



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO  
DESENVOLVIMENTO

Carmem Lucia Sperlich

**Avaliação do efeito do secretoma de células estromais mesenquimais na  
neuroproteção e neuroregeneração**

Florianópolis  
2022

Carmem Lucia Sperlich

**Avaliação do efeito do secretoma de células estromais mesenquimais na  
neuroproteção/neurorregeneração**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientador: Profa Dra Andréa Gonçalves Trentin

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sperlich, Carmem Lucia

Avaliação do efeito do secretoma de células estromais mesenquimais na neuroproteção e neuroregeneração / Carmem Lucia Sperlich ; orientadora, Andréa Gonçalves Trentin, 2022.

145 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Células tronco. 3. Desordens neurodegenerativas. 4. Estresse oxidativo. 5. Medicina regenerativa. I. Gonçalves Trentin, Andréa. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Carmem Lucia Sperlich

**Avaliação do efeito do secretoma de células estromais mesenquimais na  
neuroproteção/neurorregeneração**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Bianca Luise Teixeira, Dr.(a)  
Instituição BiomeHub

Michele Patrícia Rode, Dr.(a)  
Instituição BiomeHub

Prof.(a) Norma Machado da Silva, Dr.(a)  
Instituição UFSC

Prof.(a) Viviane Glaser, Dr.(a)  
Instituição UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão  
que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.(a) Andréa Gonçalves Trentin, Dr.(a)  
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado à minha querida mãe e a todas as outras vítimas de esquizofrenia que sofreram e ainda sofrem com a falta de tratamento eficiente.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa, pela oportunidade de desenvolver meu mestrado no LACERT. Quando decidi trabalhar com células-tronco, não imaginava que você seria tão receptiva e atenciosa. Obrigada por acreditar nos meus objetivos e na minha motivação, pelos ensinamentos, por me ajudar a crescer e por me confortar dizendo “vai dar tudo, não se preocupa”, essas palavras fizeram muita diferença nesse período desafiador. Não poderia deixar de agradecer aos professores que me avaliaram na fase de seleção, oportunizando minha entrada no programa.

Meus mais sinceros agradecimentos ao órgão de fomento Capes, que concedeu minha bolsa de pesquisa no programa que mais se adequava às minhas necessidades de aprendizagem e aos meus objetivos. À Fapesc e CNPQ que financiaram o laboratório. À UFSC por oferecer o curso de pós-graduação e conceder a infraestrutura necessária para realizar o curso. Agradeço imensamente ao PPGBCD pela receptividade e pelas oportunidades de aprendizado e crescimento que tive durante o mestrado, me senti acolhida e tive certeza de que podia contar com a minha PG.

Agradeço ainda às coordenadoras do curso Yara e Evelise que com muita dedicação e persistência sempre lutaram pelas bolsas de pesquisa. Obrigada pelo apoio durante esse período. Agradeço aos professores da PG por compartilhar seu conhecimento de forma didática e agradável, tornando as aulas muito proveitosas e agradáveis. Aos professores Ricardo, Talita e Viviane por dedicar seu tempo em meu projeto de pesquisa, suas contribuições foram muito valiosas. Aos professores da graduação por despertar em mim o desejo de me tornar pesquisadora, agradeço especialmente ao professor Hercílio por ter me apresentado à primeira cultura de células pela qual fiquei encantada. Aos meus orientadores de iniciação científica por possibilitar oportunidades práticas de aprendizado e por provocar em mim uma paixão pela bancada.

Aos professores do ensino básico que ao longo dos anos me ajudaram a chegar até aqui, em particular minha professora de Matemática da 6<sup>a</sup> série que foi a primeira a acreditar na minha capacidade, a professora de Português do ensino médio, Zenaide, por incentivar fortemente a leitura e ao querido professor de Biologia, Paulo

e suas habilidades artísticas, por desenhar um neurônio no quadro negro e insistir no meu aprendizado.

Agradeço muito aos meus amigos, especialmente à doutoranda Karynne pelo apoio desde o início do curso, me ensinando e me ajudando inúmeras vezes. Obrigada pela disponibilidade para discussões científicas e conselhos pessoais. Por todas as vezes que eu precisei desabafar sobre os problemas. Espero que você saiba a relevância da sua participação nesse trabalho. Aos amigos que fiz no LACERT e no PPGBCD: Maiara, Isadora, Monique, Priscila, Maico, Nathali, Daniely, Victor, Leonardo, Thaís, Felipe, Jaqueline, Camila, Lucas e Peterson. Compartilhar esse desafio com vocês foi muito melhor do que eu imaginei. Dividir os dias, os cafés, as cervejas e as preocupações com vocês, foi essencial para que eu acreditasse que chegaria onde cheguei. Aos meus queridos amigos da graduação e de longa data que sempre me incentivaram a fazer pós-graduação, apesar da distância, vocês permanecem no meu coração: Jéssica, Suellen, Suzana, Luana, Iasmin, Gil, Adriano, Janaína, Ana Luísa, Andressa, Sharlene, Cléia, Patrick, William e Joel.

Agradeço infinitamente aos meus tios avós Regina e Arivaldo pelo apoio incondicional. Um agradecimento em especial à minha tia avó, minha fonte inspiradora, mulher determinada, batalhadora, incansável por cuidar da minha mãe para que eu pudesse realizar esse sonho. À minha tia Regiane por se aproximar de mim após eu me afastar da minha família e oferecer ajuda à minha mãe em um momento muito difícil. À minha mãe que foi a razão de eu ter chegado até aqui, todo esse esforço e dedicação foi por você, infelizmente você se foi mais cedo do que eu esperava, mas permanecerá em meus pensamentos e coração para sempre.

Por fim agradeço à família que meu coração escolheu. Tantos anos longe de casa nos ensinam que quando não temos nossa família por perto, as pessoas que se importam, que ligam, que escutam e que estão ao nosso lado quando mais precisamos, tornam-se nossa família. Ao Felipe, que foi a pessoa que mais acreditou na minha capacidade, por todas as vezes que duvidei de mim e você estava ao meu lado para me apoiar e me lembrar que sou capaz. Aos pais do Felipe, por todo afeto, por me fazer sentir em casa e pelos almoços de domingo que renovavam minhas energias para iniciar mais uma semana.

À Patrícia que me recebeu na sua casa mesmo sem me conhecer e à Alaíde minha vizinha de porta, ambas foram essenciais durante esse período de grandes desafios. Ao Danrley que desde a graduação se tornou um amigo inseparável, que sempre me

incentivou, obrigada por estar sempre comigo, mesmo que separados pela distância. Pelas conversas diárias, por ouvir minhas reclamações e por me chamar de “nerd”. Você não imagina o quanto sua amizade é importante. Obrigada por todo o tempo que você dedicou ouvindo meus áudios, pelo carinho e por todo amor. Por fim, agradeço ao Luíz por estar ao meu lado no momento mais difícil da minha vida, por me amparar e não me deixar desistir, obrigada por todas as palavras de conforto e por ser um dos meus maiores incentivadores.

## RESUMO

Desordens neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, lesão medular espinhal e acidente vascular cerebral, são comumente relacionadas à produção intensa de estresse oxidativo. Após insulto ao sistema nervoso central (SNC), ocorre reatividade astrocitária, o que resulta em aumento da inflamação e neurodegeneração, amplificando a lesão e/ou limitando o sucesso da recuperação. Atualmente, tratamentos eficientes que interrompem o processo degenerativo não estão disponíveis. Nesse contexto, terapias livres de células utilizando o meio condicionado (MC) que contém o secretoma de células estromais mesenquimais (CEM) têm apresentado resultados pré-clínicos satisfatórios. Sendo assim, compreender os mecanismos celulares e moleculares dos efeitos do meio condicionado de CEM (MC-CEM) sobre a astroglia é imprescindível para propor novas estratégias terapêuticas. Este estudo teve como objetivo inicial identificar, por meio de revisão de literatura, os fatores parácrinos presentes no MC-CEM possivelmente implicados na regulação do estresse oxidativo, neuroproteção e neuroregeneração. Em segundo lugar, este trabalho objetivou revisar os estudos disponíveis na literatura que investigaram os efeitos biológicos do MC-CEM humanas na produção de estresse oxidativo em astrócitos. A primeira análise mostrou que o MC, independentemente da fonte tecidual de CEM, contém uma variedade de fatores bioativos, como a catalase, peroxirredoxinas e superóxido dismutases, fatores-chave na regulação redox. Além disso, esta investigação revelou outras proteínas importantes secretadas por CEM, incluindo a tioredoxina, proteínas de choque térmico, fator de crescimento do nervo, neuropilina 2 e proteína 1 solúvel em ácido cerebral envolvidas na proteção do SNC e/ou no controle do estresse oxidativo. Por fim, esta análise demonstrou que as CEM secretam mRNAs e microRNAs responsáveis pela neuroproteção e neuroregeneração. Na segunda parte deste trabalho, estudos relataram que o MC-CEM protegeu os astrócitos do estresse oxidativo, reduzindo a peroxidação lipídica, nitração de proteínas, danos ao DNA e a expressão de genes que contribuem para a produção de agentes oxidantes; e aumentou os níveis de superóxido dismutase e glutathiona peroxidase, bem como melhorou a viabilidade celular, proliferação e cicatrização. Além disso, o MC-CEM foi capaz de regular os níveis de  $Ca^{2+}$ , proteger estruturas mitocondriais, bloquear a gliose reativa e reduzir a inflamação. Em conjunto, os estudos demonstraram que as CEM secretam uma grande diversidade de fatores envolvidos na neuroproteção e neuroregeneração atuando através do controle do estresse oxidativo e que o MC-CEM apresenta potenciais efeitos terapêuticos em astrócitos. Portanto, esse tipo de terapia livre de células pode ser considerada uma ferramenta promissora para a medicina regenerativa

**Palavras-chave:** Doenças neurodegenerativas. Astrócitos. Células-tronco. Dano oxidativo. Enzimas antioxidantes.

## ABSTRACT

Neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease, spinal cord injury, and stroke, are commonly related to intense oxidative stress production. After an insult to the central nervous system (CNS), astrocytic reactivity can increase inflammation and neurodegeneration, amplifying the lesion and/or limiting the success of recovery. Currently, efficient treatments to interrupt the degenerative process are not available. In this context, cell-free therapies using the conditioned medium (CM) that contains the secretome of mesenchymal stem cells (MSC) have shown satisfactory results. Therefore, comprehending the cellular and molecular mechanisms of MSC conditioned medium (MSC-CM) effects on the astroglia is imperative for proposing new therapeutic strategies. This work first aimed to identify, through literature review, the paracrine factors present in the MSC-CM possibly implicated in oxidative stress regulation, neuroprotection and neuroregeneration. Secondly, we aimed to review the available studies that investigated the biological effects of human MSC-CM on the oxidative stress production in astrocytes. The first analysis revealed that the MSC-CM, independently of the MSC tissue source, presents a variety of antioxidant enzymes, such as catalase, peroxiredoxins, and superoxide dismutase that are key factors in redox regulation. Moreover, this investigation showed others important proteins secreted by MSC, including thioredoxin, heat shock proteins, nerve growth factor, neuropilin 2, and brain acid soluble protein 1 involved in CNS protection and/or oxidative stress balance. In addition, this analysis demonstrated that MSC secrete mRNAs and microRNAs responsible for neuroprotection and neuroregeneration. In the second part of this work, studies reported that the MSC-CM protected astrocytes from oxidative stress, reducing lipid peroxidation, protein nitration, DNA damage, and the expression of genes that contribute to oxidant production; and increased the levels of superoxide dismutase and glutathione peroxidase as well as improved cell viability, proliferation, and wound closure. In addition, the MSC-CM has been shown to be able to regulate  $Ca^{2+}$  levels, protect mitochondrial structures, block reactive gliosis, and reduce inflammation. In conclusion, the studies have shown that MSC secrete a wide range of factors involved in neuroprotection and neuroregeneration, able to control oxidative stress and that MSC-CM has potential therapeutic effects on astrocytes. Therefore, this type of cell-free therapy can be considered a promising tool for regenerative medicine.

**Keywords:** Neurodegenerative diseases. Astrocytes. Stem cells. Oxidative damage. Antioxidant enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variações em respostas celulares dependentes dos níveis de estresse oxidativo .....	56
Figura 2 - SNC saudável e em estado de desordens neurológicas: desequilíbrio da homeostase decorrente da produção excessiva de estresse oxidativo.....	57
Figura 3 - Potencial neuroprotetor do secretoma de CEM em desordens neurológicas .....	64
Figura 4 - Funções pleiotrópicas dos fatores bioativos de CEM no SNC .....	92
Figura 5 - Fluxograma de identificação das fases de seleção de dados da literatura .....	93
Figura 6 - Análises experimentais .....	98
Figura 7 - Principais objetivos dos estudos selecionados para a análise qualitativa .....	102
Figura 8 - Mecanismos de ação do MC-CEM propostos pelos estudos analisados na proteção de astrócitos em cultivo .....	120

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos selecionados para revisão da literatura que identificaram fatores parácrinos do secretoma total e vesículas extracelulares de CEM .....	75
Quadro 2 – Perguntas e respostas de pesquisa realizadas pelos estudos selecionados para a revisão.....	100
Quadro 3 - Efeitos do MC-CEM sobre o estresse oxidativo e outros parâmetros analisados em astrócitos <i>in vitro</i> nos estudos incluídos nesta revisão .....	104
APÊNDICE A - Quadro 4 - Estratégia de busca detalhada da literatura referente aos efeitos do MC-CEM sobre astrócitos submetidos a estresse oxidativo .....	140

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratégia de busca da literatura referente aos fatores bioativos presentes no secretoma de CEM com potencial efeito neuroterapêutico .....	70
Tabela 2 - Estratégia para coleta dos dados dos estudos selecionados para a análise qualitativa .....	72
Tabela 3 - Tecidos fonte de CEM utilizados para isolamento nos estudos analisados .....	74
Tabela 4 - Proteínas do MC-CEM humanas associadas à regulação do estresse oxidativo .....	76
Tabela 5 - Proteínas presentes no MC-CEM humanas com potencial efeito neuroprotetor .....	80
Tabela 6 - Proteínas presentes nas VE-CEM humanas com potencial neuroprotetor .....	85
Tabela 7 - mRNAs presentes nas VE-CEM humanas com potencial neuroprotetor ..	88
Tabela 8 - MicroRNAs presentes nas VE-CEM humanas com potencial neuroprotetor .....	90
Tabela 9 - Procedimentos de coleta e cultivo de CEM nos estudos selecionados para síntese qualitativa.....	94
Tabela 10 - Características metodológicas referentes aos insultos e tratamentos utilizando o MC-CEM em culturas astrocíticas nos estudos selecionados para a revisão.....	97
Tabela 11 - Proteínas analisadas nos estudos selecionados para a análise qualitativa .....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxil
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
A1	Astrócitos reativos
A2	Astrócitos não reativos
AGRN	Agtrin
AHNAK	Proteína associada à diferenciação de neuroblasto
AKT	Proteína quinase B
ALB	Albumina de soro humano
ANGPT1	Angiopietina 1
ANXA1	Anexina A1
ANXA4	Anexina A4
APOE	Apolipoproteína E
ARF4	Fator de ribosilação 4 do ADP
ATF3	Fator de transcrição de ativação 3
AVC	Acidente vascular cerebral
AXL	Receptor de tirosina-proteína quinase OVNI
A $\beta$	Peptídeos beta-amilóides
BASP1	Proteína 1 solúvel em ácido cerebral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BMP15	Proteína morfogenética óssea 15
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CAT	Catalase
CCL2	Proteína quimioatraente de monócitos 2
CCN1	Fator de rede de comunicação celular 1
CD44	Antígeno CD44
CD9	Antígeno CD9
CDH2	Caderina 2
CEM	Células estromais mesenquimais
CEM-CPCU	Células estromais mesenquimais derivadas de células

	perivasculares do cordão umbilical
CEM-DP	Células estromais mesenquimais derivadas de derme de prepúcio
CEM-GE	Células estromais mesenquimais derivadas de gengiva
CEM-GW	Células estromais mesenquimais derivadas da geleia de Wharton
CEM-MO	Células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea
CEM-MON	Células estromais mesenquimais derivadas da mucosa olfatória nasal
CEM-PD	Células estromais mesenquimais derivadas da polpa dentária
CEM-PDA	Células estromais mesenquimais derivadas da papila dentária apical
CEM-TA	Células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo
CFL1	Cofilina 1
CLU	Clusterina
CRLF1	Fator semelhante ao receptor de citocina 1
CSF1	Fator estimulador de colônias de macrófagos 1
CSF2	Fator estimulador de colônias de macrófagos 2
CST3	Cistatina C
CTNNB1	Catenina beta 1
CXCL12	Fator derivado de célula estromal 1
CXCL8	Interleucina 8
DCFDA	2',7'- diacetato de diclorofluorescina
DCN	Decorina
DGO	Depleção de glicose e oxigênio
DHE	Diidroetídio
DMEM	Meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico

EEF2	Fator de alongação 2
EGF	Fator de crescimento epitelial
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK1/2	Quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2
ERK1/2/MAPK	Quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2/proteínas quinases ativadas por mitogênicos
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGF7	Fator de crescimento de fibroblasto 7
GDF11	Fator de diferenciação de crescimento 11
GDF15	Fator de diferenciação de crescimento 15
GDF5	Fator de diferenciação de crescimento 5
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GMFG	Fator gama de maturação da glia
GPC1	Glypican 1
GPX	Glutathione peroxidase
GPX1	Glutathione peroxidase 1
GREM1	Gremlina 1
GSH	Glutathione
GSN	Gelsolina
GST	Glutathione S-transferases
GSTK1	Glutathione S-transferase kappa 1
GSTO1	Glutathione S-transferase ômega 1
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HO-1	Heme oxigenase 1
HSP105	Proteína de choque térmico 105
HSP27	Proteína de choque térmico 27
HSP60	Proteína de choque térmico 60
HSP70	Proteína de choque térmico 70
HSP90	Proteína de choque térmico 90

HSP	Proteínas de choque térmico
IDO1	Proteína indoleamina 2,3-dioxigenase 1
IFIT2	Proteína induzida por interferon com repetições de tetratricopeptídeo 2
IFN $\gamma$	Interferon gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP4	Proteína 4 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
IKKB	Quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade beta
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL18BP	Proteína de ligação à interleucina 18
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
Keap1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch
LAMB2	Subunidade beta 2 da laminina
LEP	Leptina
LGALS1	Galectina 1
LGMN	Legumain
LPS	Lipopolissacarídeo
LTBP	Fator de transformação de crescimento latente $\beta$
MC	Meio condicionado
MC-CEM	Meio condicionado de células estromais mesenquimais
MC-CEM-DP	Meio condicionado de células estromais mesenquimais de derme de prepúcio
MC-CEM-MO	Meio condicionado de células estromais mesenquimais de medula óssea
MC-CEM-PD	Meio condicionado de células estromais mesenquimais polpa dentária

MC-CEM-TA	Meio condicionado de células estromais mesenquimais de tecido adiposo
MDK	Fator de crescimento de ligação à heparina
MeSH	Vocabulário controlado de títulos de assuntos médicos
MET	Receptor do fator de crescimento de hepatócitos
MGST1	Glutationa S-transferase microssômica 1
MIC1	Citocina inibidora de macrófago 1
miRNAs	MicroRNAs
MME	Neprilisina
mRNAs	RNAs mensageiros
NEGF2	Fator de promoção de crescimento de neurito 2
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGB	Neuroglobulina
NGF	Fator de crescimento do nervo
NMDA	Receptor de glutamato ácido N-metil-D-aspartico
NOTCH2	Proteína 2 homóloga ao locus neurogênico de Notch
NOX	NADPH oxidases transmembrana
NPTN	Neuroplastina
Nrf2	Fator de transcrição fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
NRG1	Neuregulina 1
NRP2	Neuropilina 2
NT3	Neurotrofina 3
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Radical ânion superóxido
OXTR	Receptor de oxitocina
p-AKT	Proteína quinase B fosforilada
p-ERK	Quinase regulada por sinal extracelular fosforilada
PAI1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1
PARK7	Deglycase associada a parkinsonismo
PAX7	Proteína de caixa emparelhada 7
PCSK9	Pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9

PDGFA	Subunidade A do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas
PEDF	Fator derivado do epitélio pigmentar
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B
POSTN	Periostina
PPIA	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A
PPIB	Peptidil-prolil cis-trans isomerase B
PRDX	Peroxirredoxinas
PRDX1	Peroxirredoxina 1
PRDX2	Peroxirredoxina 2
PRDX3	Peroxirredoxina 3
PRDX4	Peroxirredoxina 4
PRDX5	Peroxirredoxina 5
PRDX6	Peroxirredoxina 6
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
PTN	Pleiotrofina
Redox	Redução-oxidação
RGN	Regucalcina
RNA	Ácido ribonucleico
S100A10	S100 proteína de ligação ao cálcio A10
SCARB2	Proteína 2 de membrana associada ao lisossomo
SCF	Fator de células-tronco
SCRG1	Proteína responsiva a scrapie 1
SEMA7A	Semaforina 7A
SFB	Soro fetal bovino
SLC38A2	Transportador de aminoácido neutro acoplado a sódio 2
SN	Sistema nervoso
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutases
SOD1	Superóxido dismutase 1

SOD2	Superóxido dismutase 2
SOD3	Superóxido dismutase 3
SPOCK1	Testican 1
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador beta
TGF- $\beta$ 1	Fator de crescimento transformador beta 1
TMOD2	Tropomodulina 2
TMSB10	Timosina beta 10
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TXN	Tiorredoxina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VE	Vesículas extracelulares
VE-CEM	Vesículas extracelulares de células estromais mesenquimais
VE-CEM-GW	Vesículas extracelulares de células estromais mesenquimais da geleia de Wharton
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGFC	Fator de crescimento endotelial vascular C

## INTRODUÇÃO

As desordens neurológicas incluem lesões no sistema nervoso central (SNC), assim como doenças neurodegenerativas, por exemplo, as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica (XU *et al.*, 2021). Esses distúrbios possuem diferentes etiologias, sintomatologias e fisiopatologias. Sendo assim, são desordens desafiadoras que compartilham características como a baixa capacidade regenerativa intrínseca do SNC adulto, excitotoxicidade, neuroinflamação e disfunção mitocondrial (DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV; KAZANTSEV, 2018; FEHILY; FITZGERALD, 2017; FRATI *et al.*, 2017; PINHO *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2019). Considerando que esses processos geram estresse oxidativo (FEHILY; FITZGERALD, 2017; NG; LEE, 2019), a regulação dos níveis de agentes oxidantes é essencial em distúrbios neurológicos (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018). O autorreparo do SNC pode ocorrer, porém é limitado e dependente da ação de uma pequena população de células-tronco neurais. Devido ao número limitado dessas células, a neuroregeneração é prejudicada (PINHO *et al.*, 2020).

Os neurônios foram considerados por muito tempo como a principal população celular do SNC, no entanto, nas últimas décadas os astrócitos ganharam maior visibilidade devido às descobertas de suas diversas funções (DOKALIS; PRINZ, 2018). A astroglia desempenha um papel importante na manutenção da homeostase do SNC (TRENTIN, 2006), sendo capaz de remover e catabolizar neurotransmissores, transportar íons e prótons e, eliminar ERO (LIU; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2017). No entanto, sob estresse exacerbado, essas células exibem reatividade astrocitária, ou seja, sofrem mudanças morfológicas (FAIDEAU *et al.*, 2010) e secretam uma grande variedade de moléculas para o meio extracelular, incluindo quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Em conjunto, esses processos podem limitar o sucesso da recuperação em desordens neurológicas e resultar em aumento da inflamação local e neurodegeneração (PHATNANI; MANIATIS, 2015).

Atualmente, não existem terapias que param ou revertem o processo degenerativo ou que promovem regeneração tecidual funcional para doenças e lesões no SNC. Poucos tratamentos estão disponíveis e, mesmo nesses casos, o benefício terapêutico é limitado (DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV; KAZANTSEV, 2018; NG; LEE, 2019).

Terapias baseadas em células estromais mesenquimais (CEM) estão despertando um interesse extraordinário para regeneração do SNC (STAFF; JONES; SINGER, 2019). Recentemente, estudos têm demonstrado que as CEM estão associadas a funções básicas como proliferação, diferenciação, angiogênese e regulação de processos inflamatórios (CAPLAN *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2021; DELBEN *et al.*, 2021; ZOMER *et al.*, 2020). Além disso, desempenham um papel importante na manutenção de níveis basais de espécies reativas de oxigênio (ERO) (HOU *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2020; OTERO-ORTEGA *et al.*, 2019; STAVELY; NURGALI, 2020). O estado de redução-oxidação (redox) de um organismo é responsável por regular mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos na biologia celular (SIES; JONES, 2020). Neste sentido, as CEM são capazes de regular o equilíbrio redox no microambiente através de ações antioxidantes observadas em vários modelos de doenças, incluindo distúrbios do SNC, como lesões na retina, lesão isquêmica do cérebro e lesão traumática na coluna; assim como nas doenças de Parkinson e Alzheimer (CHANG *et al.*, 2019, 2018; HOU *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2020; OTERO-ORTEGA *et al.*, 2019; STAVELY; NURGALI, 2020).

As CEM produzem e secretam diversos fatores bioativos, sendo o conjunto dessas moléculas conhecido como secretoma ou meio condicionado (MC) (HARRELL *et al.*, 2020; MITCHELL *et al.*, 2019; PIRES *et al.*, 2016), composto por uma grande variedade de proteínas e RNAs, que podem apresentar propriedades terapêuticas (RIBEIRO *et al.*, 2012). Devido a sua composição complexa, o MC de CEM (MC-CEM) tem despertado a atenção de pesquisadores que buscam identificar seus componentes para compreender seus mecanismos de ação que ainda não são completamente entendidos (NIADA *et al.*, 2021; PINHO *et al.*, 2020). A definição da composição bioquímica do secretoma responsável pelas ações terapêuticas auxilia a elucidar as vias celulares e moleculares afetadas pelo tratamento com o MC e entender seus efeitos no tecido/órgão alvo (PRAVEEN *et al.*, 2019).

