conduct this study was to identify some of its composition, aiming to a better regulation of this product along with the biomedical industry, because it's a sustainable, safe and effective GMP-usable alternative to animal-based supplements in some specific therapeutic uses [30].

Acknowledgements

The study received financial support from the Research and Event Incentive Fund of Hospital

de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). It was approved by ethics committee under CAAE number 74368417300005327.

V. Valim and Silla, L. M. are both developers of the platelet lysate production method [31].

References

- [1] Y. Umeno, A. Okuda, and G. Kimura, "Proliferative behaviour of fibroblasts in plasma-rich culture medium," *J. Cell Sci.*, vol. 94, no. 3, pp. 567–575, 1989.
- [2] A. Brill, O. Dashevsky, J. Rivo, Y. Gozal, and D. Varon, "Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization," *Cardiovasc. Res.*, vol. 67, no. 1, pp. 30–38, 2005.
- [3] P. Wolf, "The nature and significance of platelet products in human plasma.," *Br. J. Haematol.*, vol. 13, no. 3, pp. 269–288, 1967.
- [4] T. Burnouf, D. Strunk, M. B. C. Koh, and K. Schallmoser, "Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation?," *Biomaterials*, vol. 76, pp. 371–387, 2016.
- [5] M. Sundin, O. Ringdén, B. Sundberg, S. Nava, C. Götherström, and K. Le Blanc, "No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients," *Haematologica*, vol. 92, no. 9, pp. 1208–1215, 2007.
- [6] A. Mackensen, R. Dräger, M. Schlesier, R. Mertelsmann, and A. Lindemann, "Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 49, no. 3, pp. 152–156, 2000.
- [7] C. Rauch *et al.*, "Alternatives to the use of fetal bovine serum: Human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media," *ALTEX*, vol. 28, no. 4, pp. 305–316, 2011.
- [8] G. Gstraunthaler, T. Lindl, and J. Van Der Valk, "A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media," *Cytotechnology*, vol. 65, no. 5, pp. 791–793, 2013.
- [9] V. Valim, B. Amorin, A. Pezzi, M. A. L. da Silva, A. P. Alegretti, and L. Silla, "Optimization of the Cultivation of Donor Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Use in Cellular Therapy," *CellBio*, vol. 3, pp. 25–33, 2014.
- [10] E. Torreggiani, F. Perut, L. Roncuzzi, N. Zini, S. R. Baglìo, and N. Baldini, "Exosomes: Novel effectors of human platelet lysate activity," *Eur. Cells Mater.*, vol. 28, pp. 137–151, 2014.
- [11] W. L. Dean, M. J. Lee, T. D. Cummins, D. J. Schultz, and D. W. Powell, "Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes," *Thrombosis Haemost.*, vol. 102, no. 4, pp. 711–718, 2009.
- [12] B. A. Garcia, D. M. Smalley, H. Cho, J. Shabanowitz, K. Ley, and D. F. Hunt, "The Platelet Microparticle Proteome," *J. Proteome Res.*, vol. 4, pp. 1516–1521, 2005.
- [13] V. Pavlovic, M. Ciric, V. Jovanovic, and P. Stojanovic, "Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components," *Open Med.*, vol. 11, pp. 242–247, 2016.
- [14] R. Crespo-Diaz *et al.*, "Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability," *Cell Transplant.*, vol. 20, no. 6, pp. 797–811, 2011.
- [15] S. Kinzebach, L. Dietz, H. Klüter, H. J. Thierse, and K. Bieback, "Functional and differential proteomic analyses to identify platelet derived factors affecting ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells," *BMC Cell Biol.*, vol. 14, no. 1, 2013.
- [16] P. J. Price and E. A. Gregory, "Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement," *In Vitro*, vol. 18, no. 6, pp. 576–584, 1982.
- [17] K. G. Pringle, K. L. Kind, A. N. Sferruzzi-Perri, J. G. Thompson, and C. T. Roberts, "Beyond oxygen: Complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy," *Hum. Reprod. Update*, vol. 16, no. 4, pp. 415–431, 2009.
- [18] J. E. Krieger *et al.*, "Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate," *Transfusion*, vol. 49, no. 12, pp. 2680–2685, 2009.

- [19] V. Valim, B. Amarin, A. Pezzi, M. Aparecida Lima da Silva, A. Paula Alegretti, and L. Silla, "Optimization of the Cultivation of Donor Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Use in Cellular Therapy," *CellBio*, vol. 03, no. 01, pp. 25–33, 2014.
- [20] W. O. Beys-Da-Silva *et al.*, "Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection," *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 5, pp. 2282–2296, 2014.
- [21] S. Götz *et al.*, "High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 10, pp. 3420–3435, 2008.
- [22] H. Mi *et al.*, "Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0)," *Nat. Protoc.*, vol. 14, no. 3, pp. 703–721, 2019.
- [23] F. N. S. Fachel *et al.*, "Box-Behnken design optimization of mucoadhesive chitosan-coated nanoemulsions for rosmarinic acid nasal delivery—In vitro studies," *Carbohydr. Polym.*, vol. 199, pp. 572–582, 2018.
- [24] G. E. White, A. J. Iqbal, and D. R. Greaves, "CC chemokine receptors and chronic inflammation—therapeutic opportunities and pharmacological challenges," *Pharmacol. Rev.*, vol. 65, no. 1, pp. 47–89, 2013.
- [25] C. A. Gleissner, P. Von Hundelshausen, and K. Ley, "Platelet chemokines in vascular disease," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 11, pp. 1920–1927, 2008.
- [26] B. Gharibi and F. J. Hughes, "Effects of Medium Supplements on Proliferation, Differentiation Potential, and In Vitro Expansion of Mesenchymal Stem Cells," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 1, no. 11, pp. 771–782, 2012.
- [27] N. Fekete *et al.*, "Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: Production process, content and identification of active components," *Cytotherapy*, vol. 14, no. 5, pp. 540–554, 2012.
- [28] J. Skonier, M. Neubauer, L. Madisen, K. Bennett, G. D. Plowman, and A. F. Purchio, "cDNA Cloning and Sequence Analysis of β ig-h3, a Novel Gene Induced in a Human Adenocarcinoma Cell Line after Treatment with Transforming Growth Factor- β ," *DNA Cell Biol.*, vol. 11, no. 7, pp. 511–522, 1992.
- [29] M. Y. Wu and C. S. Hill, "TGF- β Superfamily Signaling in Embryonic Development and Homeostasis," *Dev. Cell*, vol. 16, no. 3, pp. 329–343, 2009.
- [30] F. Lin, D. Xue, T. Xie, and Z. Pan, "HMGB1 promotes cellular chemokine synthesis and potentiates mesenchymal stromal cell migration via Rap1 activation," *Mol. Med. Rep.*, vol. 14, no. 2, pp. 1283–1289, 2016.
- [31] V. de S. Valim and L. M. da R. Silla, "Processo de obtenção de lisado de plaquetas com maior concentração de heparina," BR1020130311693A2, 2013.