A utilização terapêutica do MC-CEM demonstrou efeitos positivos (diminuindo o estresse oxidativo em neurônios (CHANG *et al.*, 2019; WEN *et al.*, 2020), reduzindo inflamação, apoptose e dano cerebral (CHANG *et al.*, 2019) e suprimindo a ativação neurotóxica da micróglia e astrócitos (JIANG *et al.*, 2020)) em diferentes desordens neurológicas, incluindo acidente vascular cerebral (AVC) (D'ANGELO; CIMINI; CASTELLI, 2020; WEN *et al.*, 2020), sepse (CHANG *et al.*, 2019) e lesão medular espinhal (JIANG *et al.*, 2020). Considerando a relevância da

atividade astrocitária em estado de doença (PHATNANI; MANIATIS, 2015) e do equilíbrio redox em desordens neurológicas (RIZOR *et al.*, 2019), investigações que permitem avaliar os efeitos do MC-CEM sobre o estresse oxidativo em astrócitos são indispensáveis. O conhecimento sobre a composição do secretoma de CEM e sobre seus mecanismos de ação traz avanços científicos que permitirão futuramente sua utilização de forma segura como uma estratégia terapêutica para o tratamento de desordens do SNC, assim como para outras patologias que possuem opções limitadas de tratamento (PRAVEEN *et al.*, 2019; PINHO *et al.*, 2020).

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 DESORDENS NEURODEGENERATIVAS

O sistema nervoso (SN) é classificado como o centro de comando do corpo humano (XU *et al.*, 2021). Desordens neurodegenerativas também conhecidas como desordens neurológicas são um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados pela perda progressiva da estrutura e função de células neuronais no encéfalo e na medula espinhal (KAHROBA *et al.*, 2021). Dessa forma, falhas ou danos causados a esse sistema podem rapidamente resultar em disfunção fisiológica (XU *et al.*, 2021).

A etiologia das desordens neurodegenerativas ainda não foi completamente elucidada, contudo alguns pesquisadores consideram que o estresse oxidativo pode ser o principal protagonista para o estabelecimento desse tipo de desordem (RIZOR *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2019; KAHROBA *et al.*, 2021; MERELLI *et al.*, 2021). A exposição de células neurais a altos níveis de agentes oxidantes pode resultar em danos irreparáveis ao DNA e às funções mitocondriais cujos prejuízos levam à morte celular (KAHROBA *et al.*, 2021). Além do importante papel do estresse oxidativo para a evolução da neurodegeneração, outros mecanismos essenciais contribuem para o progresso desse processo, incluindo excitotoxicidade, neuroinflamação, transporte axonal prejudicado, agregação de proteínas, estresse no retículo endoplasmático, disfunção mitocondrial e processamento anormal de RNA (DE MUNTER *et al.*, 2020).

As desordens neurológicas podem ser divididas em duas categorias: aguda e crônica. A primeira, que inclui lesão medular espinhal, acidente vascular cerebral e lesão cerebral traumática, ocorre de forma abrupta, geralmente resultando em morte celular localizada (KAHROBA *et al.*, 2021). A neurodegeneração crônica está presente nas doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica (XU *et al.*, 2021). Este tipo de degeneração se desenvolve durante um longo período ocasionando perda de neurônios específicos ou de modo generalizado (KAHROBA *et al.*, 2021). Além disso, a degeneração do SN pode ser causada por infecções e tumores (XU *et al.*, 2021).

A neurodegeneração aguda geralmente tem início após traumas mecânicos, incluindo quedas, acidentes de trânsito ou acidentes relacionados à prática de esportes, gerando lesão medular (YAMAZAKI *et al.*, 2020) ou cerebral (NG; LEE,

2019). Pode, também, ter origem vascular. O AVC isquêmico, por exemplo, é causado pela diminuição ou interrupção do fluxo sanguíneo para o encéfalo, o que ocorre devido ao bloqueio de artérias, resultando em danos irreversíveis devido à privação de oxigênio e aumento da inflamação no local (FORRÓ *et al.*, 2021). Independentemente do tipo de insulto, a neurodegeneração aguda é classificada em lesão primária que ocorre durante o insulto inicial e, lesão secundária que se desenvolve após o insulto e inclui aumento da inflamação e estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e apoptose neuronal (NG; LEE, 2019; XU *et al.*, 2021). A cascata de eventos bioquímicos, celulares e fisiológicos que ocorre durante a lesão primária geralmente se estende para danos secundários que podem se prolongar por anos (XU *et al.*, 2021).

A degeneração crônica do SN, em oposição à aguda, se desenvolve lentamente e pode se manter assintomática por algum tempo, apresentando ou não depósitos de proteínas anormais. A doença de Alzheimer é a desordem neurodegenerativa mais prevalente atualmente, caracterizada inicialmente pela perda de memória, porém durante sua progressão, podem ocorrer falhas cognitivas. Nessa patologia ocorre a deposição intracelular da proteína tau e acumulação de peptídeos beta-amilóides (A $\beta$ ) que formam placas na vasculatura e parênquima cerebral (NIRZHOR; KHAN; NEELOTPOL, 2018; XU *et al.*, 2021). A doença de Parkinson é a segunda desordem neurológica mais comum e possui características que incluem a deterioração progressiva de funções motoras e a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra do SN. Essa patologia também apresenta acumulação proteica: os agregados da proteína  $\alpha$ -sinucleína podem formar estruturas chamadas corpos de Lewy em tecidos cerebrais, contribuindo para a progressão da doença (CHANG *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2021). A doença de Huntington é uma desordem neurodegenerativa autossômica dominante que prejudica funções motoras e cognitivas. Assim como as doenças citadas anteriormente, essa patologia também é caracterizada pela deposição proteica, neste caso, ocorre a agregação da proteína huntingtina (XU *et al.*, 2021). A esclerose lateral amiotrófica é outra doença neurodegenerativa crônica que se caracteriza pela morte progressiva de neurônios motores do corno anterior do encéfalo e medula espinhal, gerando atrofia muscular, fraqueza e, por fim, falha respiratória (ISLAM, 2017).

A restrição de processos neuroregenerativos, assim como a indução inadequada da neurogênese estão associadas a deficiências em funções cognitivas e motoras em desordens neurológicas (KAHROBA *et al.*, 2021). O autorreparo do SNC ocorre pela ação de uma pequena população de células-tronco neurais sendo limitado pelo baixo número dessas células. Sendo assim a neuroregeneração é prejudicada (PINHO *et al.*, 2020). Apesar dos avanços médicos para o controle sintomático dessas doenças, o que envolve melhoria na qualidade de vida e aumento da sobrevida, as terapias atualmente disponíveis atuam apenas em poucos mecanismos neuropatológicos, somente retardando a progressão da morte neuronal por alguns meses (STAFF; JONES; SINGER, 2019). Dessa forma, novas estratégias precisam ser desenvolvidas para englobar toda a complexidade das desordens neurodegenerativas, com o objetivo de alcançar mecanismos mais importantes durante a progressão das patologias e obter melhor recuperação funcional do SN (VENERUSO *et al.*, 2019).

## 1.2 ASTRÓCITOS: HETEROGENEIDADE MOLECULAR E FUNCIONAL NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os astrócitos são uma classe de células neurais, também denominadas astrogliia, de origem ectodérmica e neuroepitelial. São muito heterogêneos em forma e função e apresentam grande plasticidade adaptativa, característica que intensifica sua relevância, especialmente em processos como desenvolvimento, patologias, traumas e envelhecimento (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). Apesar dos neurônios serem considerados os protagonistas do SNC, nas últimas décadas a astrogliia ganhou visibilidade devido às descobertas de suas diversas funções (DOKALIS; PRINZ, 2018). Os astrócitos estão integrados às redes neurais e controlam a homeostase do SNC desde o nível molecular até o órgão completo (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018), desempenhando funções-chave na atividade cerebral (JHA, M. K. *et al.*, 2018; TRENTIN, 2006)

A astrogliia é capaz de manter a homeostase molecular do SNC removendo e catabolizando neurotransmissores, transportando íons e prótons e, eliminando ERO (LIU; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2017). Essas células também sustentam a neurotransmissão pelo fornecimento de precursores de neurotransmissores aos neurônios e controlam a homeostase celular por meio da

neurogênese embrionária e adulta. Além disso, regulam a homeostase metabólica através da síntese de glicogênio, fornecendo substratos energéticos aos neurônios. O estabelecimento da citoarquitetura da substância cinzenta também é uma das funções dos astrócitos, os quais formam contatos com a vasculatura por meio de lâminas gliais e pés vasculares em todas as superfícies do cérebro. Os chamados pés astrocitários envolvem toda a vasculatura, liberando substâncias vasoativas e contribuindo para a hiperemia funcional. Essa população celular ainda controla a barreira hematoencefálica e atua como quimiossensor, sustentando a homeostase sistêmica por meio da regulação do balanço energético, concentração de sódio e pH sanguíneo (JHA, M. K. *et al.*, 2018; JUNG; CHUNG, 2018; NIRZHOR; KHAN; NEELOTPOL, 2018; PEKNY *et al.*, 2019; REVUELTA *et al.*, 2019; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018).

Nos últimos anos, diversos estudos têm reconhecido que os astrócitos exibem diferenças moleculares, estruturais e funcionais no SNC saudável e em resposta a insultos (BHATIA *et al.*, 2019; BURDA; BERNSTEIN; SOFRONIEW, 2016; LIU; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2017). Assim sendo, essas células têm sido identificadas como um elemento primário em diversos distúrbios neurológicos, incluindo as doenças de Parkinson, Alzheimer, Huntington, esclerose múltipla e doenças de príon (revisado por REID; KUIPERS, 2021). Sua ativação excessiva, também conhecida como reatividade astrocitária ou astrocitose/astroglíose reativa, ocorre em contexto pró-inflamatório, onde acontecem mudanças na homeostase do SNC como por exemplo, em condições patológicas, incluindo lesões cerebrais traumáticas, acidente vascular cerebral e doenças neurodegenerativas (JHA, M. K. *et al.*, 2019; LIU; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2017).

Astrócitos ativos (reativos) podem sofrer mudanças morfológicas, incluindo o aumento do corpo celular (somata), alargamento de seus processos e diminuição da quantidade dos processos mais finos (FAIDEAU *et al.*, 2010). Também secretam uma grande variedade de moléculas extracelulares, incluindo fatores neurotróficos, quimiocinas e citocinas. Esses fatores bioativos podem exercer funções neuroprotetoras através da modulação de processos inflamatórios, aumentando a expressão de interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), por exemplo. Por outro lado, a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) aumentam a neuroinflamação, intensificando a neurotoxicidade (PHATNANI;

MANIATIS, 2015; RAJAN *et al.*, 2017). Devido à heterogeneidade molecular de astrócitos reativos em processos inflamatórios, foi proposta uma nova nomenclatura baseada nos diferentes perfis fenotípicos apresentados pela astrogliosa reativa. Os astrócitos foram classificados em A1 (células prejudiciais/reativas) ou A2 (células benéficas/não reativas) (LIU; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2017).

Os astrócitos A1 são incapazes de promover a sobrevivência e o crescimento neuronal, regulam positivamente a expressão de genes relacionados à destruição de sinapses e liberam neurotoxinas, que podem induzir apoptose em oligodendrócitos e neurônios. Além disso, a regulação positiva de genes pró-inflamatórios que ocorre em astrócitos reativos pode resultar em alterações morfológicas, incluindo hipertrofia, gliose, atrofia e astenia; assim como na síntese e liberação anormal de neurotransmissores e perda de funções homeostáticas. Essas particularidades são marcas comuns de distúrbios neurodegenerativos (JHA, M. K. *et al.*, 2018, 2019) que podem limitar o sucesso da recuperação (DOKALIS; PRINZ, 2018). Por outro lado, o fenótipo A2 pode regular positivamente a expressão de fatores neurotróficos (JHA *et al.*, 2019), promovendo o crescimento e sobrevivência de neurônios, montagem de sinapses, além de auxiliar na fagocitose (LANA *et al.*, 2021).

Processos de excitotoxicidade, neuroinflamação e disfunção mitocondrial são características comuns de insultos no SNC (FEHILY; FITZGERALD, 2017; NG; LEE, 2019). Grande parte da toxicidade é gerada pelo glutamato, um neurotransmissor excitatório, que se encontra em excesso e super estimulado no ambiente extracelular durante processos patológicos (LIU; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2017; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). Grandes quantidades de glutamato no espaço extracelular geram influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) em astrócitos. Eventos subsequentes resultam em maior liberação de moléculas sinalizadoras excitatórias, potencializando a excitotoxicidade e, por fim, ativando vias apoptóticas (BREKKE *et al.*, 2017; FRATI *et al.*, 2017). A astrogliosa é responsável pela retirada de 85% a 95% do glutamato extracelular. Contudo, astrócitos reativos possuem menor capacidade de captura (LIU; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2017; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018).

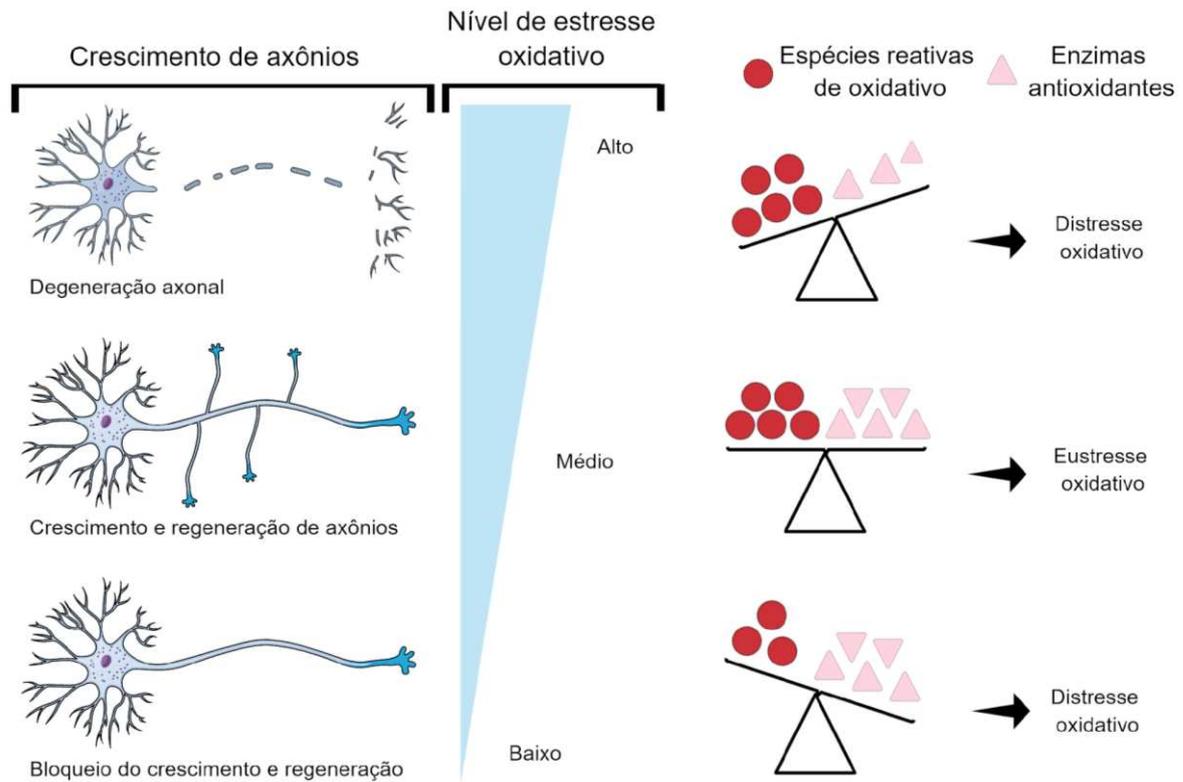
A neuroinflamação ocorre em contextos patológicos devido à ativação da microglia e astrogliosa e, infiltração de células imunes periféricas, incluindo macrófagos

e neutrófilos (JHA *et al.*, 2019; KARVE; TAYLOR; CRACK, 2016; REVUELTA *et al.*, 2019). Os processos fisiológicos dos astrócitos são comprometidos durante reações inflamatórias, como por exemplo, mediadores pró-inflamatórios derivados da microglia podem impedir a metabolização do glutamato, comumente realizada pela astroglia (JHA *et al.*, 2019). Além disso, distúrbios neurológicos também são acompanhados de disfunção mitocondrial (SINGH *et al.*, 2019). Muitos genes associados à doença de Parkinson, ataxias e esclerose lateral amiotrófica estão ligados à mitocôndria, inibindo sua função (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018). Ainda, a disfunção mitocondrial em astrócitos também tem sido observada na doença de Huntington (PHATNANI; MANIATIS, 2015). Considerando que o progresso dos processos de excitotoxicidade, neuroinflamação e disfunção mitocondrial aumentam a produção de agentes oxidantes, a regulação do estresse oxidativo em desordens neurológicas é indispensável (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018; FEHILY; FITZGERALD, 2017; NG; LEE, 2019).

### 1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio molecular possui papel crucial na biologia e é essencial para o funcionamento celular apropriado e para a vida da grande maioria dos organismos. Em processos fisiológicos a redução metabólica univalente dessa molécula gera subprodutos denominados ERO, este termo inclui radicais de oxigênio, assim como componentes não radicalares que podem ser convertidos em espécies radicais (SINGH *et al.*, 2019). ERO são moléculas essenciais em diversos processos fisiológicos incluindo proliferação, diferenciação e migração celular e defesa contra patógenos infecciosos. Contudo, as respostas celulares dependentes dessas moléculas diferem à medida que seus níveis variam (Figura 1). Assim, a denominação utilizada para descrever a presença de concentrações basais de ERO que desempenham um papel fundamental para a preservação da homeostase celular é *eustresse oxidativo*. Enquanto a redução ou aumento excessivo de ERO resulta em *distresse oxidativo* (SIES; JONES, 2020). O termo distresse oxidativo descreve a falta de equilíbrio redox entre defesas antioxidantes e formação de agentes estressores (BELARBI *et al.*, 2017; SIES; JONES, 2020). Este desbalanço resulta em efeitos deletérios para biomoléculas e conseqüentemente para células e tecidos (SINGH *et al.*, 2019).

Figura 1 - Variações em respostas celulares dependentes dos níveis de estresse oxidativo



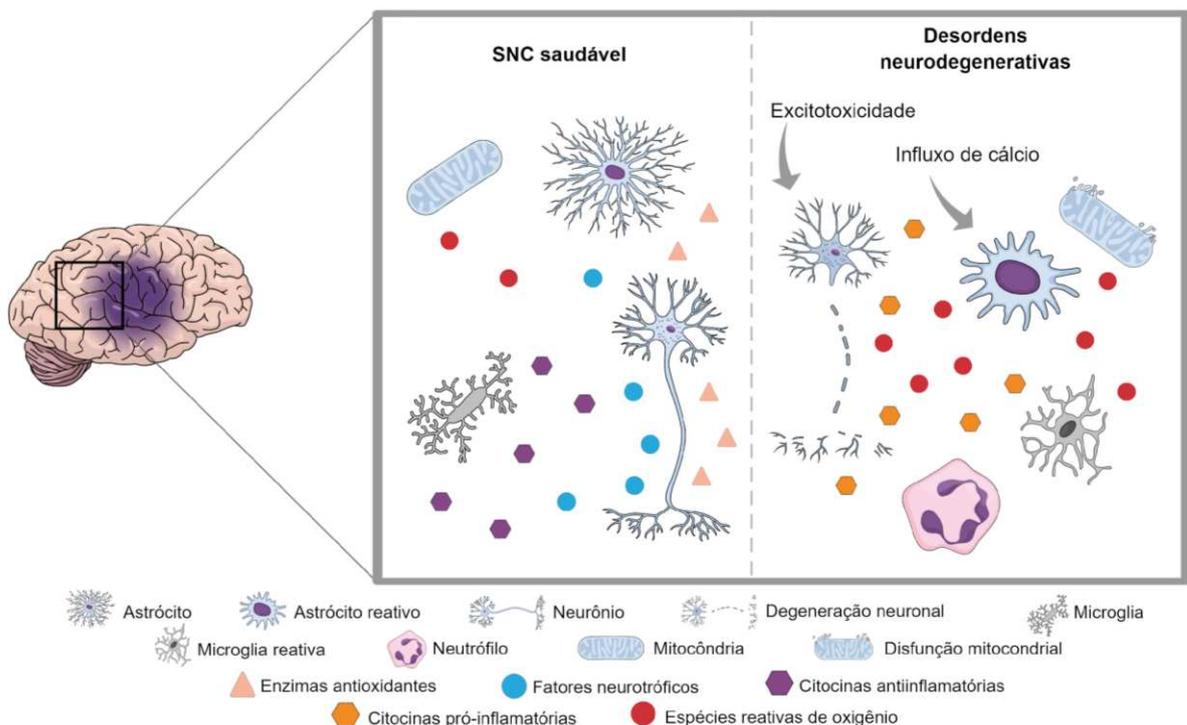
Níveis fisiológicos de estresse oxidativo estão associados ao desenvolvimento normal de neurônios, favorecendo o crescimento e regeneração de axônios após lesão (eustresse oxidativo). Altas concentrações de estresse oxidativo (acima dos níveis fisiológicos) e deficiência no sistema antioxidante causam degeneração neuronal. Concentrações muito baixas de ERO e altas concentrações de enzimas antioxidantes bloqueiam o crescimento e regeneração de axônios, assim como o desenvolvimento de neurônios (distresse oxidativo). Fonte: adaptado de SIES; JONES (2020).

O distresse oxidativo causa ativação de vias metabólicas, bioquímicas e funcionais (CHENG *et al.*, 2019). Altas taxas metabólicas e demandas energéticas exigem função mitocondrial aumentada (ISLAM, 2017), sendo que as mitocôndrias são as principais fontes de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) intracelular (SIES; JONES, 2020). Em condições fisiológicas normais essas organelas produzem cerca de 1-5% de ERO (ISLAM, 2017). Nessa circunstância, o equilíbrio redox é mantido na matriz mitocondrial pelo sistema antioxidante (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018). Todavia, o aumento de estresse oxidativo causa disfunção mitocondrial, gerando mutações no

seu DNA, assim como desequilíbrio na homeostase do cálcio, aumento da permeabilidade de membrana, oxidação de lipídios e carbonilação de proteínas mitocondriais (SINGH *et al.*, 2019). Por fim, o distresse oxidativo gerado causa disfunção celular e, muitas vezes pode ativar vias de apoptose (FEHILY; FITZGERALD, 2017).

O SN possui menor capacidade de regeneração celular quando comparado a outros órgãos e, geralmente, encontra-se metabolicamente superativo. Assim, é o ambiente mais suscetível ao distresse oxidativo (Figura 2) (ISLAM, 2017). Em estados de doença, a regulação positiva da inflamação no SNC gera ERO (MERELLI *et al.*, 2021). Interessantemente, o aumento na produção dessas moléculas pode estimular a transcrição de genes pró-inflamatórios, assim como a liberação de citocinas, incluindo as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e TNF- $\alpha$  e quimiocinas que contribuem para o aumento da neuroinflamação. Neste cenário, astrócitos e microglia são ativados, participando na produção de maiores quantidades de ERO (ISLAM, 2017) e, causando desequilíbrio das defesas antioxidantes endógenas. Em conjunto, esses fatores podem comprometer a neuroregeneração (CHENG *et al.*, 2019).

Figura 2 - SNC saudável e em estado de desordens neurológicas: desequilíbrio da homeostase decorrente da produção excessiva de estresse oxidativo



Processos inflamatórios comuns em desordens neurológicas aumentam os níveis de mediadores pró-inflamatórios através da ativação da microglia, gerando reatividade astrocitária, distresse oxidativo, disfunção mitocondrial, influxo de cálcio e falha na recaptura de glutamato, causando excitotoxicidade. Em conjunto, esses processos podem resultar em neurodegeneração. SNC: sistema nervoso central. Fonte: elaborada pela autora em <https://mindthegraph.com/> (2021).

A superprodução de ERO e a desregulação do sistema antioxidante estão envolvidas em diversas patologias (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018). O estresse oxidativo acima de níveis fisiológicos é caracterizado nas doenças de Alzheimer e Parkinson, assim como em lesões neurais causadas por trauma, infecção ou isquemia (BELARBI *et al.*, 2017; HOU *et al.*, 2020; NIRZHOR; KHAN; NEELOTPOL, 2018; STAVELY; NURGALI, 2020). As ERO envolvidas em processos neurodegenerativos incluem o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) e  $H_2O_2$  (MERELLI *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2019), geradas por fontes endógenas e exógenas. As principais fontes intracelulares enzimáticas são a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e as NADPH oxidases transmembrana (NOX), além de outras oxidases e superóxido dismutases (SOD). As ERO também podem ser formadas a partir de exposição cumulativa a diversos nutrientes, drogas, produtos químicos, radiação e estressores psicológicos decorrentes do estilo de vida do indivíduo (SIES; JONES, 2020). Contudo, em processos neurodegenerativos e lesões no SNC a formação de ERO é substancialmente endógena (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018; FRATI *et al.*, 2017).

Muitos processos neurodegenerativos, incluindo as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington e a doença de neurônio motor compartilham diversas características comuns como a produção de proteínas mal enoveladas. Agregados anormais das proteínas beta-amilóide, tau,  $\alpha$ -sinucleína e huntingtina inibem a função mitocondrial e aumentam o estresse oxidativo, resultando em perda neuronal (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018). O estresse oxidativo também está presente em pacientes que sofreram AVC, especialmente devido a processos inflamatórios e reperfusão (JAYARAJ *et al.*, 2019). Já os neurotraumas, incluindo traumatismo craniano e lesão na medula espinal causam danos a axônios, gerando desregulação do metabolismo do cálcio. Nestas condições ocorre aumento do influxo celular dessa molécula que se acumula no citoplasma e, por fim, é sequestrada pelas mitocôndrias, promovendo aumento na produção de ERO (FRATI *et al.*, 2017).

Para manter o equilíbrio redox e prevenir a produção excessiva de oxidantes, as células contam com uma gama de antioxidantes enzimáticos, incluindo a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), SOD e pequenos antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione (GSH) (STAVELY; NURGALI, 2020). Contudo, o ambiente excessivamente oxidado causa depleção de muitas enzimas antioxidantes, aumentando a neurodegeneração devido a oxidação constante de moléculas essenciais para a atividade funcional das células neurais (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018; RIZOR *et al.*, 2019). Sendo assim, a literatura descreve o uso de produtos de oxidação, incluindo o malondialdeído, 4-hidroxi-nonenal, peroxidação lipídica e nitração proteica como biomarcadores em algumas desordens neurológicas. A produção desses compostos é uma característica comum em diversos insultos no SNC, o que demonstra a relevância da regulação do estresse oxidativo em processos neurodegenerativos (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018).

Alguns estudos têm se dedicado em desenvolver terapias baseadas em antioxidantes que eficientemente reduzem o estresse oxidativo, controlando os danos causados ao SNC em desordens neurológicas (CAGLAYAN *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019). Contudo, tratamentos que utilizam antioxidantes exógenos encontram alguns obstáculos, a maioria desses compostos possuem limitações de permeabilidade, sendo incapazes de cruzar a barreira hematoencefálica (SINGH *et al.*, 2019). Dessa forma, muitos testes em nível clínico que utilizaram essa abordagem falharam no tratamento dessas doenças (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018). Um estudo em humanos mostrou que as vitaminas E e C não são capazes de reduzir o risco de AVC isquêmico, assim como não aumentam a recuperação funcional de pacientes nessa condição (JAYARAJ *et al.*, 2019).

#### 1.4 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Células-tronco mesenquimais, também referidas como células estromais mesenquimais, são multipotentes e de linhagem não hematopoiética (MISHRA *et al.*, 2020). O termo *célula estromal mesenquimal* foi cunhado por Arnold I. Caplan em 1991 devido à sua capacidade de se diferenciar em tipos celulares do tecido conjuntivo em diversos órgãos (CAPLAN, 1991). Contudo, em 2010, o mesmo autor propôs modificar a nomenclatura para células de sinalização medicinal devido aos efeitos terapêuticos provenientes de fatores bioativos secretados em locais

patologicamente afetados (CAPLAN, 2010, 2017). Para fins de padronização, neste trabalho iremos nos referir a elas como *células estromais mesenquimais* (CEM).

As CEM podem ser isoladas de diversas fontes em organismos adultos, incluindo o tecido adiposo, derme, medula óssea, sangue periférico, polpa dentária, endométrio, leite materno, além de tecidos neonatais (placenta, cordão umbilical, membrana e fluido amnióticos) (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019; DELBEN *et al.*, 2021; MISHRA *et al.*, 2020; NERI, 2019; ZOMER *et al.*, 2020). Correspondem a populações celulares heterogêneas que possuem morfologia fusiforme semelhante a fibroblastos (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019; MAZINI *et al.*, 2019), além de possuírem características fenotípicas e funcionais altamente dependentes do doador, do local da coleta (LIU *et al.*, 2020), das condições de cultura (NERI, 2019), das técnicas de isolamento, meio de cultivo e protocolos utilizados e número de passagens (ANKRUM; ONG; KARP, 2014).

A caracterização das CEM obedece critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular: adesão *in vitro* ao plástico; presença de antígenos de superfície mesenquimais (CD73, CD90 e CD105) e ausência dos hematopoiéticos (CD11b, CD14, CD19b, CD34, CD45, CD79a ou antígenos do complexo de histocompatibilidade de classe II, antígenos de leucócitos humanos de classe II); habilidade de diferenciação em adipócitos, condroblastos e osteoblastos (DOMINICI *et al.*, 2006); crescimento rápido *in vitro* e formação de colônias-fibroblastóides (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019).

Entre os diferentes tipos de células-tronco (embrionárias, hematopoiéticas, mesenquimais e pluripotentes induzidas), as CEM estão despertando o interesse de pesquisadores. Muitos estudos têm se dedicado a essas células nos últimos anos devido a sua grande associação a funções básicas como proliferação e diferenciação, angiogênese, controle de estresse oxidativo e regulação de processos inflamatórios (COSTA *et al.*, 2021; DELBEN *et al.*, 2021; MERIMI *et al.*, 2021; PUIG-PIJUAN *et al.*, 2020; ZOMER *et al.*, 2020). Sua aplicabilidade tem sido demonstrada em patologias e lesões, onde podem ser transplantadas para substituir células danificadas, se diferenciando em tipos celulares específicos necessários para a regeneração tecidual. Portanto, as terapias baseadas em CEM são atualmente consideradas promissoras para reparo e regeneração tecidual (MARKOV *et al.*, 2021; MERIMI *et al.*, 2021). Além disso, essas células secretam biomoléculas que

possuem ação parácrina, modulando respostas de células adjacentes de acordo com as características do microambiente local (MISHRA *et al.*, 2020).

Muitos estudos têm sido destinados ao desenvolvimento de terapias variadas que utilizam CEM originárias de diferentes tecidos (COSTA *et al.*, 2021; KLINGEMANN; MATZILEVICH; MARCHAND, 2008; MITCHELL *et al.*, 2019). Diversas desordens no SNC causadas por lesão medular espinhal, acidente vascular cerebral, infecção neural, deficiência cognitiva, esclerose lateral amiotrófica e doenças de Parkinson e Alzheimer são alvos terapêuticos de CEM (CHANG *et al.*, 2019; COFANO *et al.*, 2019; HOU *et al.*, 2020; NAKANO *et al.*, 2016; OTERO-ORTEGA *et al.*, 2019; STAFF; JONES; SINGER, 2019). Contudo, devido a sua característica heterogênea, a fonte tecidual de CEM deve ser escolhida com cautela e a decisão final deve, se possível, ser baseada em estudos prévios que demonstram sua ação terapêutica na patologia investigada (COSTA *et al.*, 2021). A utilização de CEM obtidas de fontes teciduais distintas podem promover diferentes efeitos sobre parâmetros como proliferação, angiogênese, migração e regeneração (MITCHELL *et al.*, 2019; ZOMER *et al.*, 2019). A heterogeneidade das CEM não se reflete somente na sua origem tecidual, mas também em distintos modos de ação, como diferenciação, proliferação, imunofenótipo e mecanismos de secreção de fatores solúveis e vesículas extracelulares (COSTA *et al.*, 2021; DELBEN *et al.*, 2021). Dessa forma, novos estudos são necessários para definir a relação entre CEM e tecidos alvo de terapias.

## 1.5 MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Estudos recentes apontam que a migração e substituição das células, assim como a diferenciação de CEM em outros fenótipos podem ser menos relevantes para terapias quando comparados aos efeitos parácrinos dos biofatores para reparar o tecido após a lesão (MERIMI *et al.*, 2021; SANDONÀ *et al.*, 2021). Em desordens no SNC, é esperado que após o transplante celular, as CEM tenham capacidade de se diferenciar em células gliais e neurônios especializados. Contudo, as células neurais provenientes de CEM muitas vezes falham em mostrar propriedades específicas desses tipos celulares. Além disso, a taxa de diferenciação neural é muito baixa e a viabilidade dessas células após o transplante pode ser comprometida, especialmente devido ao aumento local de estresse oxidativo.

Apesar de haver controvérsia, dados demonstram que a eficácia de CEM é baseada principalmente em suas funções parácrinas (MISHRA *et al.*, 2020; QU; ZHANG, 2017).

As CEM secretam uma grande variedade de fatores parácrinos, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores antiapoptóticos, antifibróticos e angiogênicos, moléculas da matriz extracelular e de adesão celular, hormônios, mediadores lipídicos e antioxidantes que agem em diferentes vias prevenindo maior degeneração do tecido (PRAVEEN *et al.*, 2019; STAVELY; NURGALI, 2020; VENERUSO *et al.*, 2019). O conjunto desses fatores recolhidos juntamente com o meio de cultivo celular é denominado meio condicionado (MC) ou secretoma, sendo responsável por mais de 80% do efeito terapêutico das CEM (COSTA *et al.*, 2021).

Os fatores tróficos secretados por CEM podem ser liberados diretamente para o meio extracelular ou dentro de vesículas extracelulares (VE), sendo conhecidos como fração solúvel e fração vesicular do secretoma, respectivamente. As VE são compostas por exossomos (30–100 nm), microvesículas (100–1000 nm) e corpos apoptóticos (50–4000 nm) (ANDRZEJEWSKA; LUKOMSKA; JANOWSKI, 2019; HARRELL *et al.*, 2020; NAKANO; FUJIMIYA, 2021). A biogênese dos exossomos inicia-se pela formação de endossomos precoces a partir da endocitose da membrana celular. Durante a maturação, os endossomos se tornam corpos multivesiculares que acumulam vesículas intraluminais, as quais podem ser liberadas como exossomos para o ambiente extracelular. Microvesículas são formadas através de brotamento direto da membrana plasmática, enquanto corpos apoptóticos se originam especificamente de células em processo de apoptose (TSIAPALIS; O'DRISCOLL, 2020). Além de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e lipídios, VE podem conter DNA e diversos tipos de RNAs como RNAs mensageiros (mRNAs) e microRNAs (miRNAs) (BOGATCHEVA; COLEMAN, 2019; COSTA *et al.*, 2021). MicroRNAs são moléculas não codificantes que possuem entre 19 e 24 nucleotídeos capazes de regular a expressão de mais de 30% dos genes codificadores de proteínas (NAKANO; FUJIMIYA, 2021). Sendo assim, podem controlar, por exemplo, processos de migração, inflamação, ciclo celular e neoangiogênese. Dessa forma, parte das ações terapêuticas das CEM podem ser atribuídas à transferência de miRNAs envolvidos por VE (CAI *et al.*, 2020; NAKANO; FUJIMIYA, 2021; TSIAPALIS; O'DRISCOLL, 2020). Os RNAs podem desempenhar

uma variedade de funções, sendo capazes de regular processos regenerativos (Al *et al.*, 2021; MITCHELL *et al.*, 2019; TSIAPALIS; O'DRISCOLL, 2020).

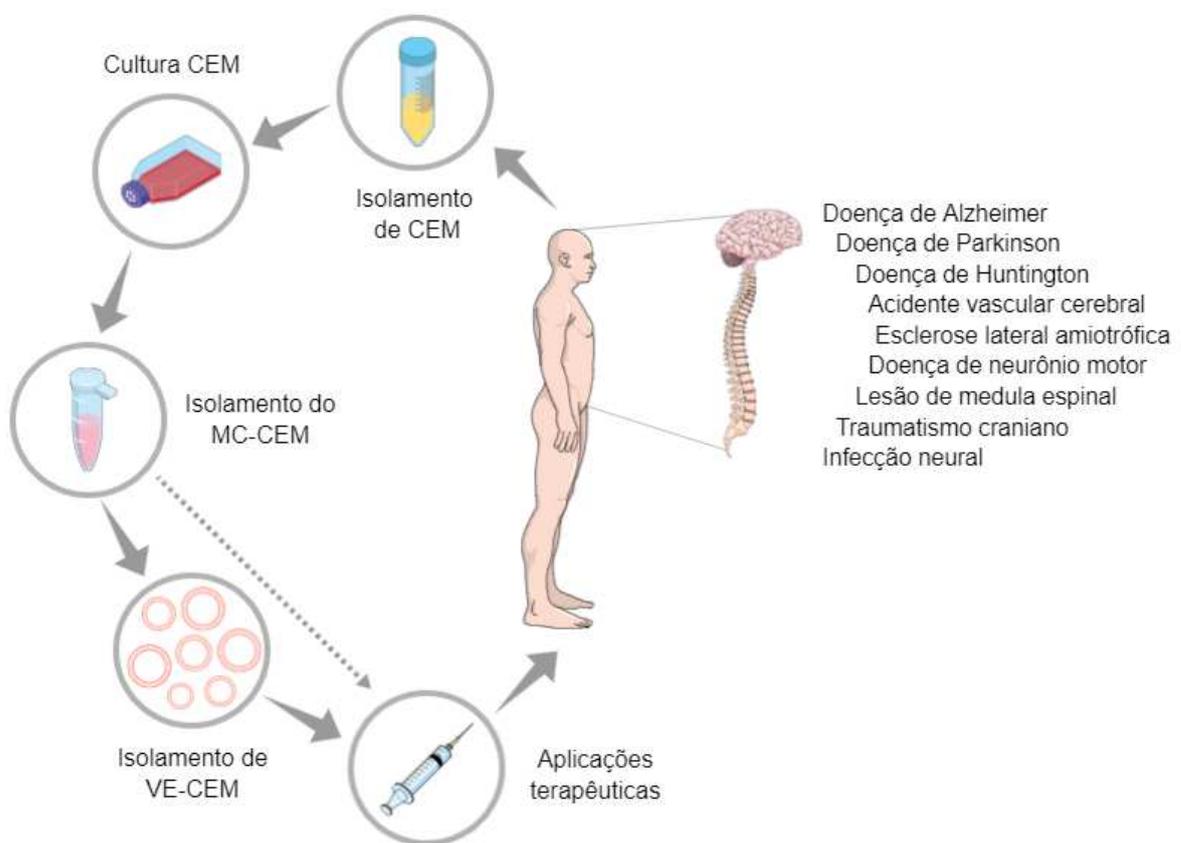
O meio condicionado de CEM (MC-CEM) exerce um papel fundamental, influenciando a comunicação cruzada entre as células e os tecidos adjacentes e mediando funções biológicas. Devido à variedade de fatores bioativos liberados, o MC-CEM exibe maior capacidade sinalizadora quando comparado a tratamentos de administração de citocinas únicas (PRAVEEN *et al.*, 2019). Uma variedade de estudos tem demonstrado o potencial terapêutico dos biofatores de CEM em diferentes desordens neurológicas (D'ANGELO; CIMINI; CASTELLI, 2020; WEN *et al.*, 2020). Voulgari-Kokota *et al.* (2012) mostraram que o MC-CEM derivadas de medula óssea (MC-CEM-MO) é capaz de proteger neurônios *in vitro* e *in vivo* contra excitotoxicidade induzida por glutamato, além de oferecer proteção para células ganglionares retiniais de ratos em modelo de acidente vascular cerebral. Nos experimentos pré-clínicos também foi observado diminuição no grau de ativação de células gliais no hipocampo. Este estudo ainda demonstrou que um dos mecanismos utilizados pelo MC-CEM para proteção neural é a redução da sensibilidade dos neurônios pelo glutamato. Ainda, o secretoma de CEM possui fatores bioativos capazes de estimular o crescimento axonal, favorecendo a neuroregeneração (ASSUNÇÃO-SILVA *et al.*, 2018).

## 1.6 A AÇÃO DO MC-CEM SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM DESORDENS NEUROLÓGICAS

Considerando o envolvimento do estresse oxidativo em diferentes distúrbios e doenças, muitos estudos analisaram os efeitos do MC-CEM sobre a produção de ERO. Os resultados mostram que diversas fontes de CEM possuem potencial antioxidante através de ação parácrina (BADER *et al.*, 2019; ELSHEMY *et al.*, 2021; JHA, K. A. *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016). O tratamento com o MC-CEM derivadas de membrana amniótica humana regulou a homeostase redox local em modelo de infarto do miocárdio, reduzindo as taxas de agentes oxidantes, além de aumentar enzimas antioxidantes como SOD e GPX (MOKHTARI *et al.*, 2020). O secretoma de CEM também foi capaz de regular o estresse oxidativo em células espermáticas e pancreáticas em condições patológicas (BADER *et al.*, 2019; ELSHEMY *et al.*, 2021). Ainda, o MC de células-tronco da matriz do cordão umbilical humano foi

capaz de proteger células PC12 expostas a  $H_2O_2$ , reduzindo significativamente o estresse oxidativo (EBRAHIMI *et al.*, 2018). Além disso, estudos pré-clínicos que utilizaram o MC-CEM apresentaram resultados promissores em ensaios de lesão medular espinal, esclerose lateral amiotrófica, lesão e infecção neural e doença de Parkinson (Figura 3) (CHANG *et al.*, 2018, 2019; HOU *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2020; OTERO-ORTEGA *et al.*, 2019).

Figura 3 - Potencial neuroprotetor do secretoma de CEM em desordens neurológicas



As CEM isoladas de diferentes tecidos, são cultivadas para produção do MC e isolamento de VE, ambas as frações do secretoma de CEM são utilizadas para o desenvolvimento de terapias para diferentes desordens no SNC. CEM: células estromais mesenquimais; MC-CEM: meio condicionado de células estromais mesenquimais; VE-CEM: vesículas extracelulares de células estromais mesenquimais. Fonte: elaborado pela autora em <https://mindthegraph.com/> (2021).

Alguns trabalhos revelaram a ação da porção vesicular de CEM sobre a neuroproteção (JARMALAVIČIUTE *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020). Kaminski *et al.* (2020) mostraram que o tratamento com vesículas extracelulares de

CEM (VE-CEM) derivadas de medula óssea reduziram significativamente a proteína componente complementar C3, biomarcador de astrócitos reativos (A1) em modelo *in vivo* de hipóxia/isquemia enquanto aumentou os níveis de S110A10, marcador de astrócitos não reativos (A2). Também foi observada redução na ativação da microglia através do aumento na expressão de YM-1, marcador de microglia não reativa, além de maturação de oligodendrócitos, intensificando o processo de mielinização. Considerando que TNF- $\alpha$  (liberado por células da microglia ativadas) é o principal indutor de A1, os autores concluíram que a diminuição simultânea de TNF- $\alpha$  e C3 podem ser indicativos de modulação da microglia via VE-CEM, resultando na alteração do fenótipo e funções dos astrócitos. Ainda neste mesmo estudo, os resultados indicaram que as VE-CEM aumentaram a expressão de mRNAs de fatores de crescimento importantes para manutenção de funções fisiológicas celulares, incluindo o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1). A redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias também foram observados. Por fim, foi demonstrado que as VE-CEM oferecem proteção contra a perda de tecido na região do núcleo estriado (KAMINSKI *et al.*, 2020).

Em um modelo *in vitro* de doença de Parkinson, exossomos de CEM derivadas de polpa dentária (CEM-PD) foram capazes de suprimir o estresse oxidativo e apoptose em neurônios dopaminérgicos submetidos a tratamento com 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (JARMALAVIČIUTE *et al.*, 2015). Yang *et al.* (2020) demonstraram que exossomos de CEM derivadas de cordão umbilical apresentam neprilisina e enzima degradante da insulina, proteínas importantes que degradam placas A $\beta$ . Os resultados deste trabalho demonstraram que o tratamento com exossomos foi capaz de reduzir a acumulação de A $\beta$  em modelo *in vivo*, além de diminuir a inflamação e estresse oxidativo e melhorar aprendizagem espacial e memória.

Assim, considerando o potencial antioxidante e neuroterapêutico do secretoma de CEM, decidimos investigar quais biomoléculas estão envolvidas em seu efeito biológico, assim como a ação do MC-CEM sobre a produção de agentes oxidantes em astrócitos.

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente não existem tratamentos que param ou revertem o processo degenerativo ou que promovem regeneração tecidual funcional (DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV; KAZANTSEV, 2018). Assim, torna-se fundamental estudar essa importante condição patológica com o objetivo de obter terapias eficientes. No entanto, ainda existem muitos obstáculos para o desenvolvimento de produtos terapêuticos direcionados à proteção do SNC frente a diferentes tipos de insultos. Neste cenário, terapias experimentais livres de células têm se mostrado promissoras para uma diversidade de modelos patológicos nos últimos anos (BADER *et al.*, 2019; ELSHEMY *et al.*, 2021; MITCHELL *et al.*, 2019). Mais especificamente, o secretoma de CEM tem apresentado efeitos biológicos positivos para modelos de neurodegeneração (ASSUNÇÃO-SILVA *et al.*, 2018; D'ANGELO; CIMINI; CASTELLI, 2020; VOULGARI-KOKOTA *et al.*, 2012).

A ação terapêutica do MC-CEM é mediada por uma gama de fatores tróficos liberados por essas células (AI *et al.*, 2021; BODART-SANTOS *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020). Sendo assim, é fundamental identificar as biomoléculas responsáveis por seu efeito biológico, tornando possível novas descobertas sobre os mecanismos moleculares do secretoma de CEM envolvidos na neuroproteção. Além disso, tendo em vista o importante papel de ERO nos processos neurodegenerativos, a caracterização de biofatores capazes de regular o estado redox celular, contribuindo para a proteção do SNC frente a neuropatologias, é indispensável. Uma revisão da literatura nesta área do conhecimento pode agrupar dados relevantes que atualmente encontram-se dispersos em estudos diferentes, resultando em um trabalho que revela o potencial neuroprotetor do conjunto de produtos secretados por CEM. As informações apresentadas neste tipo de estudo podem auxiliar no planejamento de novas metodologias para o tratamento de uma série de doenças que acometem o SNC.

Trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa demonstrou que o MC-CEM derivadas da derme de prepúcio humano (MC-CEM-DP) reduziu significativamente os níveis de ERO em culturas de astrócitos de camundongos neonatos (FERREIRA, 2020 dados não publicados). Neste contexto, é importante salientar que a astroglia desempenha funções chave no SNC (JHA, M. K. *et al.*, 2018; TRENTIN, 2006), assim como o estresse oxidativo (RIZOR *et al.*, 2019). Em estados de doença os

astrócitos se tornam reativos aumentando processos pró-inflamatórios (JHA, M. K. *et al.*, 2018, 2019), e a neuroinflamação por sua vez gera estresse oxidativo (NG; LEE, 2019). Sendo assim, investigar estudos que demonstram o efeito do MC-CEM na regulação dos níveis de agentes oxidantes em astrócitos é essencial. A revisão desses trabalhos pode ajudar a elucidar erros e acertos nas investigações realizadas até o momento, assim como mostrar os próximos passos em direção a melhoria de tratamentos experimentais para distúrbios neurológicos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar através de revisão da literatura os efeitos do secretoma de CEM na neuroproteção e neuroregeneração.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a Parte 1: Identificar através de análise da literatura potenciais fatores tróficos presentes no MC-CEM que possam estar envolvidos na resposta ao estresse oxidativo em desordens neurológicas, assim como em processos de neuroproteção e neuroregeneração.
- b Parte 2: Investigar através de revisão da literatura o possível efeito protetor do secretoma de CEM em astrócitos no contexto do estresse oxidativo.

## 4 METODOLOGIA

O tema do estudo foi escolhido com base no interesse em investigar a composição do secretoma de CEM relacionada a efeitos neuroterapêuticos. Em seguida, devido aos resultados da primeira fase, surgiu o interesse em analisar as possíveis ações neuroprotetoras exercidas pelo MC-CEM em astrócitos no contexto de estresse oxidativo. Desse modo o trabalho foi desenvolvido em duas etapas: (1) revisão de literatura científica relacionada aos fatores bioativos presentes no MC-CEM potencialmente responsáveis pelos seus efeitos no SNC; (2) revisão de literatura científica relacionada aos efeitos do MC-CEM em astrócitos submetidos a estresse oxidativo.

### 4.1 PARTE 1 – IDENTIFICAÇÃO DE FATORES BIOATIVOS PRESENTES NO MC-CEM COM EFEITO POTENCIAL NO SNC

A pergunta norteadora desta parte do estudo foi: *Quais fatores do secretoma de CEM estão envolvidos na neuroproteção e/ou neuroregeneração?* Essa pergunta foi construída através de leituras de artigos científicos dessa área do conhecimento e de análises de trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa.

#### 4.1.1 Estratégia de busca e apresentação de dados

Para responder à pergunta da seção 5.1 foi realizada uma busca nas bases de dados Pubmed e Scopus utilizando a combinação das palavras-chave: células estromais/tronco mesenquimais, meio condicionado, vesículas extracelulares e proteoma (Tabela 1). Foram analisados títulos e resumos, a fim identificar trabalhos potencialmente elegíveis. Em seguida, estudos que realizaram identificação de fatores bioativos no MC-CEM foram lidos na íntegra e os fatores tróficos com potencial eficácia terapêutica em desordens neurológicas agrupados e apresentados na forma de tabelas.

Tabela 1 - Estratégia de busca da literatura referente aos fatores bioativos presentes no secretoma de CEM com potencial efeito neuroterapêutico

Bases de dados	Estratégia de busca
PubMed	("mesenchymal stem cell" [Title/Abstract]) AND ("conditioned media" [Title/Abstract] OR "conditioned medium" [Title/Abstract] OR secretome [Title/Abstract] OR "bioactive factors" [Title/Abstract] OR exosomes [Title/Abstract] OR microvesicles [Title/Abstract] OR "extracellular vesicles" [Title/Abstract]) AND (proteome [Title/Abstract] OR proteomic [Title/Abstract] OR proteomics [Title/Abstract])
Scopus	TITLE-ABS-KEY("mesenchymal stem cell" AND ("conditioned media" OR "conditioned medium" OR secretome OR "bioactive factors" OR exosomes OR microvesicles OR "extracellular vesicles") AND (proteome OR proteomic OR proteomics))

Fonte: elaborado pela autora (2021).