X. Supplementary Table

accession	seq coverage	seq count	spec count	description
P02768;	77.2;	332	15811	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 ;
P02787;	66.8;	180	2135	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 ;
P00738;	55.9;	84	1798	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1 ;
P02652;	70;	51	977	Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1 ;
P01024;	42.8;	177	673	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 ;
P01023;	52.3;	170	662	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3 ;
P02790;	50;	63	411	Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2 ;
P00450;	44.8;	105	359	Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1 ;
P02671;	38.6;	77	324	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2 ;
P01860;	37.9;	43	318	Immunoglobulin heavy constant gamma 3 OS=Homo sapiens GN=IGHG3 PE=1 SV=2 ;
P01857;P0DOX5;	34.8;25.6;	42	316	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 ;Immunoglobulin gamma-1 heavy chain OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 ;
P02647;	77.9;	89	277	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 ;
POCOL5;	34.4;	101	273	Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=2 ;
POCOL4;	33.8;	101	270	Complement C4-A OS=Homo sapiens GN=C4A PE=1 SV=2 ;
P01861;	30.6;	34	267	Immunoglobulin heavy constant gamma 4 OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1 ;
P02675;	44;	70	265	Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2 ;
P01009;	43.1;	52	251	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3 ;
P19823;	30.1;	57	199	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2 ;
P60709;P63261;	48.8;48.8;	41	178	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 ;Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1 ;
P02679;	53.2;	43	154	Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG PE=1 SV=3 ;
P01859;	27.9;	32	154	Immunoglobulin heavy constant gamma 2 OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2 ;
P00747;	23.3;	36	142	Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2 ;
P04114;	8.6;	65	133	Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2 ;
P01876;	32.9;	30	128	Immunoglobulin heavy constant alpha 1 OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2 ;
Q9Y490;	17.4;	61	120	Talin-1 OS=Homo sapiens GN=TLN1 PE=1 SV=3 ;
P02774;	32.5;	36	119	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1 ;
P00751;	22.1;	44	117	Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2 ;
P01871;	29.6;	27	114	Immunoglobulin heavy constant mu OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=4 ;
P19827;	21.2;	37	114	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 OS=Homo

				sapiens GN=ITIH1 PE=1 SV=3 ;
Q14624;	29.8;	48	112	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4 ;
P0DOX6;	16.1;	23	107	Immunoglobulin mu heavy chain OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 ;
P04220;	23.5;	20	101	Ig mu heavy chain disease protein OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 ;
P02765;	32.2;	27	100	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1 ;
P04217;	33.5;	26	98	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4 ;
P62736;P68133;P68032;P63267;	22;22;22;22.1;	17	91	Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1 ;Actin, alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA1 PE=1 SV=1 ;Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1 ;Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTG2 PE=1 SV=1 ;
P06396;	28;	35	89	Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1 ;
P01008;	31.5;	26	82	Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1 ;
P04004;	24.1;	21	81	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1 ;
P01834;	84.1;	19	76	Immunoglobulin kappa constant OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=2 ;
P0DOX7;	43.5;	19	74	Immunoglobulin kappa light chain OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 ;
P06727;	33.8;	33	73	Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens GN=APOA4 PE=1 SV=3 ;
P27169;	54.1;	30	71	Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens GN=PON1 PE=1 SV=3 ;
P00739;	28.7;	27	70	Haptoglobin-related protein OS=Homo sapiens GN=HPR PE=2 SV=2 ;
P08603;	13;	35	69	Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH PE=1 SV=4 ;
P01877;	15;	13	64	Immunoglobulin heavy constant alpha 2 OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=4 ;
P21333;	10.4;	34	61	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4 ;
P0DOX2;	9.2;	10	61	Immunoglobulin alpha-2 heavy chain OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 ;
P0DOY3;	65.1;	12	61	Immunoglobulin lambda constant 3 OS=Homo sapiens GN=IGLC3 PE=1 SV=1 ;
P69905;	43;	22	56	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 ;
P00734;	28.9;	28	56	Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2 ;
POCF74;	46.2;	8	55	Immunoglobulin lambda constant 6 OS=Homo sapiens GN=IGLC6 PE=1 SV=1 ;
P19652;	26.4;	20	54	Alpha-1-acid glycoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=ORM2 PE=1 SV=2 ;
A0M8Q6;	41.5;	9	54	Immunoglobulin lambda constant 7 OS=Homo sapiens GN=IGLC7 PE=1 SV=3 ;
P68871;	57.1;	21	53	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2 ;
Q562R1;	7.2;	8	51	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 PE=1 SV=2 ;
P01031;	8.1;	22	49	Complement C5 OS=Homo sapiens GN=C5 PE=1 SV=4 ;

P02766;	64.6;	11	49	Transthyretin OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1 ;
P01019;	22.7;	17	45	Angiotensinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1 ;
P08567;	14.3;	14	44	Pleckstrin OS=Homo sapiens GN=PLEK PE=1 SV=3 ;
P02763;	24.9;	21	43	Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1 ;
Q96PD5;	17.9;	17	43	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase OS=Homo sapiens GN=PGLYRP2 PE=1 SV=1 ;
A5A3E0;Q9BYX7; Q6S8J3;	3.5;10.1;3.5;	12	40	POTE ankyrin domain family member F OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=1 SV=2 ;Putative beta-actin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=POTEKP PE=5 SV=1 ;POTE ankyrin domain family member E OS=Homo sapiens GN=POTEE PE=2 SV=3 ;
P04003;	11.7;	12	39	C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens GN=C4BPA PE=1 SV=2 ;
P01042;	15.1;	16	39	Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2 ;
P05155;	16.8;	12	39	Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPING1 PE=1 SV=2 ;
P20742;	3.9;	7	38	Pregnancy zone protein OS=Homo sapiens GN=PZP PE=1 SV=4 ;
P07996;	8.1;	14	35	Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens GN=THBS1 PE=1 SV=2 ;
P43652;	14.4;	16	34	Afamin OS=Homo sapiens GN=AFM PE=1 SV=1 ;
P02042;	26.5;	12	34	Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens GN=HBD PE=1 SV=2 ;
B9A064;P0DOX8; P0CG04;	27.6;27.3;55.7;	11	27	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=2 SV=2 ;Immunoglobulin lambda-1 light chain OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 ;Immunoglobulin lambda constant 1 OS=Homo sapiens GN=IGLC1 PE=1 SV=1 ;
O14791;	18.6;	13	26	Apolipoprotein L1 OS=Homo sapiens GN=APOL1 PE=1 SV=5 ;
P05546;	13;	11	26	Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPIND1 PE=1 SV=3 ;
P04196;	9.5;	11	26	Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens GN=HRG PE=1 SV=1 ;
P02775;	36.7;	10	26	Platelet basic protein OS=Homo sapiens GN=PPBP PE=1 SV=3 ;
P01011;	10.4;	13	25	Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2 ;
P0DOY2;	65.1;	6	24	Immunoglobulin lambda constant 2 OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1 ;
Q15942;	15.6;	11	24	Zyxin OS=Homo sapiens GN=ZYX PE=1 SV=1 ;
P07225;	11.1;	9	23	Vitamin K-dependent protein S OS=Homo sapiens GN=PROS1 PE=1 SV=1 ;
P08697;	13.6;	9	22	Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3 ;
P12814;	14.1;	19	22	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 PE=1 SV=2 ;
P22792;	8.8;	4	21	Carboxypeptidase N subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CPN2 PE=1 SV=3 ;
P13671;	9.1;	10	21	Complement component C6 OS=Homo sapiens GN=C6 PE=1 SV=3 ;
P02748;	12.2;	13	21	Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2 ;