## 4.2 PARTE 2 – ANÁLISE DOS EFEITOS DO MC-CEM EM ASTRÓCITOS SUBMETIDOS A ESTRESSE OXIDATIVO

A pergunta norteadora desta parte do trabalho foi construída através de leituras de artigos científicos selecionados na seção 5.1.1. Dessa forma, a revisão da literatura reuniu e sintetizou resultados que respondem à seguinte pergunta: *O meio condicionado de CEM humanas protege os astrócitos do estresse oxidativo?*

### 4.2.1 Critérios de inclusão e exclusão e seleção dos trabalhos científicos

Para realização desta parte do trabalho, foram definidos critérios de inclusão e exclusão dos estudos considerando trabalhos experimentais, data de publicação, tipo de lesão neural, tipo de desenho experimental, método de indução de insulto ou lesão, tipo de tratamento, método de aplicação e método de avaliação de tratamentos, espécie animal, idade e sexo em casos de trabalhos *in vivo*. Sendo assim os critérios de inclusão foram: (a) estudos experimentais; (b) estudos que realizaram análises em astrócitos; (c) estudos que analisaram estresse oxidativo; (d) estudos que realizaram tratamento com o MC-CEM; e (e) estudos em língua inglesa e portuguesa. Os critérios de exclusão foram: (a) estudos que não analisaram

estresse oxidativo; (b) estudos que não analisaram astrócitos; (c) estudos que não realizaram tratamento com MC-CEM; (d) estudos não experimentais (revisões narrativas e sistemáticas, meta-análises; assim como resumos de conferências, relatos de casos, artigos técnicos, livros e estudos com cópias de texto completo); e (d) estudos não publicados nas línguas inglesa ou portuguesa. Não foi aplicado limitação de tempo às buscas.

A seleção dos artigos foi realizada em duas fases: Na fase 1 foram analisados títulos e resumos, a fim identificar trabalhos potencialmente elegíveis. Na fase 2 foram aplicados os critérios de inclusão e exclusão e foi realizada a leitura completa dos artigos selecionados na fase 1. As referências que não preencheram os critérios de inclusão foram excluídas.

#### **4.2.2 Fontes de informação e estratégia de busca**

Para identificar estudos potencialmente relevantes, uma busca foi realizada em 15 de abril de 2021 na literatura branca e cinzenta, incluindo cinco bases de dados eletrônicas: PubMed, Embase, Scopus, Web of Science e Google Scholar. As estratégias de pesquisa e escolha das palavras-chave foram definidas com o auxílio de um bibliotecário experiente (Biblioteca Central da UFSC). Foram utilizados termos e descritores em vocabulário controlado de títulos de assuntos médicos - MeSH (do inglês *Medical Subject Headings*) para estabelecer o conjunto de palavras-chave (DHAMMI; KUMAR, 2014). Os termos gerais de busca definidos para esta revisão foram: *células estromais mesenquimais*, *meio condicionado*, *astrócitos* e *estresse oxidativo*. A estratégia de busca completa em cada base de dados foi documentada (Apêndice A) e os trabalhos científicos recuperados foram armazenados no gerenciador bibliográfico EndNote X9 (Thomson Reuters).

#### **4.2.3 Coleta de dados dos estudos científicos**

Os seguintes dados referentes aos dos estudos incluídos nesta parte da revisão foram coletados e transferidos para uma tabela predefinida (Tabela 2): a) identidade do estudo (autor e ano de publicação); b) pergunta de pesquisa e objetivos do estudo; c) características metodológicas (desenho experimental: *in vitro* ou *in vivo*, tipo de procedimento cirúrgico para coleta de CEM, idade dos pacientes,

fonte tecidual de CEM, meio de cultura utilizado, número de passagens celulares, tempo de produção do MC-CEM, fonte de astrócitos, método de indução de insulto, concentração e tempo de tratamento com o MC-CEM); d) análises experimentais (experimentos realizados para responder à pergunta do estudo) e; e) resultados dos estudos incluídos (resposta à pergunta de pesquisa do estudo, efeitos do tratamento com o MC-CEM sobre o estresse oxidativo e sobre outros parâmetros em astrócitos, concentração do MC-CEM e tempo de tratamento mais eficaz e principais conclusões dos resultados).

Tabela 2 - Estratégia para coleta dos dados dos estudos selecionados para a análise qualitativa

<b>Dados coletados</b>	<b>Informações pré-determinadas</b>
Identidade do estudo	1. autor 2. ano de publicação
Pergunta de pesquisa	
Objetivos do estudo	
Características metodológicas	1. desenho experimental: <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> 2. tipo de procedimento cirúrgico para coleta de CEM 3. idade dos pacientes 4. fonte tecidual de CEM 5. meio de cultura utilizado 6. número de passagens celulares 7. tempo de produção do MC-CEM 8. fonte de astrócitos 9. método de indução de insulto 10. concentrações do MC-CEM 11. tempo de tratamento com o MC-CEM
Análises experimentais	
Resultados	1. resposta à pergunta de pesquisa do estudo 2. efeitos do tratamento com o MC-CEM sobre o estresse oxidativo 3. efeitos do tratamento com o MC-CEM sobre outros parâmetros celulares

4. concentração do MC-CEM e tempo de tratamento mais eficazes

5. principais conclusões

---

Abreviações e siglas: CEM: células estromais mesenquimais; MC-CEM: meio condicionado de células estromais mesenquimais. Fonte: elaborado pela autora (2021).

#### **4.2.4 Síntese de resultados**

Os dados extraídos de cada estudo incluído nesta pesquisa foram sintetizados e analisados utilizando o software Microsoft Excel (versão Professional Plus 2019) sendo os resultados apresentados na forma de diagrama de fluxo de dados e as evidências demonstradas através de gráficos e tabelas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PARTE 1: IDENTIFICAÇÃO DE FATORES BIOATIVOS DO MC-CEM ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO REDOX, NEUROPROTEÇÃO E NEURORREGENERAÇÃO

#### 5.1.1 CEM derivadas de diferentes fontes teciduais secretam fatores parácrinos envolvidos na regulação do estresse oxidativo, neuroproteção e neurorregeneração

Nesta parte do trabalho foi realizada uma busca nas bases de dados Pubmed e Scopus para identificar potenciais fatores tróficos presentes no MC-CEM envolvidos na resposta ao estresse oxidativo e relacionados a desordens neurológicas, assim como em processos de neuroproteção e neurorregeneração.

CEM humanas de sete fontes teciduais diferentes foram analisadas: medula óssea (CEM-MO) (KATSUDA *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2012; PIRES *et al.*, 2016; RIAZIFAR *et al.*, 2019), tecido adiposo (CEM-TA) (FIGLIOLINI *et al.*, 2020; KATSUDA *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018; NIADA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2012; SARALAMMA *et al.*, 2019), células perivasculares do cordão umbilical (CEM-CPCU) (PIRES *et al.*, 2016), papila dentária apical (CEM-PDA) (YU *et al.*, 2016), gengiva (CEM-GE) (RAJAN *et al.*, 2017), mucosa olfatória nasal (CEM-MON) (XUN *et al.*, 2020) e geleia de Wharton (CEM-GW) (Tabela 3) (BODART-SANTOS *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Tabela 3 - Tecidos fonte de CEM utilizados para isolamento nos estudos analisados

Fonte tecidual de CEM	Estudos
Geleia de Wharton	BODART-SANTOS <i>et al.</i> , 2019; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012
Gengiva	RAJAN <i>et al.</i> , 2017
Medula óssea	KATSUDA <i>et al.</i> , 2013; KIM <i>et al.</i> , 2012; PIRES <i>et al.</i> , 2016; RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019

Mucosa olfatória nasal	XUN <i>et al.</i> , 2020
Papila dentária apical	YU <i>et al.</i> , 2016
Região perivascular do cordão umbilical	PIRES <i>et al.</i> , 2016
Tecido adiposo	FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020; KATSUDA <i>et al.</i> , 2013; KIM <i>et al.</i> , 2008; MITCHELL <i>et al.</i> , 2019; NAKASHIMA <i>et al.</i> , 2018; NIADA <i>et al.</i> , 2021; PIRES <i>et al.</i> , 2016; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012; SARALAMMA <i>et al.</i> , 2019

---

Fonte: elaborado pela autora (2021).

As buscas realizadas nas bases de dados Pubmed e Scopus recuperam 70 e 356 artigos, respectivamente. Foram selecionados estudos que realizaram identificação de biofatores no secretoma de CEM apenas de tecidos humanos. Após leitura do título e resumo dos estudos recuperados nas bases de dados, foram selecionados quinze artigos que foram lidos na íntegra e incluídos neste trabalho. Sendo que nove estudos realizaram a identificação de proteínas do secretoma total (KIM *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018; NIADA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016; RAJAN *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2012; SARALAMMA *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2016) e seis, proteínas e/ou RNAs presentes nas vesículas extracelulares contidas nesse secretoma (BODART-SANTOS *et al.*, 2019; FIGLIOLINI *et al.*, 2020; KATSUDA *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2012; RIAZIFAR *et al.*, 2019; XUN *et al.*, 2020) (Quadro 1). Os estudos, com exceção de quatro, utilizaram análise proteômica e/ou transcriptômica (BODART-SANTOS *et al.*, 2019; KATSUDA *et al.*, 2013; RAJAN *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2012). Após análise dos artigos selecionados foram identificados 20 mRNAs, 7 microRNAs e 91 proteínas potencialmente envolvidos em processos que incluem regulação redox, neuroproteção/neurorregeneração que serão detalhados a seguir.

Quadro 1 - Estudos selecionados para revisão da literatura que identificaram fatores parácrinos do secretoma total e vesículas extracelulares de CEM

Fração do secretoma	Estudo
Secretoma total	KIM <i>et al.</i> , 2008

	MITCHELL <i>et al.</i> , 2019
	NAKASHIMA <i>et al.</i> , 2018
	NIADA <i>et al.</i> , 2018
	PIRES <i>et al.</i> , 2016
	RAJAN <i>et al.</i> , 2017
	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012
	SARALAMMA <i>et al.</i> , 2019
	YU <i>et al.</i> , 2016
Vesículas extracelulares	BODART-SANTOS <i>et al.</i> , 2019
	FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020
	KATSUDA <i>et al.</i> , 2013
	KIM <i>et al.</i> , 2012
	RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019
	XUN <i>et al.</i> , 2020

Fonte: elaborado pela autora (2021).

### 5.1.2 Proteínas do MC-CEM envolvidas na regulação redox

A síntese dos resultados revelou 29 proteínas presentes no MC-CEM potencialmente envolvidas na regulação de ERO nos trabalhos analisados (MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016) (Tabela 4). Os estudos mostram que as CEM, independente da sua origem tecidual, secretam uma grande diversidade de proteínas. Sendo assim, alguns fatores bioativos foram separados em subgrupos para facilitar a apresentação de dados. Primeiramente, buscou-se identificar a presença de enzimas antioxidantes no MC-CEM que são amplamente conhecidas por sua ação no sistema de defesa celular promovendo o equilíbrio redox da célula (SIES; JONES, 2020).

Tabela 4 - Proteínas do MC-CEM humanas associadas à regulação do estresse oxidativo

Estudo	Fonte de CEM	Símbolo do gene	Proteína
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	ALB	Albumina de soro humano

PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	CST3	Cistatina C
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	PARK7	Deglicase associada a parkinsonismo
MITCHELL <i>et al.</i> , 2019; YU <i>et al.</i> , 2016	CEM-TA, CEM-PDA, CEM-MO	HGF	Fator de crescimento de hepatócito
MITCHELL <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	GDF11	Fator de diferenciação de crescimento 11
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	PEDF	Fator derivado do epitélio pigmentar
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO	GSN	Gelsolina
NAKASHIMA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	GPX1	Glutaciona peroxidase 1
NAKASHIMA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	GSTK1	Glutaciona S-transferase kappa 1
NAKASHIMA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	MGST1	Glutaciona S-transferase microssômica 1
NAKASHIMA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	GSTO1	Glutaciona S-transferase ômega 1
NAKASHIMA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	GSTP1	Glutaciona S-transferase pi 1
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	PPIA	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	PPIB	Peptidil-prolil cis-trans isomerase B
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	PRDX1	Peroxirredoxina 1
NAKASHIMA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5, PRDX6	Peroxirredoxinas 2-6
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	HSP27	Proteína de choque térmico HSP27

MITCHELL <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	HSP60, HSP90, HSP105	Proteínas de choque térmico HSP60, 90, 105
NAKASHIMA <i>et al.</i> , 2018; YU <i>et al.</i> , 2016	CEM-TA, CEM-PDA	SOD1	Superóxido dismutase 1
KIM <i>et al.</i> , 2008; MITCHELL <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	SOD2	Superóxido dismutase 2
KIM <i>et al.</i> , 2008; YU <i>et al.</i> , 2016	CEM-TA, CEM-PDA	SOD 3	Superóxido dismutase 3
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	TXN	Tiorredoxina

Fonte: elaborado pela autora (2021).

Foram encontradas algumas importantes enzimas antioxidantes no MC-CEM, incluindo todas as isoformas da classe das peroxirredoxinas (PRDX), sendo a PRDX1 presente em CEM-MO, CEM-TA e CEM-CPCU (PIRES *et al.*, 2016), enquanto as PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5 e PRDX6 foram identificadas em CEM-TA (NAKASHIMA *et al.*, 2018) (Tabela 4). Contudo, é possível que estejam presentes em CEM de outras fontes teciduais uma vez que a maioria dos estudos analisados não apresentou a lista completa de proteínas identificadas no secretoma de CEM, apenas moléculas de interesse do estudo. As SOD (SOD1, SOD2 e SOD3) correspondem a outra classe de enzimas do sistema antioxidante cuja diminuição implica em perda neuronal em desordens neurológicas, incluindo as doenças de Alzheimer e Parkinson (DAVIS; PENNYPACKER, 2017). As SOD1 e SOD3 foram encontradas no secretoma de CEM-PDA (YU *et al.*, 2016) e de CEM-TA juntamente com a SOD2 (KIM *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018). Outras enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase 1 (GPX1) e glutathione S-transferases (GST), incluindo a glutathione S-transferase kappa 1, glutathione S-transferase microssômica 1, glutathione S-transferase ômega 1 e glutathione S-transferase pi 1 foram identificadas no secretoma de CEM-TA (NAKASHIMA *et al.*, 2018).

Alguns dos estudos analisados demonstraram que as CEM secretam fatores de crescimento (PIRES *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2016) que podem estar envolvidos em processos de regulação redox no SNC (CABEZAS *et al.*, 2019), incluindo o fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF) (PIRES *et al.*, 2016),

fator de crescimento do nervo (NGF) (RIBEIRO *et al.*, 2012), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (YU *et al.*, 2016) e VEGF (PIRES *et al.*, 2016).

O potencial de restauração da homeostase redox do secretoma de CEM não está limitado às enzimas antioxidantes e aos fatores de crescimento, e contém ainda uma grande variedade de proteínas que agem na produção de agentes oxidantes na célula. Neste sentido o secretoma de CEM-TA, CEM-MO e CEM-CPCU contém peptidil-prolil cis-trans isomerase A (PPIA), peptidil-prolil cis-trans isomerase B (PPIB), tioredoxina (TRX), deglycase associada a parkinsonismo (PARK7) também conhecida como DJ1, albumina de soro humano (ALB) e cistatina C (CST3) que atuam como importantes mediadores antioxidantes e relevantes para a neuroproteção (PIRES *et al.*, 2016).

O MC-CEM contém ainda diversas proteínas de choque térmico (HSP) (MITCHELL *et al.*, 2019; PIRES *et al.*, 2016). A HSP27 encontrada no secretoma de CEM-TA, CEM-MO e CEM-CPCU (PIRES *et al.*, 2016) demonstrou ser um modulador de dano cerebral isquêmico em modelos *in vivo*, regulando os níveis de estresse oxidativo (VIDYASAGAR; WILSON; DJAMALI, 2012). Por outro lado, as HSP60, HSP90 e HSP105 identificadas no meio condicionado de CEM-TA (MC-CEM-TA), fornecem proteção contra o estresse oxidativo atuando na restauração do equilíbrio redox (FAN, 2012). As CEM-MO secretam gelsolina (PIRES *et al.*, 2016), cuja expressão aumenta em resposta a estímulos estressores, como a alta produção de agentes oxidantes, o que demonstra suas propriedades antioxidantes (CHAUHAN; JI; CHAUHAN, 2008).

Em conjunto esses estudos mostram que o MC-CEM contém uma grande diversidade de proteínas que ajudam a manter o equilíbrio redox celular. Dessa forma, pode ser considerado um potente agente terapêutico contra desordens neurológicas e outras patologias que apresentam desregulação em níveis de moléculas oxidantes.

### **5.1.3 Proteínas do MC-CEM envolvidas na neuroproteção**

A busca de fatores bioativos nos estudos selecionados resultou na identificação de 36 proteínas presentes no MC-CEM potencialmente envolvidas na neuroproteção ou neuroregeneração (KIM *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018; NIADA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016; RAJAN *et al.*,

2017; RIBEIRO *et al.*, 2012; SARALAMMA *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2016) (Tabela 5). Alguns dos trabalhos apontam para a presença de fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento do nervo (NGF) (RAJAN *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2012) que desempenham papel fundamental na diferenciação neuronal e proteção de células diferenciadas (SALGADO *et al.*, 2010). Outros fatores de crescimento como o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) (MITCHELL *et al.*, 2019) e fator de crescimento de hepatócito (HGF) encontrados no secretoma de CEM (RIBEIRO *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2016) promovem sobrevivência das células neurais frente à apoptose (SALGADO *et al.*, 2010). A superexpressão de HGF protegeu células epiteliais pigmentares da retina contra danos causados por isquemia-reperfusão (SHIBUKI *et al.*, 2002). Além disso, TGF- $\beta$  (RAJAN *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2016) e neurotrofina 3 (NT3), assim como a citocina antiinflamatória IL-10 são importantes mediadores de sobrevivência, protegendo células NSC-34 (células semelhantes a neurônios motores) contra a morte celular induzida em modelo de lesão *in vitro*; demonstrando assim sua relevância em estudos relacionados a diversas doenças degenerativas de neurônio motor como atrofia muscular espinhal, lesão medular espinhal e esclerose lateral amiotrófica (RAJAN *et al.*, 2017).

Tabela 5 - Proteínas presentes no MC-CEM humanas com potencial efeito neuroprotetor

Estudo	Fonte de CEM	Símbolo do gene	Proteína	Ação no SNC*
SARALAMMA <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	ANXA1	Anexina A1	Atividade antiinflamatória
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	CDH2	Caderina 2	Neurodiferenciação e crescimento de neurito
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	CST3	Cistatina C	Atividade antiapoptótica
NIADA <i>et al.</i> , 2018; PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	CLU	Clusterina	Prevenção contra agregação de proteínas, degradação de proteínas mal enoveladas

PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	DCN	Decorina	Ação antiinflamatória e antifibrótica, dissolução parcial de cicatrizes crônicas
PIRES <i>et al.</i> , 2016; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012	CEM-TA, CEM-MO	SCF	Fator de células-tronco	Sobrevivência e proliferação celular
YU <i>et al.</i> , 2016	CEM-PDA	FGF7	Fator de crescimento de fibroblasto 7	Proliferação e diferenciação celular
RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012; YU <i>et al.</i> , 2016	CEM-PDA, CEM-TA	HGF	Fator de crescimento de hepatócitos	Sobrevivência celular
YU <i>et al.</i> , 2016	CEM-PDA, CEM-MO	VEGFC	Fator de crescimento endotelial vascular C	Angiogênese
RAJAN <i>et al.</i> , 2017; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012	CEM-TA, CEM-GE, CEM-CPCU	NGF	Fator de crescimento do nervo	Diferenciação e sobrevivência neuronal
MITCHELL <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1	Sobrevivência celular
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	GDF11	Fator de diferenciação de crescimento 11	Angiogênese, neurogênese, ação antiinflamatória
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO	CXCL12	Fator derivado de célula estromal 1	Diferenciação de neurônios, orientação de axônios
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM-CPCU	PEDF	Fator derivado do epitélio pigmentar	Neuroproteção contra excitotoxicidade por glutamato
YU <i>et al.</i> , 2016	CEM-PDA, CEM-MO	NEGF2	Fator de promoção de crescimento de neurito 2	Crescimento de neuritos, migração celular
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-CPCU	CCN1	Fator de rede de comunicação celular 1	Proliferação, angiogênese

PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM- CPCU	CSF1	Fator estimulador de colônias de macrófagos 1	Regulação negativa de morte neuronal
NIADA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	CRLF1	Fator semelhante ao receptor de citocina 1	Regulação negativa da apoptose em neurônios
RAJAN <i>et al.</i> , 2017; YU <i>et al.</i> , 2016	CEM-GE, CEM- PDA, CEM-MO	TGFβ	Fator de crescimento transformador beta	Proteção contra a morte celular
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO	GSN	Gelsolina	Desenvolvimento de oligodendrócitos, regeneração de tecidos
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM- CPCU	PAI1	Inibidor do ativador de plasminogênio 1	Proteção contra a morte celular
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020; PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM- CPCU	IL6	Interleucina 6	Atividade antiapoptótica, neuroproteção contra excitotoxicidade por glutamato
NIADA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	CXCL8	Interleucina 8	Neuroproteção
RAJAN <i>et al.</i> , 2017	CEM-GE	IL-10	Interleucina 10	Proteção contra a morte celular
NIADA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	LGMN	Legumain	Memória, sobrevivência e proliferação de neurônios
YU <i>et al.</i> , 2016	CEM-PDA	NRP2	Neuropilina 2	Crescimento axonal, angiogênese
RAJAN <i>et al.</i> , 2017	CEM-GE	NT3	Neurotrofina 3	Proteção contra a morte celular
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM- CPCU	PPIA	Peptidil-prolil cis- trans isomerase A	Atividade antiapoptótica

PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM- CPCU	PPIB	Peptidil-prolil cis- trans isomerase B	Atividade antiapoptótica
YU <i>et al.</i> , 2016	CEM- PDA, CEM-MO	PTN	Pleiotrofina	Crescimento de neuritos, migração celular
NIADA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	PCSK9	Pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9	Neurogênese, diferenciação de neurônios
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM- CPCU	HSP27	Proteína de choque térmico HSP27	Atividade antiapoptótica
NIADA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	SCRG1	Proteína responsiva a scrapie 1	Desenvolvimento do sistema nervoso, atividade antiinflamatória
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM- CPCU	BASP1	Proteína 1 solúvel em ácido cerebral	Crescimento de neuritos
NIADA <i>et al.</i> , 2018	CEM-TA	AXL	Receptor de tirosina- proteína quinase OVNI	Regulação negativa de apoptose neuronal, migração de neurônios
PIRES <i>et al.</i> , 2016	CEM-MO, CEM-TA, CEM- CPCU	SEMA7A	Semaforina 7A	Crescimento axonal

\*As funções foram obtidas a partir de buscas nas plataformas online [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) e [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org). Fonte: elaborado pela autora (2021).

As análises permitiram ainda identificar no MC-CEM fatores parácrinos relacionados à neuroregeneração (Tabela 5), incluindo o fator de promoção de crescimento de neurito 2 (NEGF2) e a pleiotrofina (PTN) (YU *et al.*, 2016), importantes mediadores nos processos de crescimento de neuritos e migração de células nervosas (KADOMATSU; MURAMATSU, 2004). Foram identificadas a proteína 1 solúvel em ácido cerebral (BASP1) e a caderina 2 (CDH2) que auxiliam no crescimento de neuritos, sendo que a última também desempenha um papel importante durante a neurodiferenciação (GAO *et al.*, 2001; KORSHUNOVA *et al.*,

2008; PIRES *et al.*, 2016). Além disso, a semaforina 7A (SEMA7A), uma proteína que estimula crescimento axonal, está presente no secretoma de CEM (PHAM; BAZAN, 2021; PIRES *et al.*, 2016).

Por fim, foram encontradas no MC-CEM proteínas relacionadas ao processo de neuroproteção (Tabela 5) (MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018) em diferentes modelos de desordens neurológicas (SALGADO *et al.*, 2010) como: (1) o inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI1) com papel antiapoptótico em neurônios, prevenindo a desintegração de redes neurais (PIRES *et al.*, 2016; SOEDA *et al.*, 2008); (2) a neuropilina 2 (NRP2) (YU *et al.*, 2016) que interage com VEGF, estando envolvida com angiogênese e crescimento de axônios (HOU; JIANG; SMITH, 2008); (3) a decorina (DCN) que possui ação antiinflamatória e antifibrótica, atenuando a formação de lesões agudas e levando à dissolução parcial de cicatrizes crônicas estabelecidas (ESMAEILI *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2016); (4) a clusterina (CLU) que previne agregação de proteínas, sendo importante em Alzheimer e Parkinson, além de realizar degradação de proteínas mal enoveladas e *debris* celulares (CHAPLOT; JARVELA; LINDBERG, 2020; PIRES *et al.*, 2016).

#### **5.1.4 Vesículas extracelulares de CEM como mediadores parácrinos em desordens neurológicas**

##### **5.1.4.1 O conteúdo proteico das vesículas extracelulares de CEM com ação no SNC**

Alguns estudos selecionados para esta parte do trabalho se concentraram em analisar os fatores bioativos presentes nas VE-CEM, identificando 35 proteínas possivelmente envolvidas em processos de neuroproteção e neuroregeneração (Tabela 6) (BODART-SANTOS *et al.*, 2019; FIGLIOLINI *et al.*, 2020; KATSUDA *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2012; RIAZIFAR *et al.*, 2019; XUN *et al.*, 2020). O estudo de Bodart-Santos *et al.* (2019) em modelo de doença de Alzheimer e culturas hipocâmpais, demonstrou que as VE-CEM derivadas da geleia de Wharton (VE-CEM-GW) possuem atividade antioxidante, reduzindo ERO a níveis basais. Os efeitos positivos foram atribuídos à ação da catalase, visto que VE contendo catalase inativada não foram capazes de prevenir a formação de ERO.