P02751;	3.5;	10	18	Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4 ;
P07737;	28.6;	9	18	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2 ;
P10909;	11.4;	7	17	Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1 ;
P18206;	5.7;	6	16	Vinculin OS=Homo sapiens GN=VCL PE=1 SV=4 ;
P29622;	11.2;	5	15	Kallistatin OS=Homo sapiens GN=SERPINA4 PE=1 SV=3 ;
Q15404;	24.5;	9	15	Ras suppressor protein 1 OS=Homo sapiens GN=RSU1 PE=1 SV=3 ;
P00748;	12.8;	8	14	Coagulation factor XII OS=Homo sapiens GN=F12 PE=1 SV=3 ;
P00488;	8.1;	6	14	Coagulation factor XIII A chain OS=Homo sapiens GN=F13A1 PE=1 SV=4 ;
P35858;	11.9;	9	13	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit OS=Homo sapiens GN=IGFALS PE=1 SV=1 ;
P02776;P10720;	23.8;23.1;	6	13	Platelet factor 4 OS=Homo sapiens GN=PF4 PE=1 SV=2 ;Platelet factor 4 variant OS=Homo sapiens GN=PF4V1 PE=1 SV=1 ;
P37802;	17.1;	3	13	Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=3 ;
O95445;	33;	7	12	Apolipoprotein M OS=Homo sapiens GN=APOM PE=1 SV=2 ;
P35579;	2.7;	6	12	Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4 ;
P0CG38;	2.2;	5	12	POTE ankyrin domain family member I OS=Homo sapiens GN=POTEI PE=3 SV=1 ;
P02760;	13.6;	8	12	Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1 ;
P14618;	12.2;	6	12	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4 ;
A6NIZ1;P61224;	14.7;14.7;	4	11	Ras-related protein Rap-1b-like protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 ;Ras-related protein Rap-1b OS=Homo sapiens GN=RAP1B PE=1 SV=1 ;
P35442;	1.2;	3	11	Thrombospondin-2 OS=Homo sapiens GN=THBS2 PE=1 SV=2 ;
Q14520;	4.1;	4	10	Hyaluronan-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=HABP2 PE=1 SV=1 ;
P06312;	12.4;	4	10	Immunoglobulin kappa variable 4-1 OS=Homo sapiens GN=IGKV4-1 PE=1 SV=1 ;
P02750;	12.1;	6	10	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2 ;
P36955;	23.7;	8	10	Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=1 SV=4 ;
P02749;	8.7;	5	9	Beta-2-glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=APOH PE=1 SV=3 ;
P07358;	6.1;	3	9	Complement component C8 beta chain OS=Homo sapiens GN=C8B PE=1 SV=3 ;
P05156;	6.7;	6	9	Complement factor I OS=Homo sapiens GN=CFI PE=1 SV=2 ;
P35527;	7.7;	3	9	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 ;
Q01518;	7.4;	5	8	Adenyl cyclase-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=CAP1 PE=1 SV=5 ;
P02654;	27.7;	4	8	Apolipoprotein C-I OS=Homo sapiens GN=APOC1 PE=1 SV=1 ;
P08185;	2;	3	8	Corticosteroid-binding globulin OS=Homo sapiens

				GN=SERPINA6 PE=1 SV=1 ;
P04264;	2.5;	3	8	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 ;
P03952;	6.4;	3	8	Plasma kallikrein OS=Homo sapiens GN=KLKB1 PE=1 SV=1 ;
P61158;	8.9;	2	7	Actin-related protein 3 OS=Homo sapiens GN=ACTR3 PE=1 SV=3 ;
P02656;	27.3;	5	7	Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens GN=APOC3 PE=1 SV=1 ;
P06681;	2.9;	4	7	Complement C2 OS=Homo sapiens GN=C2 PE=1 SV=2 ;
Q9ULV4;	8.4;	4	7	Coronin-1C OS=Homo sapiens GN=CORO1C PE=1 SV=1 ;
P04406;	13.4;	4	7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3 ;
Q06033;	4.2;	5	7	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Homo sapiens GN=ITIH3 PE=1 SV=2 ;
P13645;	1.7;	1	7	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 ;
P35542;	17.7;	4	7	Serum amyloid A-4 protein OS=Homo sapiens GN=SAA4 PE=1 SV=2 ;
P67936;	13.7;	5	7	Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens GN=TPM4 PE=1 SV=3 ;
P15169;	12.4;	5	6	Carboxypeptidase N catalytic chain OS=Homo sapiens GN=CPN1 PE=1 SV=1 ;
P02746;	5.9;	3	6	Complement C1q subcomponent subunit B OS=Homo sapiens GN=C1QB PE=1 SV=3 ;
Q03591;	6.7;	4	6	Complement factor H-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=CFHR1 PE=1 SV=2 ;
O43707;	4.1;	5	5	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2 ;
Q961Y4;	11.1;	4	5	Carboxypeptidase B2 OS=Homo sapiens GN=CPB2 PE=1 SV=2 ;
Q8TCS7;	3.7;	4	5	Complement component C7 OS=Homo sapiens GN=C7 PE=1 SV=2 ;
O75636;	10;	3	5	Ficolin-3 OS=Homo sapiens GN=FCN3 PE=1 SV=2 ;
O75369;Q14315;	0.4;0.4;	3	5	Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB PE=1 SV=2 ;Filamin-C OS=Homo sapiens GN=FLNC PE=1 SV=3 ;
P18428;	3.7;	4	5	Lipopolysaccharide-binding protein OS=Homo sapiens GN=LBP PE=1 SV=3 ;
P40197;	5.2;	4	5	Platelet glycoprotein V OS=Homo sapiens GN=GP5 PE=1 SV=1 ;
P0CG39;	1.3;	3	5	POTE ankyrin domain family member J OS=Homo sapiens GN=POTEJ PE=3 SV=1 ;
Q9H299;	35.5;	5	5	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=SH3BGL3 PE=1 SV=1 ;
P25311;	10.7;	3	5	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=1 SV=2 ;
P00915;	9.6;	1	4	Carbonic anhydrase 1 OS=Homo sapiens GN=CA1 PE=1 SV=2 ;
P07357;	4.8;	4	4	Complement component C8 alpha chain OS=Homo sapiens GN=C8A PE=1 SV=2 ;
P07360;	22.3;	4	4	Complement component C8 gamma chain OS=Homo sapiens GN=C8G PE=1 SV=3 ;
P27918;	2.3;	3	4	Properdin OS=Homo sapiens GN=CFP PE=1 SV=2 ;
PODJI8;	28.7;	3	4	Serum amyloid A-1 protein OS=Homo sapiens GN=SAA1 PE=1 SV=1 ;