Tabela 6 - Proteínas presentes nas VE-CEM humanas com potencial neuroprotetor

<b>Estudo</b>	<b>Fonte de CEM</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Ação no SNC*</b>
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	ANXA4	Anexina A4	Regulação negativa de Nf-kB
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	CD44	Antígeno CD44	Regulação positiva de ERK1 e ERK2
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	CD9	Antígeno CD9	Migração de células gliais
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	APOE	Apolipoproteína E	Formação e manutenção de sinapses
BODART-SANTOS <i>et al.</i> , 2019	CEM-GW	CAT	Catalase	Atividade antioxidante, proteção de sinapses
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	MIC1	Citocina 1 inibidora de macrófagos	Regulação negativa de macrófagos
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	CFL1	Cofilina 1	Regulação negativa do processo de apoptose
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	ARF4	Fator de ribosilação 4 do ADP	Resposta à lesão axonal
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	EEF2	Fator de alongação 2	Proliferação de células gliais
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	GDF15	Fator de diferenciação de crescimento 15	Indução de Treg
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	GDF5	Fator de diferenciação de crescimento 5	Diferenciação de neurônios, regulação negativa do processo apoptótico
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019; XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MO; CEM-MON	LGALS1	Galectina 1	Inibição de mediadores de resposta inflamatória
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	GPC1	Glypican 1	Orientação de axônio, formação de mielina
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	GREM1	Gremlina 1	Regulação negativa de quimiotaxia de monócitos
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	IL-13	Interleucina 13	Ação antiinflamatória, sobrevivência neuronal

KATSUDA <i>et al.</i> , 2013	CEM-TA; CEM-MO	MME	Neprilisina	Degradação de beta-amilóide
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	NRG1	Neuregulina 1	Crescimento e diferenciação de neurônios e de células gliais
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	NPTN	Neuroplastina	Crescimento de neurito
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	POSTN	Periostina	Extensão de projeção de neurônio
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	SCARB2	Proteína 2 de membrana associada ao lisossomo	Regulação positiva do desenvolvimento da projeção neuronal
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	IGFBP4	Proteína 4 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina	Regulação positiva de MAPK
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	AHNAK	Proteína associada à diferenciação de neuroblasto AHNAK	Diferenciação de neurônios
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	HSP70	Proteína de choque térmico 70	Atividade antiapoptótica
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	LTBP	Proteína de ligação ao fator de crescimento de transformação latente $\beta$	Estabilidade de TGF- $\beta$ , indução de Treg
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	NOTCH2	Proteína 2 homóloga ao locus neurogênico de Notch	Orientação de axônio
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	BMP15	Proteína morfogenética óssea 15	Desenvolvimento neuronal e sinaptogênese
KIM <i>et al.</i> , 2012	CEM-MO	PDGFR	Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas	Proliferação celular
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	OXTR	Receptor de oxitocina	Regulação positiva da montagem das sinapses
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	MET	Receptor do fator de crescimento de hepatócitos	Sobrevivência e proliferação celular

XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico	Morfogênese de projeção de neurônios
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	RGN	Regucalcina	Regulação negativa de processos apoptóticos
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	LAMB2	Subunidade beta 2 da laminina	Orientação e extensão do axônio
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	SPOCK 1	Testican 1	Neurogênese, diferenciação e migração neuronal
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	SLC38A 2	Transportador de aminoácido neutro acoplado a sódio 2	Transporte de neurotransmissores
XUN <i>et al.</i> , 2020	CEM-MON	TMOD2	Tropomodulina 2	Crescimento de axônio e neurito

\*As funções foram obtidas a partir de buscas nas plataformas online [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) e [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org). Fonte: elaborado pela autora (2021).

Outro estudo realizado com exossomos derivados de CEM-TA e CEM-MO demonstrou que essas nanopartículas transportam neprilisina (KATSUDA *et al.*, 2013), uma enzima muito importante para degradação de placas amilóides (NIRZHOR; KHAN; NEELOTPOL, 2018); sendo que exossomos de CEM-TA transferidos para células de neuroblastoma (N2a) contribuíram para a redução intra e extracelular de peptídeos beta-amilóides. Contudo, as CEM-TA apresentaram maiores níveis de neprilisina e, diferentemente das CEM-MO, expressaram a proteína enzimaticamente ativa (KATSUDA *et al.*, 2013).

Análise proteômica em exossomos derivados de CEM-MO estimuladas com interferon gama (IFN $\gamma$ ) revelou diversas proteínas envolvidas em processos imunomoduladores e neuroprotetores, incluindo a citocina inibidora de macrófago 1 (MIC1), galectina-1 (LGALS1), proteína de choque térmico 70 (HSP70), proteína de ligação ao fator de transformação de crescimento latente  $\beta$  (LTBP), subunidade beta 2 da laminina (LAMB2), testican 1 (SPOCK1), gremlina 1 (GREM1), fator de diferenciação de crescimento 15 (GDF15), periostina (POSTN), glypican 1 (GPC1), anexina A4 (ANXA4), regucalcina (RGN) e cofilina 1 (CFL1). Além disso, este mesmo estudo encontrou RNAs capazes de induzir células T reguladoras

demonstrando o importante papel dessas moléculas na ação antiinflamatória dos exossomos (RIAZIFAR *et al.*, 2019).

Em conjunto, esses estudos demonstram que as VE-CEM possuem ação pleiotrópica sobre o SNC em estado de doença, agindo de diferentes maneiras para retomar as condições homeostáticas do microambiente.

#### 5.1.4.2 O conteúdo de RNAs das VE-CEM com ação no SNC

Os estudos selecionados identificaram ainda 20 mRNAs, dentre 62 mRNAs presentes nas VE-CEM derivadas de tecido adiposo, de proteínas relacionadas à neuroproteção (FIGLIOLINI *et al.*, 2020; RIAZIFAR *et al.*, 2019) (Tabela 7). O tratamento com exossomos de CEM-MO estimuladas com IFN $\gamma$  reduziu a desmielinização em modelo *in vivo* de esclerose múltipla (RIAZIFAR *et al.*, 2019). Neste estudo foi encontrado o mRNA que codifica para a proteína indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1), amplamente estudada devido aos seus efeitos imunomodulatório e antiinflamatório em modelos de esclerose múltipla. Ainda foram observados outros mRNAs que codificam para proteínas como a timosina beta 10 (TMSB10), com potencial antiinflamatório e pode agir como inibidor de migração celular; a proteína de ligação à interleucina 18 (IL18BP), responsável pela inibição da citocina pró-inflamatória IL-18; o fator gama de maturação da glia (GMFG) que estimula a regeneração neural e; a proteína induzida por interferon com repetições de tetratricopeptídeo 2 (IFIT2) que atua inibindo a migração celular.

Tabela 7 - mRNAs presentes nas VE-CEM humanas com potencial neuroprotetor

<b>Estudo</b>	<b>Fonte de CEM</b>	<b>Símbolo do gene</b>	<b>mRNA</b>	<b>Ação no SNC*</b>
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	AGRN	Agrin	Regulação negativa do processo apoptótico
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020;	CEM-TA	ANGPT1	Angiopietina 1	Angiogênese, regeneração de órgãos
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	CTNNB1	Catenina beta 1	Diferenciação de neurônios, extensão de projeção de neurônios

FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	HGF	Fator de crescimento de hepatócito	Regulação negativa de morte celular programada mediada por peróxido de hidrogênio, regeneração de projeção de neurônios
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	MDK	Fator de crescimento de ligação à heparina	Crescimento de neuritos
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A	Diferenciação neuronal, orientação de axônios
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	EGF	Fator de crescimento epitelial	Proliferação celular
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1	Regulação negativa da resposta neuroinflamatória
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	TGFβ1	Fator de crescimento transformador beta 1	Proliferação celular
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	GMFG	Fator gama de maturação da glia	Estimulação da regeneração neural
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	IDO1	Indoleamina 2,3-dioxigenase 1	Regulação negativa da resposta neuroinflamatória
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	LEP	Leptina	Regulação negativa do processo apoptótico
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	NRP2	Neuropilina 2	Crescimento axonal, angiogênese
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	PAX7	Proteína de caixa emparelhada 7	Regulação negativa do processo apoptótico
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	IL18BP	Proteína de ligação à interleucina 18	Inibição da citocina pró-inflamatória IL-18
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	IFIT2	Proteína induzida por interferon com repetições de tetratricopeptídeo 2	Inibição da migração celular
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	CCL2	Proteína quimioatraente de monócitos 1	Regulação positiva da atividade do receptor de glutamato NMDA

FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	IKBKB	Quinase inibidora do fator nuclear kappa-B subunidade beta Subunidade A do	Regulação positiva da atividade do fator de transcrição NF-kappaB
FIGLIOLINI <i>et al.</i> , 2020	CEM-TA	PDGFA	fator de crescimento derivado de plaquetas	Proliferação celular
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM- MO	TMSB10	Timosina beta 10	Regulação negativa da resposta inflamatória, inibição da migração celular

\*As funções foram obtidas a partir de buscas nas plataformas online [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) e [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org). Fonte: elaborado pela autora (2021).

Foram encontrados ainda sete microRNAs presentes em VE-CEM (Tabela 8) (MITCHELL *et al.*, 2019; RIAZIFAR *et al.*, 2019). Análises de bioinformática realizadas por Mitchell *et al.* (2019) identificaram diversos miRNAs, incluindo os miRNA-16 e miRNA-24 envolvidos em processos antiinflamatórios; o miR23a relacionado à angiogênese e os miRNA-let7c e miRNA-145 que desempenham funções antiinflamatória e regenerativa. Além disso, Riazifar *et al.* (2019) demonstraram que o miR-146b, presente em exossomos derivados de CEM-MO, apresenta potencial antiinflamatório. Esses resultados apontam o importante papel dos miRNAs secretados por CEM em processos inflamatórios e regenerativos, demonstrando a relevância de novos estudos para caracterização dessas moléculas bioativas nas VE-CEM.

Tabela 8 - MicroRNAs presentes nas VE-CEM humanas com potencial neuroprotetor

<b>Estudo</b>	<b>Fonte de CEM</b>	<b>MicroRNA</b>	<b>Ação no SNC</b>
MITCHELL <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	miR-16	Processo antiinflamatório
MITCHELL <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	miR-23a	Potencial angiogênico
MITCHELL <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	miR-24	Processo antiinflamatório

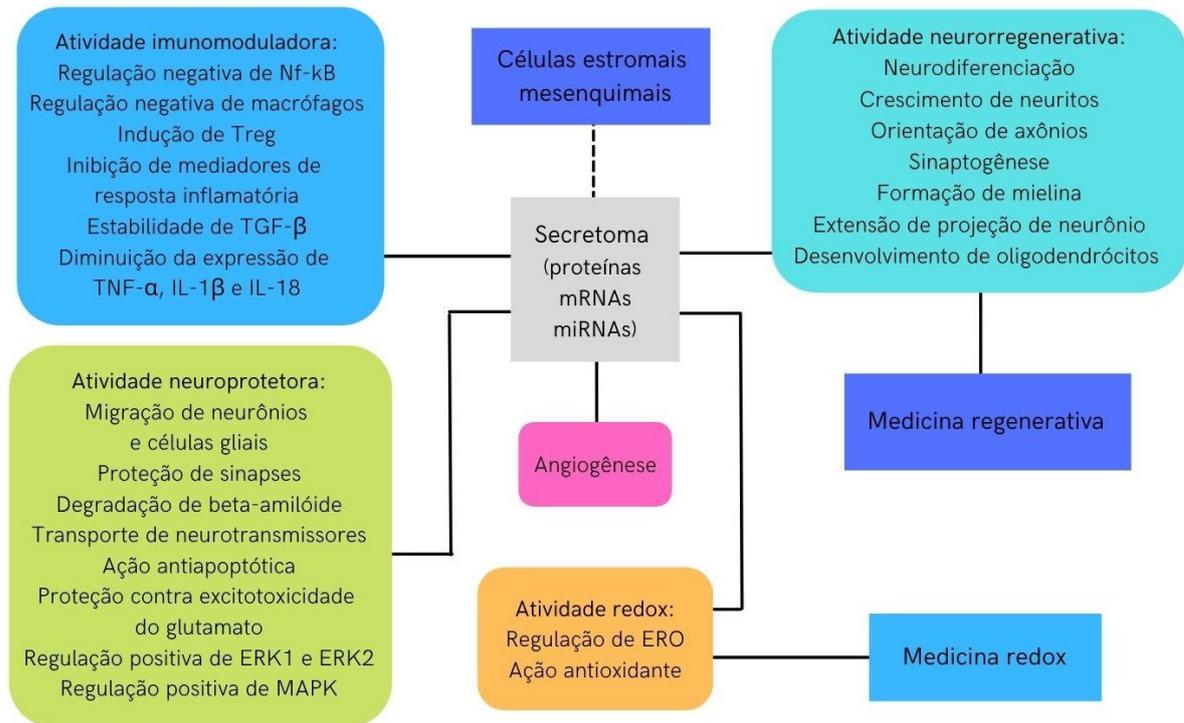
MITCHELL <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	miR-125b	Processo antiinflamatório
MITCHELL <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	miR-145	Processo antiinflamatório e regeneração
MITCHELL <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	miR-let7c	Processo antiinflamatório e regeneração
RIAZIFAR <i>et al.</i> , 2019	CEM-MO	miR-146b	Processo antiinflamatório

---

Fonte: elaborado pela autora (2021).

A análise dos estudos realizada nesta parte do trabalho permitiu identificar um grande número de fatores parácrinos secretados por CEM que estão relacionados a ações terapêuticas e que atuam de forma pleiotrópica sobre o SNC (Figura 4). Ainda, essa investigação possibilitou expandir o conhecimento sobre os mecanismos de ação dos componentes presentes no MC-CEM, contribuindo para o desenvolvimento de técnicas de padronização para utilização futura em ensaios clínicos.

Figura 4 - Funções pleiotrópicas dos fatores bioativos de CEM no SNC



Ação dos fatores parácrinos presentes no secretoma de CEM no SNC, incluindo atividade imunomoduladora, neuroprotetora, neurorregenerativa, angiogênica e redox que podem ser investigadas para futura utilização na medicina regenerativa. Fonte: elaborado pela autora (2021).

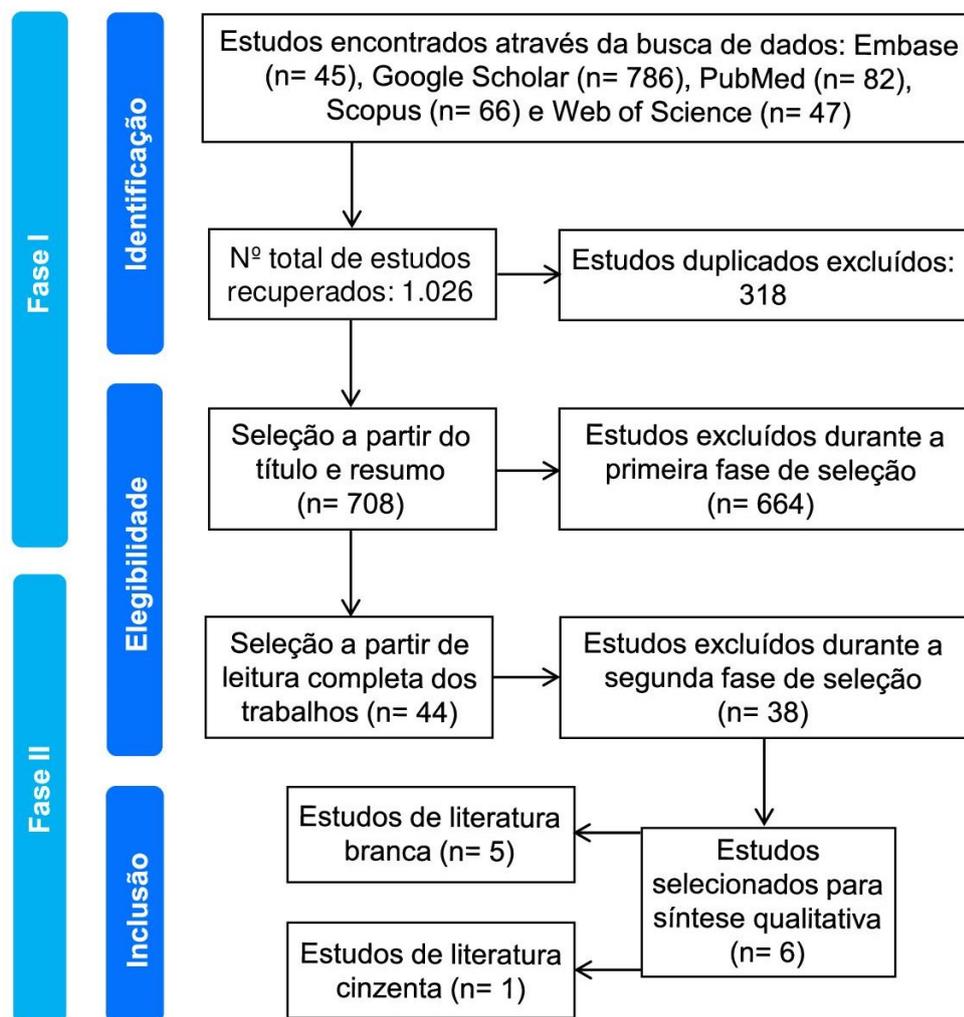
## 5.2 RESULTADOS PARTE 2: EFEITOS DO MC-CEM SOBRE ASTRÓCITOS *IN VITRO*

### 5.2.1 Os efeitos do MC-CEM sobre o estresse oxidativo em astrócitos é pouco explorado na literatura

Evidências da literatura demonstram que a utilização do MC-CEM pode ser uma opção vantajosa para a redução de ERO a níveis basais, auxiliando na recuperação das funções fisiológicas do tecido nervoso (STAVELY; NURGALI, 2020; RAJAN *et al.*, 2017; WEN *et al.*, 2020). Esta parte do trabalho se propôs a responder à pergunta: *O meio condicionado de CEM humanas protege os astrócitos do estresse oxidativo?* Para isso, foi realizada uma busca minuciosa na literatura utilizando termos definidos e protocolos de busca (DHAMMI; KUMAR, 2014), relacionando estresse oxidativo, meio condicionado de células estromais/tronco

mesenquimais e astrócitos (Apêndice A). A estratégia de busca recuperou 1.026 estudos nas bases de dados utilizadas (Embase: 45, Google scholar: 786, PubMed: 82, Scopus: 66 e Web of Science: 47) (Figura 5). Após exclusão de duplicações, utilizando o gerenciador bibliográfico EndNote X9 (Thomson Reuters), restaram 708 estudos, que foram submetidos à primeira fase de seleção (leitura de títulos e resumos), 664 estudos que não preencheram os critérios de inclusão para esta pesquisa foram excluídos nesta etapa.

Figura 5 - Fluxograma de identificação das fases de seleção de dados da literatura



A seleção dos trabalhos para análise qualitativa foi realizada em duas fases: A fase 1 compreendeu a análise de títulos e resumos dos estudos encontrados nas bases de dados. Foram identificados 1.026 trabalhos, após exclusão de duplicações, restaram 708 estudos. Nesta fase 664 estudos que não preencheram os critérios de inclusão para esta pesquisa foram excluídos após a leitura dos títulos e resumos. Na fase 2 foi realizada a leitura completa de 44 artigos selecionados na primeira fase, 38 trabalhos foram excluídos. Apenas seis estudos cumpriram os critérios de inclusão e foram

selecionados para síntese qualitativa, sendo cinco estudos de literatura branca e um de literatura cinzenta. Fonte: elaborado pela autora (2021).

Na segunda fase de seleção (leitura de textos completos), foram analisados 44 estudos restantes da primeira fase, sendo que 38 trabalhos considerados não elegíveis foram excluídos, pois não preencheram o critério de inclusão: (c) estudos que analisaram estresse oxidativo, ou seja, não avaliaram a produção de ERO celular. Apenas 6 referências cumpriram os critérios de inclusão e foram selecionadas para síntese qualitativa, sendo cinco estudos de literatura branca (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014) e um de literatura cinzenta (FERREIRA, 2020).

### 5.2.2 Variabilidade metodológica dos estudos analisados para o cultivo de CEM e obtenção do MC-CEM

As características metodológicas relacionadas às CEM produtoras de MC foram avaliadas a partir dos dados extraídos conforme descrito na Tabela 2. As CEM produtoras dos meios condicionados eram derivadas de tecido adiposo (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; TORRENTE *et al.*, 2014), medula óssea, polpa dentária (SONG *et al.*, 2015) e derme de prepúcio (Tabela 9) (FERREIRA, 2020). No entanto, as CEM-TA coletadas por procedimento cirúrgico de lipoaspiração foram as mais utilizadas (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019). A idade dos doadores variou de 6 a 28 anos, sendo os mais jovens de 6 a 13 anos de doadores de derme de prepúcio (FERREIRA, 2020).

Tabela 9 - Procedimentos de coleta e cultivo de CEM nos estudos selecionados para síntese qualitativa

Estudo	Fonte de CEM humana	Procedimento cirúrgico	Idade do paciente (anos)	Meio de cultivo	Nº de passagens celulares
BAEZ-JURADO <i>et al.</i> , 2018a	CEM-TA	Lipoaspiração	24 a 28	DMEM + 10% SFB	3 a 5

BAEZ-JURADO <i>et al.</i> , 2018b	CEM-TA	Lipoaspiração	24 a 28	DMEM + 10% SFB	3 a 5
BAEZ-JURADO <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	Lipoaspiração	24 a 28	DMEM + 10% SFB	3 a 5
FERREIRA, 2020	CEM-DP	Postectomia	6 a 13	DMEM + 10% SFB	4
	CEM-PD	Extração de dentes permanentes saudáveis	14 a 22	DMEM + 10% SFB	5
SONG <i>et al.</i> , 2015	CEM-MO	Adquiridas de Lonza (Walkersville, MD)	Não informado	Meio de cultivo basal + suplemento de crescimento + L-glutamina	4
TORRENTE <i>et al.</i> , 2014	CEM-TA	Não informado	Não informado	DMEM + 10% SFB	3 a 4

Abreviações e siglas: CEM-TA: célula estromal mesenquimal de tecido adiposo; DMEM: meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco; SFB: soro fetal bovino; CEM-DP: célula estromal mesenquimal de derme de prepúcio; CEM-PD: célula estromal mesenquimal de polpa dentária; CEM-MO: célula estromal mesenquimal de medula óssea. Fonte: elaborado pela autora (2022).

Apesar da variabilidade de fontes de CEM, algumas características metodológicas relacionadas ao cultivo celular eram semelhantes: todos os trabalhos utilizaram o meio de cultivo padrão Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos e 48 horas de condicionamento (período de cultivo sem acréscimo de SFB). Apenas Song *et al.* (2015) acrescentaram suplementos de crescimento de CEM e L-glutamina em culturas de CEM-MO. A CEM utilizadas estavam entre as passagens 3 e 5 e nenhum trabalho realizou técnicas de concentração ou pré-condicionamento do MC-CEM (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014).

### 5.2.3 Variabilidade metodológica dos estudos analisados para cultivo e análise das culturas de astrócitos

Os estudos apresentaram variabilidade metodológica em relação ao cultivo de astrócitos. Todos os trabalhos foram desenvolvidos *in vitro* utilizando principalmente linhagens de astrócitos (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; TORRENTE *et al.*, 2014), apenas Song *et al.* (2015) e Ferreira (2020) utilizaram culturas primárias de astrócitos humanos e de camundongos, respectivamente (Tabela 10). Nos estudos analisados foram empregados apenas dois métodos para indução de insultos em astrócitos: depleção de glicose e de oxigênio (DGO) (SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014) ou lesão *in vitro* combinada à privação de glicose, sendo esta última a metodologia mais utilizada, aplicada em três estudos (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019). Todos os métodos de insulto foram capazes de aumentar o estresse oxidativo nas culturas astrocíticas (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014). Apenas um trabalho manteve o meio de cultura em condições padrão, sem insulto (FERREIRA, 2020). As concentrações de MC-CEM utilizadas variaram de 0,5% a 100%, sendo que Baez-jurado *et al.* (2018a), Baez-jurado *et al.* (2018b), Baez-jurado *et al.* (2019) e Torrente *et al.*, (2014) utilizaram concentrações mais baixas de MC (0,5% a 15%); enquanto Ferreira (2020) e Song *et al.* (2015) usaram o MC em concentrações de 50% a 100%. Os tempos de tratamento com o MC-CEM foram de 24, 30 e 48 horas (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014). Apenas um trabalho realizou pré-tratamento com o MC-CEM por 2h anteriormente ao insulto (SONG *et al.*, 2015), o restante dos estudos utilizou o MC-CEM somente após o insulto (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014). A variedade de características metodológicas entre estudos investigados dificulta a realização de análises comparativas.

Tabela 10 - Características metodológicas referentes aos insultos e tratamentos utilizando o MC-CEM em culturas astrocíticas nos estudos selecionados para a revisão

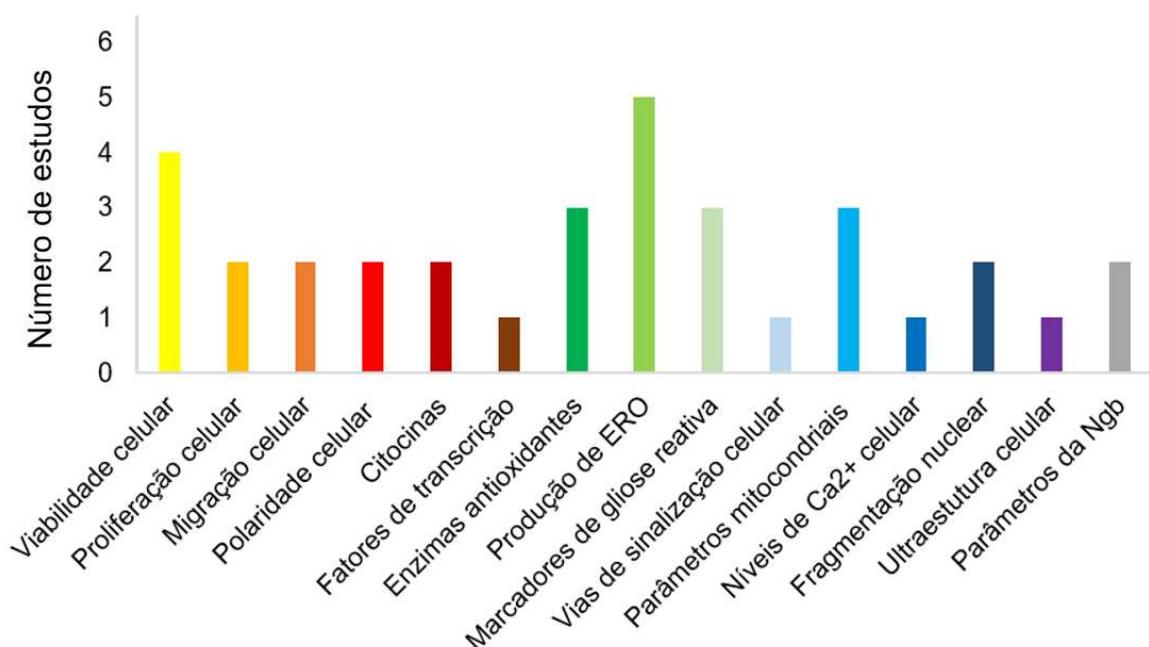
Estudo	Fonte de CEM humana	Fonte de astrócitos	Método de indução de insulto	Concentração do MC (%)	Tempo de tratamento
BAEZ-JURADO <i>et al.</i> , 2018a	CEM-TA	Linhagem de astrócitos T98G (glioblastoma)	Lesão <i>in vitro</i> e depleção de glicose	2	24h
BAEZ-JURADO <i>et al.</i> , 2018b	CEM-TA	Linhagem de astrócitos humanos normais	Lesão <i>in vitro</i> e depleção de glicose	5; 10 e 15	30 h
BAEZ-JURADO <i>et al.</i> , 2019	CEM-TA	Linhagem de astrócitos T98G (glioblastoma)	Lesão <i>in vitro</i> e depleção de glicose	2	24h
FERREIRA, 2020	CEM-DP	Astrócitos corticais de camundongo	Condições normais de cultivo	50 e 100	24h
SONG <i>et al.</i> , 2015	CEM-PD; CEM-MO	Astrócitos humanos primários	Depleção de glicose e oxigênio	100	2h pré-tratamento; 2h pós-tratamento
TORRENTE <i>et al.</i> , 2014	CEM-TA	Linhagem de astrócitos T98G (glioblastoma)	Lesão <i>in vitro</i> e depleção de glicose	0,5; 2; e 5	24 e 48 h

Abreviações e siglas: MC: meio condicionado; CEM-TA: célula estromal mesenquimal de tecido adiposo; CEM-DP: célula estromal mesenquimal de derme de prepúcio; CEM-PD: célula estromal mesenquimal de polpa dentária; CEM-MO: célula estromal mesenquimal de medula óssea. Fonte: elaborado pela autora (2022).

Para investigar as análises experimentais empregadas nos estudos selecionados para esta revisão, os dados dos trabalhos foram extraídos individualmente e, em seguida agrupados na forma de gráfico e tabela. As análises realizadas mostram que os estudos desenvolveram diferentes metodologias experimentais.

A avaliação da produção de estresse oxidativo foi a análise mais amplamente realizada, presente em 5 estudos (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014), seguida do ensaio de viabilidade, realizado em 4 trabalhos (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014). Contudo, apenas 50% dos estudos investigaram a presença de enzimas antioxidantes, parâmetros mitocondriais (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019) e marcadores de gliose reativa (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015), aspectos importantes em desordens neurológicas (FEHILY; FITZGERALD, 2017; JHA *et al.*, 2019; NG; LEE, 2019). Somente o estudo de Baez-Jurado *et al.* (2019) avaliou os níveis de cálcio intracelular e vias de sinalização. De maneira semelhante, a avaliação da ultraestrutura celular foi explorada em somente um trabalho (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a). Além disso, outros parâmetros relevantes, incluindo proliferação (FERREIRA, 2020; TORRENTE *et al.*, 2014), migração e polaridade celular (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; TORRENTE *et al.*, 2014), fragmentação nuclear (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b) e parâmetros da neuroglobulina (NGB) (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019) foram explorados em apenas 33% dos estudos (Figura 6).

Figura 6 - Análises experimentais



A análise mais amplamente realizada entre os estudos incluídos nesta revisão foi a determinação da produção de estresse oxidativo, seguida do ensaio de viabilidade. ERO: espécies reativas de oxigênio; Ca<sup>2+</sup>: cálcio; NGB: neuroglobulina. Fonte: elaborado pela autora (2022).

No contexto do estresse oxidativo, a avaliação da produção de ERO foi realizada de duas maneiras distintas: através dos testes 2',7'- diacetato de diclorofluorescina (DCFDA) (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015) e diidroetídio (DHE) (BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; TORRENTE *et al.*, 2014). Foram analisadas apenas três enzimas antioxidantes GPX1, SOD2, (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019) e CAT (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019) (Tabela 11). Somente o estudo de Ferreira (2020) verificou a expressão do fator de transcrição fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e apenas o estudo de Baez-Jurado *et al.* (2018a) avaliou a produção de espécies reativas de nitrogênio através de marcação de 3-nitrotirosina. Este estudo também avaliou danos celulares causados pelo aumento nos níveis de estresse oxidativo analisando a peroxidação lipídica e danos ao DNA (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a). Por fim, dois dos estudos incluídos neste trabalho avaliaram a expressão de citocinas pró e antiinflamatórias (BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2015), visto que o desequilíbrio nos níveis dessas moléculas resulta em produção excessiva de radicais livres, diretamente relacionados ao aumento da neuroinflamação (ISLAM, 2017). Esses resultados demonstram a grande variedade de metodologias utilizadas para análise de culturas astrocitárias no contexto de estresse celular.

Tabela 11 - Proteínas analisadas nos estudos selecionados para a análise qualitativa

<b>Grupos de proteínas analisadas</b>	
Citocinas	IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , CSF2
Enzimas antioxidantes	SOD2, CAT, GPX1
Fatores de transcrição	Nrf2
Marcadores de gliose reativa	GFAP, nestina, vimentina, musashi-1
Vias de sinalização celular	AKT, p-AKT, ERK1/2, p-ERK

Abreviações e siglas: IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; IL-10: interleucina 10; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; CSF2: fator estimulador de colônias de macrófagos 2; SOD2:

superóxido dismutase 2; CAT: catalase; GPX1: glutationa peroxidase 1; Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; AKT: proteína quinase B; p-AKT: proteína quinase B fosforilada; ERK1/2: quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2; p-ERK: quinase regulada por sinal extracelular fosforilada. Fonte: elaborado pela autora (2022).

#### 5.2.4 Análise das perguntas e das respostas de pesquisa dos estudos selecionados

Nesta parte do trabalho foram analisadas qualitativamente as perguntas assim como as respostas de pesquisas dos estudos e sua relação com o tema estresse oxidativo. Para isso, os dados de cada estudo foram extraídos e compilados para melhor apresentação dos resultados (Quadro 2).

Quadro 2 – Perguntas e respostas de pesquisa realizadas pelos estudos selecionados para a revisão

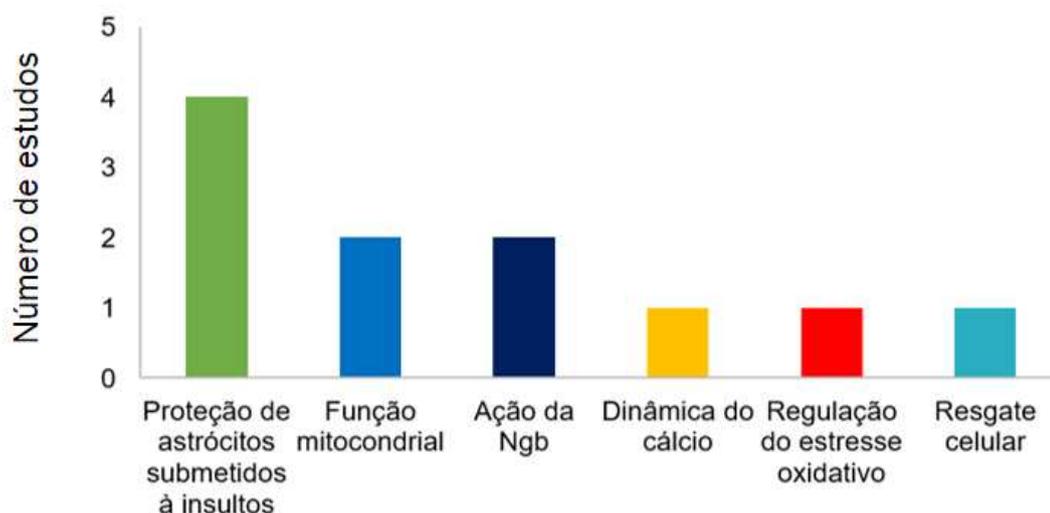
Estudo	Questão de pesquisa	Resposta à questão de pesquisa
BAEZ-JURADO et al., 2018a	O MC-CEM-TA contribui para o resgate celular ou proteção da função mitocondrial em astrócitos? Qual é o papel da Ngb na mediação dos efeitos do MC-CEM-TA?	O MC-CEM-TA favorece a homeostase mitocondrial através da regulação positiva de Ngb, redução do dano oxidativo e protege os astrócitos, prevenindo o estresse oxidativo induzido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e apoptose astrogial
BAEZ-JURADO et al., 2018b	Qual o efeito do MC-CEM-TA na proteção de astrócitos humanos submetidos à lesão in vitro?	O MC-CEM-TA exerce efeitos protetores sobre os astrócitos humanos expostos à lesão in vitro
BAEZ-JURADO et al., 2019b	Quais são os mecanismos de ação do MC-CEM-TA em astrócitos expostos à lesão in vitro e privação de glicose? O bloqueio da Ngb está relacionado com a dinâmica do cálcio e outras funções mitocondriais?	O MC-CEM-TA protege os astrócitos contra a perda de viabilidade e estresse oxidativo, possivelmente através da regulação de citocinas e mobilização do cálcio, além de regular a expressão de Ngb e aumentar a expressão de genes responsáveis pela dinâmica mitocondrial. O bloqueio da Ngb reduziu a expressão de proteínas antioxidantes e modificou os níveis de cálcio celular

FERREIRA, 2020	O MC-CEM-DP possui efeito antioxidante em astrócitos de camundongos neonatos in vitro?	O MC-CEM-DP apresentou ação antioxidante em astrócitos in vitro, representada pela redução na produção de ERO nas culturas astrocitárias
SONG et al., 2015	As CEM-PD e seu MC exercem efeito protetor contra a privação de glicose e oxigênio em astrócitos humanos quando comparadas as CEM-MO e seu MC?	As CEM-PD e seu MC conferem efeitos citoprotetores superiores em astrócitos in vitro em comparação com as CEM-MO. Os efeitos podem estar relacionados à redução da gliose reativa, assim como a diminuição na expressão de radicais livres e de IL-1b
TORRENTE et al., 2014	Qual é o papel do MC-CEM-TA em astrócitos danificados por lesão in vitro, associada ao comprometimento metabólico induzido por privação de glicose	O MC-CEM-TA pode regular processos de proliferação, fechamento de lesão, mudanças morfológicas e estresse oxidativo em culturas astrocitárias

Abreviações e siglas: MC: meio condicionado; MC-CEM-TA: meio condicionado de células estromais mesenquimais de tecido adiposo; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; NGB: neuroglobulina; MC-CEM-DP: meio condicionado de células estromais mesenquimais de derme de prepúcio; CEM-PD: célula estromal mesenquimal de polpa dentária; CEM-MO: célula estromal mesenquimal de medula óssea; IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta. Fonte: elaborado pela autora (2022).

A análise demonstrou que as perguntas de pesquisa não estão diretamente correlacionadas ao estresse oxidativo (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014), exceto no estudo de Ferreira (2020). Os estudos se concentram em investigar o papel do MC-CEM na proteção de astrócitos à insultos (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014); na função mitocondrial; na ação da neuroglobulina (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019) e na dinâmica do cálcio (BAEZ-JURADO *et al.*, 2019) (Quadro 2 e Figura 7).

Figura 7 - Principais objetivos dos estudos selecionados para a análise qualitativa



A maioria dos estudos analisados investigou o papel do MC-CEM na proteção de astrócitos submetidos a insultos. NGB: neuroglobulina. Fonte: elaborado pela autora (2022).

Destaca-se ainda que a maioria dos trabalhos apresentou respostas de pesquisa relacionadas à regulação da produção de ERO e, conseqüente na regulação do equilíbrio redox em culturas astrocíticas (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et*

*al.*, 2014) com exceção do estudo de Baez-Jurado *et al.* (2018b), que se limitou a avaliar a lesão *in vitro*.

### 5.2.5 Efeito protetor do MC-CEM em astrócitos

As diferenças metodológicas empregadas pelos estudos analisados, incluindo as fontes teciduais de CEM, os modelos de insulto, bem como as concentrações do MC e o tempo de tratamento (Tabela 10) impossibilitaram análise quantitativa comparativa dos resultados. Contudo, foi possível realizar uma análise qualitativa dos efeitos do MC-CEM sobre as culturas astrocíticas.

Nos estudos avaliados foi demonstrado que o secretoma de CEM é capaz de proteger estruturas mitocondriais, alterando parâmetros como o potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b) e massa mitocondrial; além de exercer proteção para a ultraestrutura da crista mitocondrial (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a) e regular os níveis de expressão de genes envolvidos em processos da cadeia respiratória e dinâmica mitocondrial (*mnf1*, *mnf2*, *opa1*, *fis1* e *Drp1*) (BAEZ-JURADO *et al.*, 2019). Ainda, pode preservar outras estruturas como o citoesqueleto, mantendo a ultraestrutura organizada (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a); controlar os níveis de  $Ca^{2+}$  citoplasmático (BAEZ-JURADO *et al.*, 2019) e aumentar as taxas de NGB (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a), regulando sua localização subcelular (BAEZ-JURADO *et al.*, 2019). A NGB parece ter uma função fundamental para a preservação da homeostase astrocítica, visto que experimentos de bloqueio de função desta proteína resultaram em alterações na dinâmica do  $Ca^{2+}$  e funções mitocondriais. O MC-CEM também foi responsável pela indução da expressão de vias de sobrevivência como fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT) e quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2/proteínas quinases ativadas por mitogênicos (ERK1/2/MAPK) (BAEZ-JURADO *et al.*, 2019). Contudo, um estudo mostrou que o secretoma nas concentrações de 50% e 100% reduziram a fosforilação de ERK em astrócitos (FERREIRA, 2020). O MC-CEM também apresentou efeitos positivos sobre a reatividade astrocítica, bloqueando a gliose reativa através da diminuição na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015), *nestina* e *musashi-1* (SONG *et al.*, 2015).

Apesar de, até o presente momento, poucos trabalhos abordarem o tema, os resultados desta revisão de literatura demonstram que a utilização do secretoma de CEM apresenta efeitos positivos nas culturas de astrócitos sob diferentes condições de estresse, independentemente do tempo de tratamento (Quadro 3); sendo que concentrações iguais ou superiores a 2% do MC mostraram potencial ação terapêutica *in vitro* (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014). Além disso, o MC-CEM protegeu as culturas astrocitárias contra o estresse oxidativo excessivo, reduzindo danos ao DNA, peroxidação lipídica e nitração de proteínas (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a). Foram observadas reduções de 200 vezes nas concentrações de  $O_2^-$  em astrócitos tratados com 2% de MC-CEM (TORRENTE *et al.*, 2014). Outro estudo mostrou que células que receberam 50 e 100% de MC apresentaram redução de 33% nas taxas de ERO (FERREIRA, 2020). Contudo, estes trabalhos não podem ser comparados entre si devido suas diferenças metodológicas. Por outro lado, Song *et al.* (2015) comparando os secretomas de CEM-PD e CEM-MO observaram potencial terapêutico semelhante para redução de ERO.

Quadro 3 - Efeitos do MC-CEM sobre o estresse oxidativo e outros parâmetros analisados em astrócitos *in vitro* nos estudos incluídos nesta revisão

Estudo	Efeitos do MC-CEM sobre o estresse oxidativo	Outros efeitos do MC-CEM sobre a biologia de astrócitos	Principais conclusões
BAEZ-JURADO <i>et al.</i> , 2018a	Aumento da expressão de GPX-1, SOD2 e catalase	Aumento na expressão de NGB. O bloqueio dessa proteína reduziu o efeito protetor do MC-CEM	O MC-CEM previne o estresse oxidativo e a apoptose de astrócitos, aumentando os níveis de NGB e sugerindo sua relevância para a função mitocondrial e a neuroproteção
	Bloqueio de NGB alterou o $\Delta\psi_m$ e aumentou a produção de ERO	Recuperação de fragmentação nuclear e condensação da cromatina	
	Diminuição de danos ao DNA, nitração de proteínas e	Manutenção do $\Delta\psi_m$ , recuperação da massa e proteção da ultraestrutura da crista mitocondrial	

	peroxidação lipídica	Proteção da estrutura celular com conservação do citoesqueleto	
BAEZ-JURADO <i>et al.</i> , 2018b	Aumento na expressão de GPX1 e SOD2 em astrócitos tratados com 15% de MC-CEM	Aumento da sobrevivência, migração celular, índice de polaridade e fechamento da ferida	O MC protegeu astrócitos, confirmando que as CEM-TA podem contribuir para a manutenção das funções de astrócitos em diferentes patologias cerebrais
		Diminuição de fragmentação nuclear e recuperação do $\Delta\psi_m$	
BAEZ-JURADO <i>et al.</i> , 2019	Diminuição da expressão dos genes ND1 e ND2	Regulação de citocinas. Regulação do $Ca^{2+}$ e da dinâmica e genes mitocondriais	O MC-CEM é uma alternativa promissora para a proteção de astrócitos em patologias cerebrais porque pode regular a inflamação e recuperação celular em lesões no SNC
	Bloqueio de NGB reduziu a expressão de SOD2, catalase e GPX1	Indução da expressão de cascatas de sobrevivência como AKT/pAKT e ERK1/2/pERK	
		Regulação da localização subcelular de NGB. Seu bloqueio afetou a dinâmica do $Ca^{2+}$ e funções mitocondriais	
FERREIRA, 2020	Redução de 33% na produção de ERO	Sem diferença significativa na proliferação celular.	O MC-CEM possui potencial para reduzir a produção de radicais livres em astrócitos, sendo um candidato promissor para o tratamento de desordens no SNC
		O MC 50% não afetou a sobrevivência. O MC 100% diminuiu o número de células	
	Redução de Nrf2	Redução na expressão de GFAP	
SONG <i>et al.</i> , 2015	Pré e pós-tratamento com MC-CEM atenuaram os níveis de ERO em astrócitos	MC conferiu citoproteção. O grau de citoproteção do MC-CEM-PD foi maior em comparação com o MC-CEM-MO	O MC-CEM-PD conferiu efeitos citoprotetores superiores em astrócitos, podendo ser uma alternativa terapêutica para AVC isquêmico
	Os efeitos do MC-CEM-PD e MO sobre a produção de ERO foram similares	O MC-CEM-PD bloqueou gliose reativa	
		Redução da expressão de IL-1 $\beta$ e aumento da expressão de IL-10	

TORRENTE <i>et al.</i> , 2014	Ensaio de lesão <i>in vitro</i> (sem privação de glicose) não afetou a produção de O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Aumento de proliferação, induzindo mudanças na morfologia e polaridade celular	A aplicação endógena de MC-CEM deve ser considerada uma abordagem neuroprotetora útil, podendo facilitar a recuperação do SNC após lesões traumáticas
	Redução de 200x nos níveis de O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> em células tratadas com 2% de MC		
	Melhores resultados encontrados usando 2% de MC	O MC 2% e 5% induziu maior viabilidade celular em comparação ao MC 0,5%	

Abreviações e siglas: GPX-1: glutathiona peroxidase 1; SOD2: superóxido dismutase 2; NGB; neuroglobulina; MC: meio condicionado;  $\Delta\psi_m$ : potencial de membrana mitocondrial; ERO: espécies reativas de oxigênio; CEM-TA: célula estromal mesenquimal; Ca<sup>2+</sup>: cálcio; AKT: proteína quinase B; p-AKT: proteína quinase B fosforilada; ERK1/2: quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2; p-ERK: quinase regulada por sinal extracelular fosforilada; Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; CEM-PD: célula estromal mesenquimal de polpa dentária; CEM-MO: célula estromal mesenquimal de medula óssea; IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta; IL-10: interleucina 10; O<sub>2</sub><sup>·-</sup>: ânion superóxido; MC-CEM: meio condicionado de células estromais mesenquimais. Fonte: elaborado pela autora (2022).

Alguns dos estudos incluídos neste trabalho mostraram que o tratamento com o MC-CEM aumentou os níveis de proteínas antioxidantes, como a glutathiona peroxidase, superóxido dismutase (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019) e catalase (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019), porém reduziu a atividade de Nrf2, sugerindo que a diminuição na produção de ERO ocorre por outro mecanismo (FERREIRA, 2020). Baez-Jurado *et al.* (2019) sugerem que a NGB pode ter um papel importante na regulação redox celular, pois seu bloqueio diminuiu o efeito protetor do MC-CEM, resultando em redução na expressão de SOD2, CAT e GPX1 e aumento significativo nas taxas de estresse oxidativo. Além disso, outros parâmetros, como o potencial de membrana e a massa mitocondrial também foram alterados na ausência dessa proteína (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a). Ainda, o tratamento com o secretoma de CEM diminuiu a expressão dos genes ND1 e ND2 que codificam para duas

subunidades do complexo I na cadeia transportadora de elétrons, envolvidos em estados de doença por contribuir para a produção de ERO (BAEZ-JURADO *et al.*, 2019). Em conjunto, esses resultados mostram que o MC-CEM é capaz de regular o estresse oxidativo em astrócitos *in vitro*. Dessa forma, o secretoma de CEM pode ser uma ferramenta útil para a regulação redox em diversas desordens neurológicas que apresentam produção excessiva de ERO.

Além de efeitos sobre a regulação redox celular, este trabalho também teve como objetivo investigar nos estudos analisados outras possíveis ações do secretoma de CEM sobre a biologia de astrócitos. Os resultados da análise qualitativa demonstraram que os tratamentos com o MC-CEM podem influenciar diferentes parâmetros correlacionados à preservação da homeostase celular (Quadro 3). Alguns dos trabalhos investigados mostraram que o secretoma de CEM é capaz de aumentar a viabilidade e proliferação celular (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014), assim como induzir mudanças na morfologia e polaridade dos astrócitos (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; TORRENTE *et al.*, 2014); além de recuperar alterações morfológicas causadas pelo método de insulto (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b). Apenas um trabalho não encontrou diferença significativa nas taxas de proliferação celular, sendo que o MC 50% não afetou a sobrevivência dos astrócitos, porém o MC 100% diminuiu o número de células (FERREIRA, 2020). O MC-CEM também pode promover migração celular e fechamento da ferida *in vitro* (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b), reduzir a fragmentação nuclear (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b), condensação da cromatina (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a) e inflamação pela regulação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10 (SONG *et al.*, 2015), IL-6, CSF2 e TNF- $\alpha$  (BAEZ-JURADO *et al.*, 2019). Em conjunto, os resultados apresentados pelos estudos analisados mostram que o MC-CEM exerce efeito citoprotetor para astrócitos *in vitro*.

## 6 DISCUSSÃO

O objetivo da primeira parte deste estudo foi identificar fatores tróficos presentes no secretoma de CEM envolvidos na regulação redox celular, assim como em processos de neuroproteção/neurorregeneração. Os trabalhos selecionados analisaram o secretoma de CEM de fontes teciduais distintas, contudo a fonte mais amplamente utilizada foi o tecido adiposo. Os resultados mostraram que fatores parácrinos presentes no MC-CEM, incluindo enzimas antioxidantes e fatores de crescimento, atuam na regulação redox no SNC, apresentando potencial protetor em desordens neurodegenerativas.

A segunda parte do trabalho se concentrou em avaliar de modo sistematizado a literatura com relação ao efeito protetor do MC-CEM em astrócitos. A busca de dados recuperou apenas seis trabalhos evidenciando a lacuna da literatura neste campo do conhecimento. Apesar do baixo número de estudos recuperados, a síntese de resultados mostrou que o secretoma de CEM, independentemente da sua fonte tecidual, é capaz de reduzir o estresse oxidativo, inflamação e reatividade astrocitária, além de aumentar a sobrevivência dos astrócitos em cultivo.

### 6.1 DIFERENTES FONTES TECIDUAIS DE CEM APRESENTAM EFEITO PROTETOR SIMILAR

Os resultados de ambas as partes deste trabalho demonstram uma variedade de tecidos fonte de CEM, sendo o tecido adiposo a fonte mais empregada (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; FIGLIOLINI *et al.*, 2020; KATSUDA *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018; NIADA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2012; SARALAMMA *et al.*, 2019; TORRENTE *et al.*, 2014), possivelmente devido à facilidade de obtenção e isolamento; assim como a abundância de CEM nesse tecido, o que facilita a produção do MC (MAZINI *et al.*, 2019).