P60174;	4.5;	2	4	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 PE=1 SV=3 ;
P06753;	2.8;	2	4	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=1 SV=2 ;
P35609;	2.8;	3	3	Alpha-actinin-2 OS=Homo sapiens GN=ACTN2 PE=1 SV=1 ;
P02649;	7.3;	3	3	Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1 ;
P09871;	4.7;	2	3	Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1 ;
P36980;	4.1;	2	3	Complement factor H-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=CFHR2 PE=1 SV=1 ;
P22352;	7.5;	1	3	Glutathione peroxidase 3 OS=Homo sapiens GN=GPX3 PE=1 SV=2 ;
Q14766;	0.8;	2	3	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=LTBP1 PE=1 SV=4 ;
O00151;	9.4;	2	3	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Homo sapiens GN=PDLIM1 PE=1 SV=4 ;
P32119;	9.1;	3	3	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5 ;
P27348;P63104;P31946;	3.7;3.7;3.7;	1	2	14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1 ;14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 ;14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB PE=1 SV=3 ;
P59998;	17.3;	2	2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=ARPC4 PE=1 SV=3 ;
P06733;	6.9;	1	2	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 ;
P02655;	20.8;	1	2	Apolipoprotein C-II OS=Homo sapiens GN=APOC2 PE=1 SV=1 ;
P43251;	3.1;	1	2	Biotinidase OS=Homo sapiens GN=BTD PE=1 SV=2 ;
Q9UBW5;	4.1;	1	2	Bridging integrator 2 OS=Homo sapiens GN=BIN2 PE=1 SV=3 ;
P0DP23;P0DP25;P0DP24;	22.8;22.8;22.8;	1	2	Calmodulin-1 OS=Homo sapiens GN=CALM1 PE=1 SV=1 ;Calmodulin-3 OS=Homo sapiens GN=CALM3 PE=1 SV=1 ;Calmodulin-2 OS=Homo sapiens GN=CALM2 PE=1 SV=1 ;
O95810;	3.3;	2	2	Caveolae-associated protein 2 OS=Homo sapiens GN=CAVIN2 PE=1 SV=3 ;
P06276;	5.1;	1	2	Cholinesterase OS=Homo sapiens GN=BCHE PE=1 SV=1 ;
Q86UX7;	6.1;	2	2	Fermitin family homolog 3 OS=Homo sapiens GN=FERMT3 PE=1 SV=1 ;
P23142;	7.3;	2	2	Fibulin-1 OS=Homo sapiens GN=FBLN1 PE=1 SV=4 ;
P02100;P69892;P69891;	6.8;6.8;6.8;	2	2	Hemoglobin subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=HBE1 PE=1 SV=2 ;Hemoglobin subunit gamma-2 OS=Homo sapiens GN=HBG2 PE=1 SV=2 ;Hemoglobin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=HBG1 PE=1 SV=2 ;
Q13418;	3.1;	1	2	Integrin-linked protein kinase OS=Homo sapiens GN=ILK PE=1 SV=2 ;
P51884;	5.3;	2	2	Lumican OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2 ;
P48740;	4.4;	2	2	Mannan-binding lectin serine protease 1 OS=Homo sapiens GN=MASP1 PE=1 SV=3 ;
P08571;	4.8;	2	2	Monocyte differentiation antigen CD14 OS=Homo sapiens GN=CD14 PE=1 SV=2 ;
Q9UNW1;	4.9;	1	2	Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=MINPP1 PE=1 SV=1 ;

P07359;	6.4;	2	2	Platelet glycoprotein Ib alpha chain OS=Homo sapiens GN=GP1BA PE=1 SV=2 ;
P07237;	9.8;	2	2	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3 ;
Q92928;Q9H0U4;	7.5;7.5;	1	2	Putative Ras-related protein Rab-1C OS=Homo sapiens GN=RAB1C PE=5 SV=2 ;Ras-related protein Rab-1B OS=Homo sapiens GN=RAB1B PE=1 SV=1 ;
P02753;	14.4;	2	2	Retinol-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=RBP4 PE=1 SV=3 ;
P0DMM9;P50226;P50225;P0DMN0;	7.1;7.1;7.1;7.1;	1	2	Sulfotransferase 1A3 OS=Homo sapiens GN=SULT1A3 PE=1 SV=1 ;Sulfotransferase 1A2 OS=Homo sapiens GN=SULT1A2 PE=1 SV=2 ;Sulfotransferase 1A1 OS=Homo sapiens GN=SULT1A1 PE=1 SV=3 ;Sulfotransferase 1A4 OS=Homo sapiens GN=SULT1A4 PE=1 SV=1 ;
P05543;	7;	2	2	Thyroxine-binding globulin OS=Homo sapiens GN=SERPINA7 PE=1 SV=2 ;
Q8NDD1;	3.4;	1	2	Uncharacterized protein C1orf131 OS=Homo sapiens GN=C1orf131 PE=1 SV=3 ;
P04070;	7.6;	2	2	Vitamin K-dependent protein C OS=Homo sapiens GN=PROC PE=1 SV=1 ;
P04275;	0.5;	1	2	von Willebrand factor OS=Homo sapiens GN=VWF PE=1 SV=4 ;
P61981;	7.7;	1	1	14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens GN=YWHAG PE=1 SV=2 ;
O95236;	1.7;	1	1	Apolipoprotein L3 OS=Homo sapiens GN=APOL3 PE=1 SV=3 ;
P53396;	1.6;	1	1	ATP-citrate synthase OS=Homo sapiens GN=ACLY PE=1 SV=3 ;
Q9HBI1;	3.3;	1	1	Beta-parvin OS=Homo sapiens GN=PARVB PE=1 SV=1 ;
P60953;	8.9;	1	1	Cell division control protein 42 homolog OS=Homo sapiens GN=CDC42 PE=1 SV=2 ;
O00299;	3.7;	1	1	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=CLIC1 PE=1 SV=4 ;
P12259;	0.6;	1	1	Coagulation factor V OS=Homo sapiens GN=F5 PE=1 SV=4 ;
P05160;	4.1;	1	1	Coagulation factor XIII B chain OS=Homo sapiens GN=F13B PE=1 SV=3 ;
P23528;	16.9;	1	1	Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=1 SV=3 ;
Q9UNS2;	2.6;	1	1	COP9 signalosome complex subunit 3 OS=Homo sapiens GN=COPS3 PE=1 SV=3 ;
P31146;	1.7;	1	1	Coronin-1A OS=Homo sapiens GN=CORO1A PE=1 SV=4 ;
P14625;	2.4;	1	1	Endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1 ;
P47756;	9;	1	1	F-actin-capping protein subunit beta OS=Homo sapiens GN=CAPZB PE=1 SV=4 ;
P04792;	7.8;	1	1	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2 ;
Q04756;	2;	1	1	Hepatocyte growth factor activator OS=Homo sapiens GN=HGFA PE=1 SV=1 ;
P26927;	1.4;	1	1	Hepatocyte growth factor-like protein OS=Homo sapiens GN=MST1 PE=1 SV=2 ;
Q86YZ3;	0.5;	1	1	Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 ;
Q27J81;	1;	1	1	Inverted formin-2 OS=Homo sapiens GN=INF2 PE=1 SV=2 ;

P00338;	6.3;	1	1	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2 ;
P07195;	6;	1	1	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2 ;
Q8N6R0;	1.7;	1	1	Methyltransferase-like protein 13 OS=Homo sapiens GN=METTL13 PE=1 SV=1 ;
Q96RD6;	6.5;	1	1	Pannexin-2 OS=Homo sapiens GN=PANX2 PE=2 SV=2 ;
P23284;	6.5;	1	1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PPIB PE=1 SV=2 ;
P01833;	1;	1	1	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo sapiens GN=PIGR PE=1 SV=4 ;
Q99590;	1.2;	1	1	Protein SCAF11 OS=Homo sapiens GN=SCAF11 PE=1 SV=2 ;
Q92954;	1.2;	1	1	Proteoglycan 4 OS=Homo sapiens GN=PRG4 PE=1 SV=2 ;
P12931;	6.2;	1	1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src OS=Homo sapiens GN=SRC PE=1 SV=3 ;
P62834;	6.5;	1	1	Ras-related protein Rap-1A OS=Homo sapiens GN=RAP1A PE=1 SV=1 ;
P52566;	4.5;	1	1	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 OS=Homo sapiens GN=ARHGDIB PE=1 SV=3 ;
Q13277;	6.2;	1	1	Syntaxin-3 OS=Homo sapiens GN=STX3 PE=1 SV=3 ;
Q15582;	2.2;	1	1	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 OS=Homo sapiens GN=TGFBI PE=1 SV=1 ;
P07951;	3.9;	1	1	Tropomyosin beta chain OS=Homo sapiens GN=TPM2 PE=1 SV=1 ;
O75083;	2.3;	1	1	WD repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=WDR1 PE=1 SV=4 ;

***FROM ALBUMIN-DEPLETED SAMPLE:**

P31946;	11.8;	3	5	14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB PE=1 SV=3 ;
P63104;	18;	3	4	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 ;
P52209;	2.9;	1	1	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens GN=PGD PE=1 SV=3 ;
P61160;	6.3;	1	1	Actin-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTR2 PE=1 SV=1 ;
Q96KN2;	3.7;	1	2	Beta-Ala-His dipeptidase OS=Homo sapiens GN=CNDP1 PE=1 SV=4 ;
P41238;	6.4;	1	1	C- U-editing enzyme APOBEC-1 OS=Homo sapiens GN=APOBEC1 PE=1 SV=3 ;
P20851;	5.6;	1	2	C4b-binding protein beta chain OS=Homo sapiens GN=C4BPB PE=1 SV=1 ;
O43866;	6.3;	3	6	CD5 antigen-like OS=Homo sapiens GN=CD5L PE=1 SV=1 ;
P02747;	11.4;	3	3	Complement C1q subcomponent subunit C OS=Homo sapiens GN=C1QC PE=1 SV=3 ;
P63241;	14.9;	1	1	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Homo sapiens GN=EIF5A PE=1 SV=2 ;
Q16610;	2.2;	1	1	Extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens GN=ECM1 PE=1 SV=2 ;
P04075;P09972;	7.4;7.4;	2	3	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2 ;Fructose-bisphosphate aldolase C OS=Homo sapiens GN=ALDOC PE=1 SV=2 ;

Q3ZCW2;	11;	1	2	Galectin-related protein OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2 ;
P78417;	5.8;	1	1	Glutathione S-transferase omega-1 OS=Homo sapiens GN=GSTO1 PE=1 SV=2 ;
O60814;Q99880;Q99879;Q99877;Q93079;Q8N257;Q5QNW6;Q16778;P62807;P58876;P57053;P33778;P23527;P06899;	11.9;11.9;11.9;11.9;11.9;1.9;11.9;11.9;11.9;11.9;11.9;	1	2	Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BK PE=1 SV=3 ;Histone H2B type 1-L OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BL PE=1 SV=3 ;Histone H2B type 1-M OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BM PE=1 SV=3 ;Histone H2B type 1-N OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BN PE=1 SV=3 ;Histone H2B type 1-H OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BH PE=1 SV=3 ;Histone H2B type 3-B OS=Homo sapiens GN=HIST3H2BB PE=1 SV=3 ;Histone H2B type 2-F OS=Homo sapiens GN=HIST2H2BF PE=1 SV=3 ;Histone H2B type 2-E OS=Homo sapiens GN=HIST2H2BE PE=1 SV=3 ;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BC PE=1 SV=4 ;Histone H2B type 1-D OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BD PE=1 SV=2 ;Histone H2B type F-S OS=Homo sapiens GN=H2BFS PE=1 SV=2 ;Histone H2B type 1-B OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BB PE=1 SV=2 ;Histone H2B type 1-O OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BO PE=1 SV=3 ;Histone H2B type 1-J OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BJ PE=1 SV=3 ;
P01880;	3.4;	1	1	Immunoglobulin heavy constant delta OS=Homo sapiens GN=IGHD PE=1 SV=3 ;
P01767;	16.4;	1	1	Immunoglobulin heavy variable 3-53 OS=Homo sapiens GN=IGHV3-53 PE=1 SV=2 ;
P01591;	6.3;	1	1	Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=JCHAIN PE=1 SV=4 ;
P01619;	19;	1	1	Immunoglobulin kappa variable 3-20 OS=Homo sapiens GN=IGKV3-20 PE=1 SV=2 ;
P80748;	18.8;	1	5	Immunoglobulin lambda variable 3-21 OS=Homo sapiens GN=IGLV3-21 PE=1 SV=2 ;
P17936;	5.8;	1	1	Insulin-like growth factor-binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=IGFBP3 PE=1 SV=2 ;
Q7Z3B3;	2.1;	1	1	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=KANSL1 PE=1 SV=2 ;
Q9BVA0;	2.1;	1	1	Katanin p80 WD40 repeat-containing subunit B1 OS=Homo sapiens GN=KATNB1 PE=1 SV=1 ;
P48059;	4.9;	1	2	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1 OS=Homo sapiens GN=LIMS1 PE=1 SV=4 ;
P26038;	2.9;	1	1	Moesin OS=Homo sapiens GN=MSN PE=1 SV=3 ;
Q13201;	2.1;	2	2	Multimerin-1 OS=Homo sapiens GN=MMRN1 PE=1 SV=3 ;
O76041;	2;	1	1	Nebulette OS=Homo sapiens GN=NEBL PE=1 SV=1 ;
P55209;	4.6;	2	2	Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Homo sapiens GN=NAP1L1 PE=1 SV=1 ;
Q6UXB8;	2.2;	1	1	Peptidase inhibitor 16 OS=Homo sapiens GN=PI16 PE=1 SV=1 ;
P55058;	2.8;	1	1	Phospholipid transfer protein OS=Homo sapiens GN=PLTP PE=1 SV=1 ;
P13796;	4;	1	3	Plastin-2 OS=Homo sapiens GN=LCPI PE=1 SV=6 ;
Q6S8J3;	5.4;	8	19	POTE ankyrin domain family member E OS=Homo sapiens GN=POTEE PE=2 SV=3 ;
Q9UK55;	3.6;	2	4	Protein Z-dependent protease inhibitor OS=Homo sapiens GN=SERPINA10 PE=1 SV=1 ;

Q9BYX7;	6.7;	4	13	Putative beta-actin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=POTEKP PE=5 SV=1 ;
P04350;Q9BVA1; Q13885;P68371;P0 7437;	5.6;5.6;5.6;5. 6;5.6;	1	2	Tubulin beta-4A chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4A PE=1 SV=2 ;Tubulin beta-2B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2B PE=1 SV=1 ;Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2A PE=1 SV=1 ;Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4B PE=1 SV=1 ;Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2 ;
P50552;	2.9;	1	1	Vasodilator-stimulated phosphoprotein OS=Homo sapiens GN=VASP PE=1 SV=3 ;
P22891;	4;	1	1	Vitamin K-dependent protein Z OS=Homo sapiens GN=PROZ PE=1 SV=2 ;

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A morfologia básica do suplemento foi, de certa forma, observada através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, ao invés de outras metodologias convencionais como microscopia eletrônica. Sabe-se que o processo de congelamento e aquecimento das bolsas de plaquetas faz com que haja o rompimento de suas membranas e liberação do seu conteúdo. Foi constatado que os grânulos (possivelmente agregados proteicos ou vesículas) resultantes desse processo de *lise* térmica, apesar de heterogêneos, podem ser caracterizados em duas populações distintas de partículas; e que possuem índice de dispersão variável entre médio e alto. Essa investigação vai de acordo com dados obtidos por outros pesquisadores, os quais comprovam que essas partículas por si só promovem o crescimento celular; e que os fatores de crescimento e diversas outras proteínas estão presentes, em sua maior parte, encapsulados por essas partículas. Entretanto, o isolamento e análise dessas partículas não pôde ser realizado com eficácia e confiabilidade pelas metodologias disponíveis, fato que inicialmente era uma proposta do projeto.