Alguns dos estudos mostram que as CEM-TA são utilizadas para produção e utilização terapêutica do MC em modelos experimentais, assim como para a caracterização das moléculas bioativas presentes em seu secretoma. Nos trabalhos

analisados foram identificados no MC-CEM-TA fatores parácrinos importantes para modulação do SNC (PIRES *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2012). Além disso, o secretoma dessas células tem apresentado efeitos positivos em outros tecidos, protegendo fibroblastos dermais humanos do estresse oxidativo (KIM *et al.*, 2008) e auxiliando no processo regenerativo de músculo esquelético (MITCHELL *et al.*, 2019). Ainda, foi observado que o MC-CEM-TA regula os níveis de agentes oxidantes em células espermáticas e pancreáticas em condições patológicas (BADER *et al.*, 2019; ELSHEMY *et al.*, 2021). Diante dos benefícios relatados, CEM derivadas dessa fonte tecidual podem se tornar uma opção vantajosa para futuras investigações referentes a desordens neurodegenerativas.

Embora CEM-TA tenham sido utilizadas em muitos dos estudos avaliados, CEM de diferentes fontes teciduais também secretam fatores tróficos, dentre eles enzimas e fatores de crescimento, com ação antioxidante (FIGLIOLINI *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016) que podem estar envolvidos em processos de neuroproteção (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011). Além disso, alguns dos estudos analisados na primeira parte deste trabalho mostraram que CEM de diferentes origens teciduais apresentam diferenças significativas na composição de fatores bioativos (PIRES *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Em trabalho anterior de nosso grupo foi demonstrado que CEM obtidas do tecido adiposo e da derme cultivadas sob as mesmas condições apresentam variação entre si quanto ao seu conteúdo proteico (ZOMER, 2017). Além disso, alguns dos estudos elegidos para este trabalho revelam diferenças significativas entre os fatores bioativos secretados por CEM de diferentes fontes teciduais (PIRES *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2016). Pires *et al.* (2016) encontraram diferenças quantitativas na expressão de fatores bioativos secretados por CEM-MO, CEM-TA e CEM-CPCU. Da mesma forma, análises comparativas entre CEM-TA e CEM-GW mostraram importantes diferenças na composição proteica do secretoma dessas células, sendo que CEM-TA apresentaram maior número de fatores bioativos envolvidos em processos de neuroproteção (RIBEIRO *et al.*, 2012). Por outro lado, Nakashima *et al.* (2018) observaram diferenças na composição proteica do secretoma de CEM de mesma origem tecidual, porém cultivadas em meios de cultura diferentes. Neste contexto, uma análise comparativa entre os componentes do MC-CEM de fontes teciduais diferentes, assim como da influência das condições

de cultivo são fundamentais para compreender as diferenças do conteúdo bioquímico do secretoma dessas células.

Apesar da variedade de tecidos fonte de CEM encontrada nos trabalhos analisados, a segunda parte deste estudo demonstra que células de diferentes fontes teciduais apresentam efeito protetor similar sobre a produção de estresse oxidativo em astrócitos. Contudo, é importante ressaltar que as CEM compreendem uma população celular reconhecidamente heterogênea. Essa característica é refletida em distintos modos de ação, incluindo mecanismos de secreção de fatores solúveis e vesículas extracelulares (COSTA *et al.*, 2021). Além disso, algumas condições podem influenciar os padrões de secreção de moléculas sinalizadoras, modificando a composição do secretoma. A fonte tecidual de CEM, condições de cultura, condicionamento celular, e concentração do MC-CEM são exemplos de fatores que podem ter influência sobre sua eficácia terapêutica (MUHAMMAD, 2019).

Apesar da diversidade de trabalhos que demonstram a potencialidade das CEM e de seus derivados bioativos para o tratamento de doenças em modelos experimentais (CAPLAN *et al.*, 2021; EL-DERANY; NOURELDEIN, 2021; JHA *et al.*, 2022; MELO *et al.*, 2017; SANTAMARIA *et al.*, 2021), muitas falhas ainda são encontradas na pesquisa translacional e podem ser em parte atribuídas ao baixo nível de conhecimento em relação aos seus mecanismos de ação (STAVELY; NURGALI, 2020). Neste sentido, a escolha da fonte tecidual para utilização dessas células em terapias experimentais deve ser uma ação cautelosa, sendo que a decisão final pode ser baseada em estudos anteriores que demonstram seu potencial terapêutico para o tratamento da patologia investigada (COSTA *et al.*, 2021).

## 6.2 O PAPEL DOS FATORES BIOATIVOS DE CEM NA NEUROPROTEÇÃO

Os resultados desta revisão mostram que muitas pesquisas têm se dedicado a análises para caracterização do conteúdo total do MC-CEM (fração solúvel e fração vesicular) (KIM *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018; NIADA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016; RAJAN *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2012; SARALAMMA *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2016). Contudo, alguns dos trabalhos selecionados investigaram somente a porção vesicular do secretoma de CEM

(BODART-SANTOS *et al.*, 2019; FIGLIOLINI *et al.*, 2020; KATSUDA *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2012; RIAZIFAR *et al.*, 2019; XUN *et al.*, 2020). De modo geral, os estudos apresentam uma grande diversidade de moléculas bioativas secretadas por CEM (KIM *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018; NIADA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016; RAJAN *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2012; SARALAMMA *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2016) que são capazes de reduzir a apoptose, promovendo neuroproteção e regeneração neuronal. Ainda podem agir como imunomoduladores, diminuindo a expressão de fatores pró-inflamatórios, permitindo angiogênese e reduzindo a perda de mielina (CHANG *et al.*, 2019; HOU *et al.*, 2020; RAJAN *et al.*, 2017; STAVELY; NURGALI, 2020; VENERUSO *et al.*, 2019). Diante destes resultados, é evidente que a caracterização desses componentes e melhor compreensão do seu modo de ação são essenciais para entender os efeitos do tratamento com o MC-CEM em diversos modelos de doenças.

Alguns fatores tróficos secretados por CEM, incluindo NRP2, NEGF2 (YU *et al.*, 2016), NGF e NT3 (RAJAN *et al.*, 2017) são classicamente conhecidos como protagonistas em processos de proteção do SN. O fator neurotrófico NGF, por exemplo, é conhecido por regular a sobrevivência e crescimento de neurônios e de células gliais, oferecendo proteção contra o estresse oxidativo e promovendo neuroproteção (CABEZAS *et al.*, 2019) foi encontrado nos meios condicionados de CEM-TA, CEM-GE e CEM-CPCU (RAJAN *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2012). Existem outras biomoléculas, contudo, que exercem um papel indireto na neuroproteção através da regulação do estresse oxidativo: SOD (KIM *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2019; NAKASHIMA *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2016), PRDX (NAKASHIMA *et al.*, 2018; PIRES *et al.*, 2016) e GPX (NAKASHIMA *et al.*, 2018); manutenção da sobrevivência celular: IGF1 (MITCHELL *et al.*, 2019), SCF (PIRES *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2012) e HGF (RIBEIRO *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2016); ação antiinflamatória: ANXA1 (SARALAMMA *et al.*, 2019), DCN (PIRES *et al.*, 2016) e SCGR1 (NIADA *et al.*, 2018); atividade angiogênica: VEGFC (YU *et al.*, 2016) e CCN1 (PIRES *et al.*, 2016) e; ação antiapoptótica: CST3, IL-6, PPIA, PPIB e HSP27 (PIRES *et al.*, 2016).

Os estudos analisados na primeira parte do trabalho confirmam que as CEM secretam uma grande diversidade de enzimas antioxidantes, conhecidas por seu potencial de regulação da homeostase redox celular (SIES; JONES, 2020). Entre essas moléculas estão as peroxirredoxinas (PRDX 1-6) que podem ser

transportadas por VE-CEM (HA *et al.*, 2020) e atuar nas defesas antioxidantes catabolizando a conversão de  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular (DAVIS; PENNYPACKER, 2017); as superóxido dismutases (SOD 1-3) capazes de mediar resistência ao estresse oxidativo catalisando a reação de  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , menos reativo (DAVIS; PENNYPACKER, 2017); a GPX1 capaz de reduzir  $H_2O_2$  a água (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011) e; as GST que exibem respostas adaptativas ao estresse celular para proteger as células contra metabólitos reativos de oxigênio (DASARI; GANJAYI; MERIGA, 2018). Além disso, alguns fatores de crescimento, incluindo IGF (MITCHELL *et al.*, 2019), HGF (MITCHELL *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2016) e PEDF (PIRES *et al.*, 2016), que atuam na regulação redox (KIM; PARK; SUNG, 2009; JALLALI *et al.*, 2007), também estão presentes no MC-CEM.

Outras classes de proteínas foram encontradas no secretoma de CEM, incluindo PPIA, PPIB, TRX, ALB, CST3 e PARK7 e GSN (PIRES *et al.*, 2016) e HSP (MITCHELL *et al.*, 2019). As proteínas PPIA, PPIB e TXN por exemplo, apresentam ação antioxidante, suprimindo a formação de ERO (KIM *et al.*, 2015; OH *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2012). ALB e CST3 são capazes de reduzir a morte celular induzida por  $H_2O_2$  (GUM *et al.*, 2004; TIZON *et al.*, 2010). De forma semelhante, a GSN, assim como as HSP controlam os níveis de moléculas oxidantes no SNC (CHAUHAN; JI; CHAUHAN, 2008; VIDYASAGAR; WILSON; DJAMALI, 2012). Por fim, PARK7, uma proteína citoprotetora redox responsiva pode ser ativada quando ocorre um desequilíbrio de ERO, agindo como um regulador transcricional de genes antioxidantes importantes durante a neuroinflamação (KAHLE; WAAK; GASSER, 2009).

Os estudos citados acima identificaram biofatores na fração total do MC-CEM, porém a fração vesicular do secretoma contribui grandemente para sua ação terapêutica (HAUPT *et al.*, 2021; MITCHELL *et al.*, 2019; NGUYEN *et al.*, 2018; YIN *et al.*, 2020). Entretanto, os mecanismos moleculares mediados por VE-CEM que auxiliam na recuperação funcional neurológica ainda não são totalmente compreendidos (MUHAMMAD, 2019). Apesar disso, os resultados apresentados neste trabalho demonstram que essas partículas contêm uma grande diversidade de biomoléculas que podem ser transportadas para células receptoras modificando seus processos fisiológicos.

No estudo de Bodart-Santos *et al.* (2019), analisado nesta revisão, foi demonstrado que VE-CEM-GW possuem atividade antioxidante, gerando neuroproteção através da ação da catalase (presente nas VE-CEM). A inativação dessa enzima além de aumentar os níveis de ERO em culturas hipocampais, bloqueou as ações sinaptoprotetoras das VE-CEM. Neste mesmo estudo, os pesquisadores demonstraram que os astrócitos são as principais células responsáveis pela captura de VE-CEM no hipocampo (BODART-SANTOS *et al.*, 2019). Considerando a importância dessa população celular para a manutenção da homeostase (REVUELTA *et al.*, 2019; VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018), o potencial de captura de VE-CEM por essas células torna-se relevante em cenários de doença. O tratamento com VE-CEM pode eventualmente fortalecer as funções protetoras da astrogliia sobre as sinapses. Outro trabalho mostrou que o pré-tratamento de culturas de hipocampo com VE também derivadas de CEM-GW apresentou efeito protetor contra a produção de ERO em células submetidas à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, corroborando os resultados de Bodart-Santos *et al.* (2019) (PUIG-PIJUAN *et al.*, 2020).

Em relação aos ácidos nucleicos presentes em VE-CEM, o presente estudo mostra que existem diversos mRNAs que codificam proteínas envolvidas na neuroproteção (FIGLIOLINI *et al.*, 2020; RIAZIFAR *et al.*, 2019). Por outro lado, apenas um pequeno número de miRNAs foi identificado nas referências elegidas (MITCHELL *et al.*, 2019; RIAZIFAR *et al.*, 2019). Contudo, a presença dessas moléculas nas VE-CEM é reconhecida na literatura, assim como seu efeito terapêutico (AI *et al.*, 2021; CAI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021). Sendo assim, futuramente a caracterização de um número maior dessas moléculas que podem ter grande relevância na proteção do SNC é indispensável.

Investigações realizadas por Mitchell *et al.* (2019) e analisadas nesta revisão demonstraram que mais de 21% dos mRNAs derivados do MC-CEM-TA estão envolvidos com resposta ao estresse celular. Além disso, esses pesquisadores identificaram alguns miRNAs, incluindo o miRNA-let7c, miRNA-16, miRNA-24 e miRNA-145. Essas moléculas são capazes de regular a inflamação através da redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (FORDHAM; NAQVI; NARES, 2015; ALAM; O'NEILL, 2011; BANERJEE *et al.*, 2014; SELBACH *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2017). Dessa forma, a investigação dos mecanismos de ação de miRNAs

importantes para a neuroproteção/neurorregeneração são relevantes para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas.

Alguns estudos têm utilizado metodologias de superexpressão de miRNAs com o objetivo de desenvolver tratamentos para uma variedade de desordens fisiológicas (DENG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2019). Ai *et al.* (2021) demonstraram que VE-CEM superexpressando o miRNA-221-3p foram capazes de proteger o tecido cerebral contra AVC isquêmico *in vivo* através da inibição do fator de transcrição de ativação 3 (ATF3), atenuando mudanças patológicas, processos inflamatórios e, apoptose. Em culturas neuronais o tratamento aumentou a viabilidade celular e diminuiu a morte celular de neurônios submetidos à depleção de glicose e oxigênio.

O estudo realizado por Zhang *et al.* (2021) mostrou que VE-CEM superexpressando o miRNA-181c reduziram o processo inflamatório em células da microglia ativadas por LPS, diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, os resultados mostraram que a fosfatase homóloga à tensina (PTEN) é um dos alvos de miRNA-181c. PTEN tem demonstrado ter um papel importante na inflamação (ZHOU *et al.*, 2019) e sua ação reverteu os efeitos positivos do tratamento com VE-CEM superexpressando o miRNA-181c. A sinalização por NF- $\kappa$ B também foi suprimida após a utilização das VE, assim como a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na microglia. Nos experimentos *in vivo* em modelo de lesão medular espinhal o tratamento foi capaz de reduzir a inflamação, a apoptose e melhorar parcialmente as mudanças patológicas causadas pela lesão (ZHANG *et al.*, 2021). Esses dados revelam o importante papel dos miRNAs nos processos de reparação tecidual. Além disso, esta parte do estudo demonstra a variedade de fatores parácrinos presentes no secretoma de CEM que podem futuramente serem considerados agentes terapêuticos para diferentes patologias neurológicas.

Além das diferenças encontradas na composição dos meios condicionados derivados de CEM de fontes teciduais distintas (discutido na seção 6.1), evidências demonstram que a fração solúvel e a fração vesicular do secretoma dessas células podem apresentar diferenças entre seus componentes proteicos, inclusive em células de mesma origem tecidual. Ainda, a administração das diferentes frações do secretoma pode gerar efeitos terapêuticos variados, porém muitas vezes complementares nos processos de regeneração tecidual (ASSUNÇÃO-SILVA *et al.*,

2018; CHANG *et al.*, 2018; MITCHELL *et al.*, 2019; PIRES *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Mitchell *et al.* (2019) demonstraram que proteínas (38.5%) encontradas no componente vesicular do secretoma de CEM-TA não estão presentes em sua porção solúvel. Da mesma forma, diversas proteínas identificadas no componente solúvel (12.3%) estão ausentes em VE-CEM. Outro estudo demonstrou que apenas uma pequena porcentagem de proteínas detectadas em microvesículas de CEM-MO se sobrepõe ao conteúdo de proteínas solúveis dessas células (KIM *et al.*, 2012). Ainda, Xun *et al.* (2020) observaram 265 proteínas exclusivas de exossomos e 239 encontradas somente na fração livre dessas partículas no secretoma de CEM-MON, sendo que apenas 39 proteínas foram encontradas em ambas as frações.

As diferenças entre os componentes solúveis e os encapsulados por VE são refletidas em distintos efeitos terapêuticos. A porção solúvel do MC-CEM-TA derivadas de camundongos regulou o processo pró-inflamatório em macrófagos estimulados com LPS, porém esse efeito não é mediado por VE (CARCELLER *et al.* 2021). Gorgun *et al.* (2021) mostraram que a capacidade angiogênica do componente solúvel do secretoma de CEM foi inibida na presença de estímulos inflamatórios, enquanto as VE foram menos sensíveis a essas variações. Esses estudos apontam as diferenças de conteúdo proteico encontradas na fração solúvel e vesicular do secretoma e, destacam a relevância de avaliações comparativas.

Apesar de não corresponder a uma revisão exaustiva da literatura, os resultados apresentados na primeira parte deste trabalho demonstram que o secretoma de CEM é composto por um grande número de moléculas bioativas comprovadamente envolvidas na regulação redox celular e proteção do SNC. Contudo, são necessárias análises mais aprofundadas que tenham como objetivo realizar perguntas mais direcionadas. Além disso, é fundamental a incorporação de uma diversidade maior de tecidos fonte de CEM, assim uma análise comparativa do fenótipo secretório dessas células pode ser realizada. Ainda, são necessárias avaliações sobre o mecanismo de ação dos componentes do MC-CEM sobre o SNC. Este estudo não avaliou comparativamente a composição bioquímica dos secretomas de CEM derivados de fontes teciduais distintas, principalmente devido à dificuldade para obtenção da lista completa de moléculas bioativas secretadas por CEM nas referências analisadas. Além disso, são necessárias avaliações comparativas entre a fração solúvel e a fração vesicular do secretoma de CEM, com

o objetivo de entender melhor as diferenças entre essas porções. Estas investigações são fundamentais para que futuramente o conjunto de fatores tróficos liberados por CEM seja considerado uma alternativa terapêutica para desordens neurodegenerativas.

### 6.3 O MC-CEM PROTEGE ASTRÓCITOS ATRAVÉS DA REGULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

A segunda parte deste trabalho teve como objetivo analisar estudos que investigaram o papel do MC-CEM na produção de agentes oxidantes em astrócitos. Neste sentido, o presente estudo demonstrou que há uma escassez de trabalhos científicos nesta área do conhecimento, evidenciada pelo baixo número de referências elegidas para a síntese de resultados. Foram encontrados, até o momento em que a busca de dados foi realizada, apenas seis trabalhos que tiveram como objetivo avaliar os efeitos terapêuticos do MC-CEM sobre o estresse oxidativo em astrócitos (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014). Além disso, a análise realizada neste trabalho demonstrou que as perguntas de pesquisa destes estudos não são diretamente correlacionadas ao estresse oxidativo (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014), com exceção do estudo de Ferreira (2020). Contudo, abordam esse parâmetro indiretamente, pois avaliam a função mitocondrial e os níveis de cálcio intracelular, profundamente envolvidos no equilíbrio redox (FRATI *et al.*, 2017; NG; LEE, 2019). Apesar de as perguntas de pesquisa não serem diretamente direcionadas ao tema “estresse oxidativo”, todos os estudos avaliados indicaram que o secretoma de CEM apresenta efeitos terapêuticos em culturas astrocíticas, sendo capaz de regular os níveis de ERO nessas células.

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que buscou examinar dados da literatura sobre os efeitos do MC-CEM em astrócitos no contexto do estresse oxidativo. A escassez de estudos nesta área do conhecimento pode estar eventualmente relacionada com a preferência de utilização do MC-CEM em modelos *in vivo*, o que permite analisar diferentes populações celulares, realizar experimentos não exequíveis *in vitro* e, avaliar características apresentadas pelo órgão completo

(JHA, K. A. *et al.*, 2018; JHA *et al.*, 2019; NAKANO *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2020). Já os estudos *in vitro* apresentam algumas limitações, alguns trabalhos analisam apenas populações neuronais (EBRAHIMI *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2012), considerando que estas células são mais suscetíveis a insultos (BARRETO *et al.*, 2012). Culturas microgлияis também são comumente realizadas a fim de investigar processos inflamatórios positivamente regulados em estado de doença (JHA, M. K. *et al.*, 2018). Outro fator que possivelmente limitou o número de estudos recuperados nas bases de dados foi a incorporação da palavra-chave “estresse oxidativo” nas estratégias de busca, pois muitas investigações sobre o potencial de CEM ou do seu secretoma em astrócitos não analisam esta variável (LIU *et al.*, 2021; VIGO *et al.*, 2021). Diante da lacuna na literatura demonstrada por este trabalho, é importante encorajar o desenvolvimento de novos estudos que permitam compreender os mecanismos parácrinos das CEM sobre a produção de ERO em astrócitos.

Apesar da realização de uma investigação mais aprofundada de cada referência incluída na revisão, este trabalho se restringiu a avaliação de apenas um tipo celular do SN. Dessa forma, é fundamental realizar análises de estudos que investigaram tipos celulares distintos, assim como avaliações de modelos *in vivo*. As desordens neurodegenerativas são patologias complexas, que envolvem a alteração de diversos mecanismos fisiológicos (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018; ISLAM, 2017; MERELLI *et al.*, 2021). Desse modo, além da investigação sobre os efeitos do MC-CEM na produção de estresse oxidativo, avaliações de parâmetros como neuroinflamação, excitotoxicidade e níveis de apoptose, são essenciais. Essas análises permitirão descobrir o potencial do secretoma de CEM sobre a patofisiologia geral de desordens neurológicas.

Em relação às metodologias dos estudos elegidos, a avaliação realizada neste trabalho mostra que foram efetuados diferentes métodos de insulto, da mesma forma, a concentração do MC-CEM e o tempo de tratamento variaram entre os trabalhos analisados (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014). A variação metodológica impossibilitou a realização de análises quantitativas, porém os estudos foram avaliados qualitativamente. Neste contexto, a avaliação comparativa mostra que uma concentração muito baixa de MC-CEM (0,5%) induziu menor viabilidade celular em comparação com o MC-CEM 2% e 5%

(TORRENTE *et al.*, 2014). De forma interessante, uma concentração muito alta (100%) utilizada por Ferreira (2020) reduziu a sobrevivência dos astrócitos, enquanto o MC-CEM 50% não modificou esse parâmetro nas culturas analisadas. Em contraste, Song *et al.* (2015) não observaram o mesmo resultado em astrócitos tratados nas mesmas condições (MC 100%) em análises de viabilidade celular, neste caso, o MC-CEM conferiu citoproteção para essas células.

A concentração do MC-CEM é um fator indispensável para o desenvolvimento de terapias livres de células, pois está diretamente relacionada com a quantidade de moléculas bioativas entregues na fase de tratamento (WHITTAKER *et al.*, 2020). É importante ressaltar, no entanto, as diferenças metodológicas dos estudos para entender as divergências entre os resultados. Ferreira (2020) tratou astrócitos com o MC-CEM-DP em condição padrão de cultivo, enquanto Song *et al.* (2015) utilizaram o MC-CEM-MO e MC-CEM derivadas de polpa dentária (MC-CEM-PD) em culturas submetidas a depleção de glicose e oxigênio. Além disso, neste último estudo os tratamentos foram realizados em períodos distintos, anterior e posteriormente ao insulto. Dessa forma, as diferenças encontradas nos parâmetros de viabilidade podem estar possivelmente relacionadas a variações metodológicas.

As divergências evidenciadas nos resultados de Ferreira (2020) e Song *et al.* (2015) podem ainda ser explicadas pelas diferentes fontes teciduais de CEM empregadas para a produção do MC-CEM. O primeiro estudo utilizou apenas derme de prepúcio como tecido fonte. Enquanto o segundo realizou uma análise comparativa, demonstrando que o grau de citoproteção do MC-CEM-PD é maior quando comparado ao MC-CEM-MO, porém não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de estresse oxidativo em astrócitos tratados com os meios condicionados. Esses resultados sugerem que há diferenças na composição dos secretomas utilizados neste trabalho. Porém, são necessários estudos mais aprofundados para investigar detalhadamente quais fatores bioativos são diferencialmente expressos e secretados por essas células.

A redução de estresse oxidativo em culturas astrocitárias é um resultado interessante nos trabalhos analisados nesta revisão (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019; FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015; TORRENTE *et al.*, 2014). Considerando que altas concentrações de agentes oxidantes provocam dano e morte celular, porém, concentrações muito

baixas também apresentam desvantagens, causando neurodegeneração (SIES; JONES, 2020); a preservação dos níveis basais de ERO nos tecidos para conservação da homeostase é fundamental. Neste sentido, a ausência de insulto nos astrócitos (FERREIRA, 2020) deve ser considerada um fator pertinente, tendo em vista que os níveis de estresse oxidativo são mais baixos em comparação às culturas que sofreram insulto (SONG *et al.*, 2015). Dessa forma, a mesma concentração de MC-CEM (100%) (FERREIRA, 2020; SONG *et al.*, 2015) pode ter apresentado resultados diferentes nos ensaios de viabilidade devido a variações no estado redox celular no momento do tratamento.