Com relação aos fatores de crescimento, visa-se determinar os valores de EGF (fator de crescimento epidérmico), FGF-2 (fator de crescimento fibroblástico 2), HGF (fator de crescimento de hepatócitos), PDGF-BB (fator de crescimento BB derivado de plaquetas BB) e VEGF-A (fator de crescimento vascular endotelial A) encontrados em diversas preparações do suplemento pela metodologia *Multiplex (Luminex)*, estabelecendo uma faixa e variabilidade do conteúdo. Essa análise é fundamental, porém, não foi possível concluí-la no tempo previsto para o trabalho devido a contratempos logísticos. Nesse ponto, será essencial realizar uma comparação com outros produtos disponíveis no mercado e oriundos de outras metodologias; evidenciando que o fato de promover maior crescimento celular pode estar relacionado também à concentração dessas proteínas específicas, as quais são essencialmente utilizadas como sinalização para a multiplicação das células em cultura.

Através dos resultados apresentados foi possível observar que o suplemento lisado de plaquetas possui vasto conteúdo proteico, de forma quantitativa e qualitativa. Acredita-se que essas moléculas são digeridas e utilizadas tanto para fornecimento de energia como para compor as estruturas necessárias e elementos essenciais para o crescimento e multiplicação celular. Algumas dessas proteínas exercem funções importantes como componentes do citoesqueleto ou da matriz extracelular; também foi observado que muitas são carregadas pela albumina. Ao analisar os genes responsáveis por essas proteínas, muitos participam de importantes funções para o desenvolvimento de células, como proliferação, morfogênese,

diferenciação, biossíntese, adesão, metabolismo, entre outros. Além disso, observou-se que parte dessas proteínas são extracelulares, ou seja, provavelmente algumas devem ser produzidas por megacariócitos e secretadas pelas plaquetas; e que algumas são componentes de vesículas citoplasmáticas. Foram encontradas sequências de genes relacionados a rotas metabólicas principalmente da glicólise e metabolismo de aminoácidos e outras substâncias (dados não mostrados). Proteínas que fazem a ligação dos fatores de crescimento TGF- β , HGF e IGF e promovem sua ativação também foram encontradas. Isso reforça o fato de que o papel desse tipo de suplemento não é apenas ser fonte de fatores de crescimento, como também de proteínas auxiliares. A metodologia utilizada permite a detecção apenas de uma parcela de todas as proteínas contidas na amostra.

É importante salientar a contribuição de estudos desse tipo para a indústria biomédica e para o meio ambiente, visando a sustentabilidade e bem-estar animal. Ao apresentarmos alternativas melhores de produtos, como a desse suplemento, por exemplo, é possível oferecer e impulsionar tecnologias melhores para tratamento de diversas doenças. A realização de pesquisas básicas descritivas para o entendimento de biologia celular é essencial para a compreensão de diversos mecanismos moleculares e segurança dos insumos utilizados.

Espera-se que os dados apresentados aqui ajudem a enriquecer o conhecimento acerca do lisado de plaquetas e da cultura celular de células humanas para terapia de forma geral, já que o mesmo é utilizado em diversos ensaios clínicos. Futuramente, com a aprovação da patente submetida previamente ao trabalho, visa-se que o mesmo possa ser devidamente comercializado e que os resultados descritos fundamentem sua composição e efeito.

REFERÊNCIAS

AATONEN, Maria T. et al. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 3, n. 24692, 2014.

AGUZZI, A. et al. Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: Memorandum from a WHO meeting. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 505–513, 1997.

AMORIM, B.; M, Da Rocha Silla L. **Ensaio Clínico de Segurança e Exequibilidade: Células-tronco Mesenquimais para o Tratamento da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro Aguda Resistente aos Corticoesteróides**. 2013. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/78494/000898005.pdf?sequence=1>, 2013.

ASLAM, Bilal et al. Proteomics: Technologies and their applications. **Journal of Chromatographic Science**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 182–196, 2017.

BADIMON, Lina et al. Role of Platelet-Derived Microvesicles As Crosstalk Mediators in Atherothrombosis and Future Pharmacology Targets: A Link between Inflammation, Atherosclerosis, and Thrombosis. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 293, 2016.

BEYS-DA-SILVA, Walter O. et al. Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 2282–2296, 2014.

BIEBACK, Karen. Platelet Lysate as Replacement for Fetal Bovine Serum in Mesenchymal Stromal Cell Cultures. **Transfusion Medicine & Hemotherapy**, [s. l.], v. 40, p. 326–335, 2013.

BOOMSMA, Robert A.; GEENEN, David L. Mesenchymal Stem Cells Secrete Multiple Cytokines That Promote Angiogenesis and Have Contrasting Effects on Chemotaxis and Apoptosis. **PLoS One**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2012.

BORGES, Fernanda T. et al. TGF- β 1-Containing Exosomes from Injured Epithelial Cells Activate Fibroblasts to Initiate Tissue Regenerative Responses and Fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, [s. l.], v. 24, 2013.

BRILL, Alexander et al. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 30–38, 2005.

BURKHART, Julia M. et al. What can proteomics tell us about platelets? **Circulation Research**, [s. l.], v. 114, n. 7, p. 1204–1219, 2014.

BURNOUF, Thierry et al. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? **Biomaterials**, [s. l.], v. 76, p. 371–387, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.065>>

CHEN, Yu A.; SCHELLER, Richard H. Snare-mediated membrane fusion. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 2, p. 98–106, 2001.

CHOI, Dong-Sic et al. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes.

Proteomics, [s. l.], v. 13, n. 10–11, p. 1554–1571, 2013.

CRESPO-DIAZ, Ruben et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 797–811, 2011.

DEAN, William L. et al. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. **Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 711–718, 2009.

DIJKSTRA, S. et al. Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes. **The Journal of Urology**, [s. l.], v. 191, n. 4, p. 1132–1138, 2014.

DUVE, Christian De. The lysosome turns fifty. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 7, p. 847–849, 2005.

EITAN, Erez et al. Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 26, n. 26373, 2015.

EPPLEY, Barry L.; WOODSELL, Jennifer E.; JOEL HIGGINS, B. S. Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 114, n. 6, p. 1502–1508, 2004.

FACHEL, Flávia Nathiely Silveira et al. Box-Behnken design optimization of mucoadhesive chitosan-coated nanoemulsions for rosmarinic acid nasal delivery—In vitro studies. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 199, p. 572–582, 2018.

FENG, Du et al. Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. **Traffic**, [s. l.], v. 11, p. 675–687, 2010.

GARCIA, Benjamin A. et al. The Platelet Microparticle Proteome. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 4, p. 1516–1521, 2005.

GARDINER, Chris et al. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2013.

GOLEBIEWSKA, Ewelina M.; POOLE, Alastair W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. **Blood Reviews**, [s. l.], v. 29, p. 153–162, 2015.

GÖTZ, Stefan et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 3420–3435, 2008.

GSTRAUNTHALER, Gerhard; LINDL, Toni; VAN DER VALK, Jan. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. **Cytotechnology**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 791–793, 2013.

GUO, Shang-Chun et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma promote the re-epithelization of chronic cutaneous wounds via activation of YAP in a diabetic rat model. **Theranostics**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017.

HEIJNEN, Harry F. G. et al. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. **Blood**, [s. l.], v. 94, n. 11, p. 3791–3799, 1999.

- HEMEDA, Hatim; GIEBEL, Bernd; WAGNER, Wolfgang. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 16, p. 170–180, 2014.
- HOEN, Esther N. M. Nolte-'t et al. Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. **Nanomedicine**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 712–720, 2012.
- JAYACHANDRAN, Muthuvel et al. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. **Journal of Immunology Methods**, [s. l.], v. 375, p. 207–214, 2012.
- JEPPESEN, Dennis K. et al. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 3, n. 25011, 2014.
- JONNALAGADDA, Deepa; IZU, Leighton T.; WHITEHEART, Sidney W. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. **Blood**, [s. l.], v. 120, p. 5209–5216, 2012.
- KALRA, Hina; DRUMMEN, Gregor P. C.; MATHIVANAN, Suresh. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 170, 2016.
- KINZEBACH, Sven et al. Functional and differential proteomic analyses to identify platelet derived factors affecting ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. **BMC Cell Biology**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2013.
- KOWALA, Joanna et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], 2016.
- KRIEGER, Jose Eduardo et al. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. **Transfusion**, [s. l.], v. 49, n. 12, p. 2680–2685, 2009.
- LEE, Changjin et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Circulation**, [s. l.], v. 126, p. 2601–2611, 2012.
- LÖTVALL, Jan et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 3, n. 26913, 2014.
- MACKENSEN, Andreas et al. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. **Cancer Immunology Immunotherapy**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 152–156, 2000.
- MADRIGAL, Marialaura; RAO, Kosagisharaf S.; RIORDAN, Neil H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 260, 2014.
- MERINO-GONZÁLEZ, Consuelo et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles

Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 7, n. 24, 2016.

MI, Huaiyu et al. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). **Nature Protocols**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 703–721, 2019.

MILLIMAGGI, Danilo et al. Tumor Vesicle–Associated CD147 Modulates the Angiogenic Capability of Endothelial Cells. **Neoplasia**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 349–357, 2007.

OIKONOMOPOULOS, Angelos et al. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 16570, 2015.

PARK, K. S. et al. Third International Meeting of ISEV 2014: Rotterdam, The Netherlands (April 30th – May 3rd) - How many beer extracellular vesicles are taken by human beings? **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 2, n. 24214, p. 10B – 2266, 2014.

PAVLOVIC, Voja et al. Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. **Open Medicine**, [s. l.], v. 11, p. 242–247, 2016.

PEGTEL, D. M.; PEFEROEN, L.; AMOR, S. Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, [s. l.], v. 369, 2014.

PEGTELA, D. Michiel et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. **PNAS**, [s. l.], v. 107, n. 14, p. 6328–6333, 2010.

PISITKUN, Trairak; SHEN, Rong-Fong; KNEPPER, Mark A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **PNAS**, [s. l.], v. 101, 2004.

PRICE, Paul J.; GREGORY, Elizabeth A. Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. **In Vitro**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 576–584, 1982.

RA, Dragovic et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanomedicine**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 780–788, 2011.

RAD, Fariba et al. Microvesicles preparation from mesenchymal stem cells. **Medical Journal of The Islamic Republic of Iran**, [s. l.], v. 30, n. 398, 2016.

RAPOSO, Graça et al. B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 183, p. 1161–1172, 1996.

RAPOSO, Graça; STOORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 200, p. 373–383, 2013.

RASHED, Mohammed H. et al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 538, 2017.

RATAJCZAK, J. et al. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated

mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia**, [s. l.], v. 20, p. 1487–1495, 2006. a.

RATAJCZAK, J. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **Leukemia**, [s. l.], v. 20, p. 847–856, 2006. b.

RAUCH, Caroline et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. **Altex**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 305–316, 2011.

SENIS, Yotis; GARCÍA, Ángel. Platelet proteomics: State of the art and future perspective. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 788, p. 367–399, 2012.

SENZEL, Lisa; GNATENKO, Dmitri V.; BAHOU, Wadie F. The platelet proteome. **Current Opinion in Hematology**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 329–333, 2009.

SHELKE, Ganesh Vilas et al. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 3, n. 24783, 2014.

SKOG, Johan et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1470–1476, 2008.

SUNDIN, Mikael et al. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. **Haematologica**, [s. l.], v. 92, n. 9, p. 1208–1215, 2007. b.

THÉRY, Clotilde et al. Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 166, p. 7308–7318, 2001.

THON, Jonathan N. et al. Comprehensive proteomic analysis of protein changes during platelet storage requires complementary proteomic approaches. **Transfusion**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 425–435, 2008.

TIETJE, Ashlee et al. Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles Undergo Age Dependent Declines and Contain Known and Novel Non-coding RNAs. **PloS One**, [s. l.], v. 9, n. 11, 2014.

TKACH, Mercedes; THÉRY, Clotilde. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. **Cell**, [s. l.], v. 164, 2016.

TORREGGIANI, E. et al. Exosomes: Novel effectors of human platelet lysate activity. **European Cells and Materials**, [s. l.], v. 28, p. 137–151, 2014. b.

TOSAR, Juan Pablo et al. Ribonucleic artefacts: are some extracellular RNA discoveries driven by cell culture medium components? **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2017.

UMENO, Y.; OKUDA, A.; KIMURA, G. Proliferative behaviour of fibroblasts in plasma-rich culture medium. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 567–575, 1989.

VALADI, Hadi et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism

of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 9, n. 6, 2007.

VALIM, Vanessa et al. Optimization of the Cultivation of Donor Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Use in Cellular Therapy. **CellBio**, [s. l.], v. 03, n. 01, p. 25–33, 2014. b.

VALIM, Vanessa de Souza. **Estudo sobre condições do cultivo de células-tronco mesenquimais para aplicações clínicas**. 2012. UFRGS, LUME, 2012. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/61272>>

VALIM, Vanessa de Souza; SILLA, Lucia Mariano da Rocha. **Processo de obtenção de lisado de plaquetas com maior concentração de heparina**, BR1020130311693A2, 2013. b.

VLIST, Els J. Van der et al. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 7, p. 1311–1326, 2012.

WOLF, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **British journal of haematology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 269–288, 1967.

ZONNEVELD, Marijke I. et al. Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2014.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CELLBIO

Information for Authors

This page provides general information for authors. Practical and in some cases also journal specific information [For Authors](#) can be found on the respective journal page. Also the [About SCIRP](#) page contains important information for authors.

Submission Policy

Papers submitted to Scientific Research Publishing must contain original material. The submitted paper, or any translation of it, must neither be published, nor be submitted for publication elsewhere. Violations of these rules will normally result in an immediate rejection of the submission without further review.

Contributions should be written in English and include a 100-300 words abstract. SCIRP's journals usually welcome the following types of contributions:

- Original research articles
- Review articles, providing a comprehensive review on a scientific topic

All manuscripts and any supplementary material should be submitted via SCIRP's Paper Submission System (PSS) at <https://papersubmission.scirp.org/>. Please follow the instructions given on this site.

General Peer-Review Process

In short, all manuscripts submitted for publication in our journals are strictly and thoroughly peer-reviewed. The review process is single blind. If the manuscript is accepted for full review, it will be reviewed by a minimum of two external reviewers.

Submitted manuscripts will undergo a detailed initial check including a Plagiarism Check in the Editorial Office. An Editor – usually the Editor-in-Chief or a board member of the journal – together with the Editorial Office takes charge of the peer-review process. It starts with a Preliminary Review by the Editor (finished no more than 10 days after manuscript submission).

After a **manuscript is accepted for full review**, the Editor will collect at least two review comments and prepare a decision letter based on the comments of the reviewers (finished no more than 4 weeks after preliminary review). The decision letter is sent to the Corresponding Author to request an adequate revision (peer-reviewed again whenever necessary). The author will be asked to format the manuscript according to SCIRP's template before it goes into typesetting and proofreading with the publisher. The author will receive the paper in PDF produced by SCIRP for checking before it is published online.

Flowchart of the Generic SCIRP Peer Review Process

The **Generic SCIRP Peer Review Process** visualizes this.

The flowchart of the Generic SCIRP Peer Review Process shows the review process as found in most of SCIRP's journals. As there are **far more than 200 journals** (several of which were launched as early as 2008), Editors-in-Chief may follow different conventions when they work with the Editorial Board and the publisher's Editorial Office of the journal. Note also that a few journals at SCIRP work successfully without an Editor-in-Chief, but all journals have an Editorial Board. Nevertheless, the process depicted in the **flowchart is valid** for most of SCIRP's journals.

To emphasize again, the **Editor** taking care of a specific manuscript can be but does not have to be the Editor-in-Chief. The **Editor-in-Chief** can assign the manuscript to a **member of the Editorial Board**. Over time work is shared among more individuals with an extensive pool of expertise to be drawn from the entire Editorial Board. This is especially important where the journal scope spans a wide scientific area. If the Editor-in-Chief is temporarily not available, someone else from the Editorial Board can assign the manuscript to an Editor including himself/herself. It is also possible to appoint **a qualified person from outside** the Editorial Board as Editor for a manuscript. In any case, the Editor-in-Chief is always informed of all major issues, because the Editor-in-Chief carries the ultimate responsibility for all academic matters of the journal. In rare cases where a journal has no Editor-in-Chief, such information will go to that Editorial Board member who is currently most active in running the journal.

SCIRP is proud to have so many top-class academics on its Editorial Boards. SCIRP also understands that these academics have their primary duties to perform at their own institutions. In order to foster an efficient work environment for external academics, the publisher, therefore, has **Editorial Assistants** to provide as much help as possible to board members. Editorial Assistants play many important roles in the publishing process. For example, authors and readers often have many questions during the whole publishing process. For each journal, all such external and additionally internal correspondence is handled by its Editorial Assistant. If desired, the Editor-in-Chief can receive a CC email of all such correspondence. Furthermore, the Editorial Assistant can also take over the handling of the review process, leaving the decision-making to the Editor assigned to the manuscript. In this case the Editorial Assistant would also handle the correspondence with reviewers and with the Corresponding Author. An **Editor** whose duty is limited to core activities and decision making is named **Academic Editor**. An Editor additionally in charge of the correspondence with reviewers and with the Corresponding Author is named **Handling Editor**.

To repeat, the **Editor assigned to a manuscript** invariably bears the responsibility for all core **activities and decisions in the review process** of this manuscript. These core activities and decisions are:

- preliminary review
- decision: accepted for review or
- decision: pre-rejected
- reviewer selection
- writing the decision letter including
- comments from reviewers
- Editor's comments
- Editor's decision about the next status of the manuscript:
 - decision: accepted or
 - decision: to be resubmitted or
 - decision: to be revised or
 - decision: rejected.

Please read more about the pre-publication and post-publication peer review process in the [FAQ](#).

Authors' Rights

SCIRP asks authors to grant SCIRP a nonexclusive copyright. In this way authors continue to hold copyright with no restrictions. Based on its copyright SCIRP produces the final paper in SCIRP's layout. This version is given to the public (and also back to the authors) under the Creative Commons license (CC BY or CC BY-NC). For this reason authors may also publish the final paper in any repository or on any website with a complete citation of the paper. When linking to their paper, authors should make use of the link that SCIRP has established with [crossref.org](#). It is a pointer to the full text of the final paper. The URL provides a persistent link which will never break. This link has the form <http://dx.doi.org/10.4236/YourPaperNumber>.

Find more information on reader and author rights on the [AboutUs](#) page.

SCIRP Publication Ethics Statement

SCIRP is committed to maintaining high standards through a rigorous peer-review together with strict ethical policies. Any infringements of professional ethical codes, such as plagiarism, fraudulent use of data, bogus claims of authorship, should be taken very seriously by the editors with zero tolerance.

SCIRP follows the [Code of Conduct](#) of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#), and follows the [COPE Flowcharts](#) for Resolving Cases of Suspected Misconduct. SCIRP especially observes COPE's [Code of Conduct for Journal Publishers](#). Editors at SCIRP follow COPE's [Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal](#)

Editors.

Authors should be aware of a possible [Conflict of Interest](#). In such a case authors can still take responsibility for the accuracy of their paper, but must inform the reader with an appropriate statement in the Acknowledgements.

SCIRP Retraction Policy

SCIRP recognizes the importance of the integrity and completeness of the scholarly record. The historic record of published research articles shall remain available and unaltered as far as possible. However, circumstances may arise where a paper got published based on misconduct or honest error. Editors certainly guide the review process with much care, but it remains notoriously difficult to detect all occurrences of misconduct or error. For this reason it may become necessary to correct the scholarly record. The decision to alter the record should not be taken lightly. Action taken depends on the individual case and can take the form of

- Expression of Concern
- Correction (Erratum or Corrigendum)
- Retraction
- Removal

The purpose of the action is to correct the literature and to alert readers. It is not intended to punish the author(s).

The responsibility of guiding an investigation of misconduct or honest error is with the editor of the journal concerned. Authors and reviewers will take part in the investigation. The editor will decide on the form to best correct the scholarly record. Guiding principles are [COPE's Retraction Guidelines](#) and other accepted scholarly principles.

Minor errors that do not affect the integrity of the metadata or a reader's ability to understand an article and that do not involve a scientific error or omission are corrected such that the original article is replaced with the corrected version.

If final action originates from an author's request, SCIRP will help to process it without extra charges. If the measures taken (e.g. a retraction) were not initiated by the author(s) or are even taken without mutual agreement, the author(s) will not be financially compensated and Article Processing Charges (APC) will not be reimbursed.

Microsoft Word Template

Format your article before submitting according to the template available at <https://file.scirp.org/doc/cellbio-template.docx>