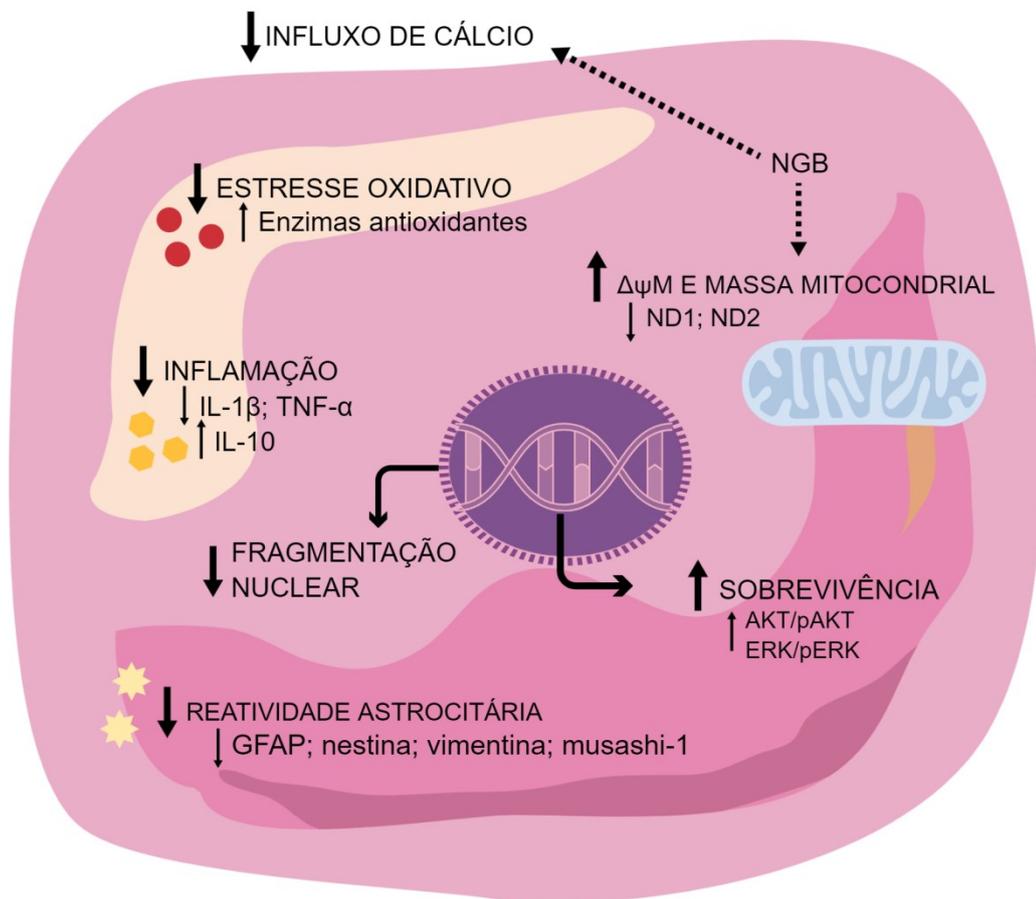
Apesar de astrócitos cultivados serem considerados reativos até certo ponto (LIU; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2017), no estudo de Ferreira (2020) o MC-CEM possivelmente regulou positivamente o sistema antioxidante celular, resultando em uma diminuição exacerbada de ERO e, por fim, gerando desequilíbrio redox. Considerando que as ERO são moléculas essenciais para diversos processos fisiológicos (SIES; JONES, 2020), a queda drástica de estresse oxidativo, neste caso, pode estar relacionada à redução da viabilidade das culturas astrocíticas. Por outro lado, no estudo de Song *et al.* (2015) o MC-CEM pode ter restaurado os níveis fisiológicos basais de agentes oxidantes, anteriormente perturbados pelo método de insulto que resultou em aumento de ERO. Nesta circunstância, a diminuição de estresse oxidativo pode ter promovido citoproteção.

Resultados encontrados por Palomares *et al.* (2018) corroboram essa hipótese. Após induzir neurotoxicidade em células humanas SH-SY5Y semelhantes a neurônios através de exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e realizar tratamento com MC-CEM-TA, foi observado que o secretoma apresentou efeito neuroprotetor, sendo que as células estressadas recuperaram características eletrofisiológicas, axonais e viabilidade celular normais. Porém, o agente antioxidante N-acetilcisteína adicionado ao MC-CEM-TA eliminou seu efeito positivo. Esse resultado pode estar relacionado a uma grande redução de ERO, em contraste o tratamento somente com o MC-CEM-TA resulta em uma diminuição moderada de agentes oxidantes, mantendo o equilíbrio redox celular.

Os resultados do presente estudo apontam que o MC-CEM exerce proteção para astrócitos *in vitro*. Diversos efeitos biológicos foram associados ao uso do secretoma de CEM nos trabalhos analisados, incluindo redução da reatividade astrocítica, aumento na expressão de NGB, regulação de citocinas, melhoria de

parâmetros mitocondriais, aumento da expressão de vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e proliferação celular e, redução da fragmentação nuclear e condensação da cromatina. Ainda, o MC-CEM protegeu os astrócitos dos insultos causados pelo estresse oxidativo, reduzindo danos ao DNA, nitração de proteínas e peroxidação lipídica (Figura 8) (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a). Em alguns estudos foi observada alta redução nas concentrações de ERO em astrócitos tratados com o MC-CEM (FERREIRA, 2020; TORRENTE *et al.*, 2014).

Figura 8 - Mecanismos de ação do MC-CEM propostos pelos estudos analisados na proteção de astrócitos em cultivo



O tratamento com o secretoma de CEM reduz a reatividade astrocitária, observada pela diminuição da expressão de proteínas marcadoras de astrogliose reativa. Promove redução de processos pró-inflamatórios, demonstrada pela regulação de diferentes citocinas; redução da expressão dos genes ND1 e ND2 que contribuem para o aumento de estresse oxidativo e aumento do  $\Delta\psi_m$  e massa mitocondrial. Promove ainda redução da fragmentação nuclear, diminuição do influxo de cálcio, aumento da expressão de enzimas antioxidantes, resultando na regulação do estresse oxidativo nos astrócitos, aumento nas taxas de sobrevivência e aumento nos níveis de NGB que auxilia na dinâmica do cálcio, ajuda a preservar o  $\Delta\psi_m$  e regula a produção de ERO. IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta;

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; IL-10: interleucina 10; NGB: neuroglobulina;  $\Delta\psi_m$ : potencial de membrana mitocondrial; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; AKT: proteína quinase B; p-AKT: proteína quinase B fosforilada; ERK1/2: quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2; p-ERK: quinase regulada por sinal extracelular fosforilada. Fonte: elaborado pela autora em <https://mindthegraph.com/> (2022).

Evidências na literatura mostram a redução de ERO no SNC através do uso do secretoma de CEM (NAKANO *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2020). Puig-Pijuan *et al.* (2020) demonstraram que VE-CEM foram capazes de reduzir o estresse oxidativo em culturas hipocampais submetidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Outro estudo demonstrou que a administração do MC-CEM reduziu o estresse oxidativo em neurônios de camundongos com cognição prejudicada por indução de diabetes (NAKANO *et al.*, 2016). O secretoma de CEM pré-tratadas com berberina (alcaloide quaternário isolado de diferentes plantas medicinais) (ORTIZ *et al.*, 2014), atenuou dano oxidativo em culturas neuronais, aumentando a secreção de NGF e BDNF e ativando as proteínas heme oxigenase 1 (HO-1), proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (Keap1) e Nrf2 (WEN *et al.*, 2020).

O aumento nos níveis de proteínas antioxidantes após tratamento com o MC-CEM em alguns dos trabalhos analisados (BAEZ-JURADO *et al.*, 2018a; BAEZ-JURADO *et al.*, 2018b; BAEZ-JURADO *et al.*, 2019) sugere que a ação terapêutica do secretoma está diretamente relacionada à elevação nas taxas dessas enzimas. Os resultados da primeira parte deste trabalho apontam a presença de uma grande variedade de enzimas antioxidantes no MC-CEM, corroborando os desfechos da análise secundária. Neste sentido, o aumento nos níveis de enzimas antioxidantes pode ser associado a proteínas presentes no MC-CEM transportadas para as células alvo de tratamento e/ou, devido a ativação de fatores de transcrição, resultando em produção de enzimas antioxidantes pela própria célula alvo. Contudo, não foi possível confirmar essas hipóteses devido à carência de análises de expressão de mRNA correspondentes às proteínas identificadas nos estudos avaliados.

Nos estudos analisados nesta revisão, apenas o trabalho de Ferreira (2020) avaliou a expressão de Nrf2 após tratamento de astrócitos com o MC-CEM. Os resultados mostraram uma redução na atividade de Nrf2, sugerindo que o secretoma não promove regulação da produção de ERO por este mecanismo (FERREIRA,

2020). Contudo, evidências na literatura demonstram uma melhora em fenótipos neurológicos em diferentes modelos de doença após aumento na atividade de Nrf2. Essa molécula é um importante fator de transcrição que regula a expressão de diversas proteínas antioxidantes, assim como proteínas citoprotetoras. Nrf2 promove defesa celular através da modulação da função mitocondrial, promoção de autofagia e regulação da neuroinflamação (DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV; KAZANTSEV, 2018). Ainda, influencia fortemente na diferenciação e função de células tronco neurais através da redução de estresse oxidativo. O aumento da expressão de Nrf2 promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células-tronco neurais, favorecendo, dessa forma, processos de neuroregeneração (KAHROBA *et al.*, 2021). Além disso, foi demonstrado que a superexpressão de Nrf2 é capaz de retardar o início da neurodegeneração e aumentar a sobrevivência em camundongos que expressam  $\alpha$ -sinucleína humana mutante (GAN *et al.*, 2012). Sendo assim, novos estudos são necessários para elucidar vias de sinalização ativadas pelo MC-CEM que resultam em seu efeito antioxidante em astrócitos.

#### 6.4 LIMITAÇÕES, QUESTIONAMENTOS E PERSPECTIVAS

Os resultados dos estudos analisados, sintetizados neste trabalho sugerem que estratégias terapêuticas baseadas somente no uso do MC-CEM (livre de células) podem ser consideradas uma ferramenta vantajosa para o tratamento de neuropatologias. Os trabalhos mostram que a exposição ao secretoma de CEM aumenta a capacidade antioxidante e inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias, que são características comuns de patologias neurodegenerativas (D'ANGELO; CIMINI; CASTELLI, 2020). O MC-CEM é capaz de modular a biologia de astrócitos *in vitro*, diminuindo os níveis de ERO e conferindo citoproteção para as culturas. Diante desses resultados, podemos inferir que o MC-CEM apresenta efeitos promissores para preservação da homeostase de astrócitos. Desse modo, os benefícios relacionados ao uso do secretoma de CEM nesses estudos justificam a realização de novos trabalhos para melhor compreensão sobre sua composição bioquímica e efeito biológico.

Apesar dos resultados positivos em relação ao uso terapêutico do MC-CEM em desordens neurodegenerativas, esta revisão demonstra que ainda existem muitos desafios que precisam ser superados. A avaliação comparativa da

composição do MC-CEM de diferentes fontes teciduais é fundamental para determinar sua diferença bioquímica. É importante investigar as fontes de CEM mais adequadas para o tratamento de distúrbios no SNC, tendo em vista a heterogeneidade de células derivadas de diferentes tecidos. Análises que buscam identificar a necessidade de condicionamento das CEM para melhoria da capacidade terapêutica do secretoma também são estratégias importantes. Além disso, células geneticamente modificadas que superexpressam fatores bioativos específicos podem ser muito relevantes para a produção homogênea de moléculas secretadas, independentemente da fonte celular e condições de cultura.

Outros fatores interessantes que devem ser considerados são: análise da extensão da contribuição fornecida pelo secretoma nos efeitos terapêuticos observados, assim como o estabelecimento de critérios que definem sua capacidade terapêutica. Além disso, os efeitos do secretoma no tecido/órgão alvo e nas vias celulares e moleculares relacionadas precisam ser elucidados. Em síntese, aspectos como biodistribuição, tempo de bioatividade e segurança a longo prazo devem ser analisados; assim como o desenvolvimento de uma fonte escalonável de secretoma para obter sucesso em aplicações clínicas. A combinação de um perfil seguro com os resultados positivos apresentados por inúmeros estudos, torna o MC-CEM uma estratégia terapêutica potencial para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos, assim como para outras patologias que possuem opções limitadas de tratamento.

Por fim, algumas perguntas relevantes permanecem abertas e merecem atenção futura: existe uma fonte tecidual de CEM especialmente relevante para produção do MC direcionado a terapias para distúrbios neurodegenerativos? O MC-CEM pode apresentar efeitos não benéficos para o SNC em estado de doença? Como as moléculas bioativas agem na neuroproteção/neurorregeneração? Como utilizar o secretoma de CEM para fins terapêuticos e de maneira eficaz?

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que são utilizados diversos tecidos fonte de CEM para produção, caracterização e uso experimental do seu MC, porém o tecido adiposo é mais amplamente utilizado. As CEM de todas as fontes analisadas demonstram capacidade de produzir e secretar uma grande diversidade de fatores tróficos que atuam na regulação do estresse oxidativo e na neuroproteção/neurorregeneração. Sendo assim, este trabalho revelou que o MC-CEM pode ser uma opção relevante para o tratamento de desordens neurodegenerativas. Contudo, células de origem tecidual distintas apresentam diferenças na concentração e na diversidade de biofatores secretados. Da mesma forma, CEM derivadas do mesmo tecido apresentam diferenças entre os componentes da fração solúvel e fração vesicular do MC-CEM. Esses resultados podem indicar que os componentes secretados por CEM atuam na proteção do SNC por vias moleculares distintas.

A partir do número de estudos selecionados na segunda parte do trabalho, podemos concluir que existe uma lacuna na área do conhecimento que investiga o efeito terapêutico do MC-CEM sobre a produção de estresse oxidativo em astrócitos. De forma importante, este trabalho evidenciou que apesar da escassez de estudos, o MC-CEM protege astrócitos através de mecanismos de ação que incluem regulação do estado redox celular; diminuição da inflamação, fragmentação nuclear, reatividade astrocitária e; ainda, aumento da expressão de NGB que resulta na redução do influxo de cálcio e aumento do potencial de membrana e massa mitocondrial. Sendo assim, o tratamento com o MC-CEM pode ser uma estratégia terapêutica promissora para regulação redox no SNC.

As vantagens associadas ao uso do secretoma de CEM e os resultados aqui descritos demonstram a necessidade da realização de novos trabalhos a fim de compreender os mecanismos envolvidos na proteção de astrócitos tratados com o MC-CEM, assim como para desenvolver técnicas de padronização para futura utilização em ensaios clínicos.

## REFERÊNCIAS

Al, Zhibing *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles carrying microRNA-221-3p protect against ischemic stroke via ATF3. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 172, n. 7, p. 220–228, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.04.022>.

ALAM, Muhammad Mustafa; O'NEILL, Luke A. MicroRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 2482–2485, 2011.

ANDRZEJEWSKA, Anna; LUKOMSKA, Barbara; JANOWSKI, Miroslaw. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. **Stem Cells**, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 855–864, 2019.

ANGELOVA, Plamena R.; ABRAMOV, Andrey Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 592, n. 5, p. 692–702, 2018.

ANKRUM, James A.; ONG, Joon Faii; KARP, Jeffrey M. Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 252–260, 2014.

ASSUNÇÃO-SILVA, Rita Catarina *et al.* Exploiting the impact of the secretome of MSCs isolated from different tissue sources on neuronal differentiation and axonal growth. **Biochimie**, [s. l.], v. 155, p. 83–91, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.026>.

BADER, Robert *et al.* Improvement of human sperm vacuolization and DNA fragmentation co-cultured with adipose-derived mesenchymal stem cell secretome: In vitro effect. **International Journal of Stem Cells**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 388–399, 2019.

BAEZ-JURADO, Eliana *et al.* Blockade of Neuroglobin Reduces Protection of Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stem Cells in Human Astrocyte Model (T98G) Under a Scratch Assay. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 2285–2300, 2018a.

BAEZ-JURADO, Eliana *et al.* Conditioned Medium of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Increases Wound Closure and Protects Human Astrocytes Following Scratch Assay In Vitro. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 5377–5392, 2018b.

BAEZ-JURADO, Eliana *et al.* Mitochondrial Neuroglobin Is Necessary for Protection Induced by Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Astrocytic Cells Subjected to Scratch and Metabolic Injury. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 7, p. 5167–5187, 2019.

- BANERJEE, Sami *et al.* MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization. **Journal of Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- BARRETO, George E. *et al.* Neuroprotective agents in brain injury: A partial failure?. **International Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 122, n. 5, p. 223–226, 2012.
- BELARBI, Karim *et al.* NADPH oxidases in Parkinson's disease: A systematic review. **Molecular Neurodegeneration**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–18, 2017.
- BHATIA, Tarun N. *et al.* Astrocytes do not forfeit their neuroprotective roles after surviving intense oxidative stress. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. April, p. 1–12, 2019.
- BODART-SANTOS, Victor *et al.* Extracellular vesicles derived from human Wharton's jelly mesenchymal stem cells protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- $\beta$  oligomers. **Stem Cell Research and Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019.
- BOGATCHEVA, N.; COLEMAN, M. E. Conditioned Medium of Mesenchymal Stromal Cells: A New Class of Therapeutics. **Biochemistry (Moscow)**, [s. l.], v. 84, n. 11, p. 1375–1389, 2019.
- BREKKE, Eva *et al.* Glucose and Intermediary Metabolism and Astrocyte–Neuron Interactions Following Neonatal Hypoxia–Ischemia in Rat. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 115–132, 2017.
- BROOK, Naomi *et al.* Pigment epithelium-derived factor regulation of neuronal and stem cell fate. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 389, n. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111891>.
- BURDA, Joshua E.; BERNSTEIN, Alexander M.; SOFRONIEW, Michael. Astrocyte roles in traumatic brain injury. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 275, p. 305–315, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020>.
- CABEZAS, Ricardo *et al.* Correction to: Growth Factors and Neuroglobin in Astrocyte Protection Against Neurodegeneration and Oxidative Stress. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 2352–2365, 2019.
- CAGLAYAN, Berrak *et al.* Allyl isothiocyanate attenuates oxidative stress and inflammation by modulating Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B pathways in traumatic brain injury in mice. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 46, p. 241–250, 2019.
- CAI, Jiabin *et al.* Extracellular vesicles derived from different sources of mesenchymal stem cells: Therapeutic effects and translational potential. **Cell and Bioscience**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00427-x>.
- CAPLAN, Henry W. *et al.* Combination therapy with Treg and mesenchymal stromal cells enhances potency and attenuation of inflammation after traumatic brain injury compared to monotherapy. **Stem Cells**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 358–370, 2021.

CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 641–650, 1991.

CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells: Time to change the name!. **Stem Cells Translational Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1445–1451, 2017.

CAPLAN, Arnold I. What's in a Name? **Tissue Engineering - Part A**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 2415–2417, 2010.

CARCELLER, María Carmen *et al.* Extracellular vesicles do not mediate the anti-inflammatory actions of mouse-derived adipose tissue mesenchymal stem cells secretome. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 1–14, 2021.

CHANG, Chia lo *et al.* Adipose-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes markedly protected the brain against sepsis syndrome induced injury in rat. **American Journal of Translational Research**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 3955–3971, 2019.

CHANG, Yu Hsun *et al.* Exosomes and Stem Cells in Degenerative Disease Diagnosis and Therapy. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 349–363, 2018.

CHAPLOT, Kriti; JARVELA, Timothy S.; LINDBERG, Iris. Secreted Chaperones in Neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. August, p. 1–23, 2020.

CHAUHAN, Ved; JI, Lina; CHAUHAN, Abha. Anti-amyloidogenic, anti-oxidant and anti-apoptotic role of gelsolin in Alzheimer's disease. **Biogerontology**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 381–389, 2008.

CHENG, Xiaoyun *et al.* Morphological and functional alterations of astrocytes responding to traumatic brain injury. **Journal of integrative neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 203–215, 2019.

COFANO, Fabio *et al.* Mesenchymal stem cells for spinal cord injury: Current options limitations, and future of cell therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 1–26, 2019.

COSTA, Luis A. *et al.* Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 447–467, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03600-0>.

D'ANGELO, Michele; CIMINI, Annamaria; CASTELLI, Vanessa. Insights into the effects of mesenchymal stem cell-derived secretome in Parkinson's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 15, p. 1–14, 2020.

DASARI, Sreenivasulu; GANJAYI, Muni Swamy; MERIGA, Balaji. Glutathione S-transferase is a good biomarker in acrylamide induced neurotoxicity and genotoxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 115–121, 2018.

DAVIS, Stephanie M.; PENNYPACKER, Keith R. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 107, n. December, p. 23–32, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2016.12.007>.

DE MUNTER, J. P.J.M. *et al.* Why do anti-inflammatory signals of bone marrow-derived stromal cells improve neurodegenerative conditions where anti-inflammatory drugs fail?. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 127, n. 5, p. 715–727, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02173-3>.

DELBEN, Priscilla Barros *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stromal cells from face and abdomen undergo replicative senescence and loss of genetic integrity after long-term culture. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 406, n. 1, p. 1–13, 2021.

DENG, Yiming *et al.* Exosomes derived from microRNA-138-5p-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells confer neuroprotection to astrocytes following ischemic stroke via inhibition of LCN2. **Journal of Biological Engineering**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–18, 2019.

DHAMMI, Ish; KUMAR, Sudhir. Medical subject headings (MeSH) terms. **Indian Journal of Orthopaedics**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 443–444, 2014.

DINKOVA-KOSTOVA, Albena T.; KOSTOV, Rumen v.; KAZANTSEV, Aleksey G. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 285, n. 19, p. 3576–3590, 2018.

DOKALIS, Nikolaos; PRINZ, Marco. Astrocytic NF- $\kappa$ B brings the best and worst out of microglia. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 37, n. 16, p. 1–4, 2018.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>.

DUBEY, Navneet Kumar *et al.* Revisiting the advances in isolation, characterization and secretome of adipose-derived stromal/stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 1–23, 2018.

EBRAHIMI, Mohammad Javad *et al.* Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells Reverse Oxidative Stress-Induced Cell Death and Ameliorate Motor Function and Striatal Atrophy in Rat Model of Huntington Disease. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 273–284, 2018.

EL-DERANY, Marwa O.; NOURELDEIN, Mohamed H. Bone marrow mesenchymal stem cells and their derived exosomes resolve doxorubicin-induced chemobrain: critical role of their miRNA cargo. **Stem Cell Research and Therapy**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–23, 2021.

ELSHEMY, Mohamed M. *et al.* Antioxidative Capacity of Liver- and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Media and Their Applicability in Treatment of Type 2 Diabetic Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2021, n. February, p. 1–11, 2021.

ESMAEILI, Maryam *et al.* Decorin treatment of spinal cord injury. **Neural Regeneration Research**, [s. l.], v. 9, n. 18, p. 1653–1656, 2014.

FAIDEAU, Mathilde *et al.* In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: A correlation with Huntington's disease subjects. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 19, n. 15, p. 3053–3067, 2010.

FAN, Guo Chang. Role of heat shock proteins in stem cell behaviour. *In: Progress in molecular biology and translational science*. 1. ed. [s. l.]: Elsevier Inc., 2012. p. 305–322.

FEHILY, Brooke; FITZGERALD, Melinda. Repeated mild traumatic brain injury: Potential mechanisms of damage. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1131–1155, 2017.

FERREIRA, Laís Andrade. **O meio condicionado de células estromais mesenquimais da derme de prepúcio humano como modulador da biologia de células do sistema nervoso in vitro**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

FIGLIOLINI, Federico *et al.* Extracellular vesicles from adipose stem cells prevent muscle damage and inflammation in a mouse model of hind limb ischemia: Role of neuregulin-1. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 239–254, 2020.

FISHER, Aron B. The phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 1132–1147, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R082578>.

FORDHAM, Jezrom B.; NAQVI, Afsar R.; NARES, Salvador. miR-24 Regulates Macrophage Polarization and Plasticity. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, [s. l.], v. 06, n. 05, p. 1–9, 2015.

FORRÓ, Timea *et al.* Dysfunction of the neurovascular unit in ischemic stroke: Highlights on micrnas and exosomes as potential biomarkers and therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 11, p. 1–18, 2021.

FRATI, Alessandro *et al.* Diffuse axonal injury and oxidative stress: A comprehensive review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 1–20, 2017.

FUI, Lai Woon *et al.* Understanding the multifaceted mechanisms of diabetic wound healing and therapeutic application of stem cells conditioned medium in the healing process. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 2218–2233, 2019.

GAN, Li *et al.* Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 delays motor pathology and synuclein aggregation throughout the CNS in the alpha-synuclein mutant (A53T) mouse model. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 32, n. 49, p. 17775–17787, 2012.

GAO, X. *et al.* A role of N-cadherin in neuronal differentiation of embryonic carcinoma P19 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 284, n. 5, p. 1098–1103, 2001.

GORGUN, Cansu *et al.* Dissecting the effects of preconditioning with inflammatory cytokines and hypoxia on the angiogenic potential of mesenchymal stromal cell (MSC)-derived soluble proteins and extracellular vesicles (EVs). **Biomaterials**, [s. l.], v. 269, n. November, p. 1–17, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120633>.

GUM, Elizabeth T. *et al.* Human Serum Albumin and its N-Terminal Tetrapeptide (DAHK) Block Oxidant-Induced Neuronal Death. **Stroke**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 590–595, 2004.

HA, Dae Hyun *et al.* Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1–53, 2020.

HARRELL, Carl Randall *et al.* Therapeutic Use of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: From Basic Science to Clinics. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1–17, 2020.

HAUPT, Matteo *et al.* Lithium modulates miR-1906 levels of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles contributing to poststroke neuroprotection by toll-like receptor 4 regulation. **Stem Cells Translational Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 357–373, 2021.

HOU, Kun *et al.* Erratum: Bone mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-29b-3p prevents hypoxic-ischemic injury in rat brain by activating the PTEN-mediated Akt signaling pathway. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–15, 2020.

HOU, Sheng T.; JIANG, Susan X.; SMITH, Robert A. Permissive and repulsive cues and signalling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *In: International review of cell and molecular biology*. [s. l.]: Elsevier Inc. and Her Majesty the Queen in right of Canada, 2008. p. 125–181.

ISLAM, Md Torequl. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological Research**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 73–82, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>.

JALLALI, Navid *et al.* Modulation of intracellular reactive oxygen species level in chondrocytes by IGF-1, FGF, and TGF- $\beta$ 1. **Connective Tissue Research**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 149–158, 2007.

JARMALAVIČIUTE, Akvile *et al.* Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 932–939, 2015.

JAYARAJ, Richard L. *et al.* Neuroinflammation: Friend and foe for ischemic stroke. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–24, 2019.

JHA, Kumar Abhiram *et al.* Concentrated conditioned media from adipose tissue derived mesenchymal stem cells mitigates visual deficits and retinal inflammation following mild traumatic brain injury. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1–22, 2018.

JHA, Mithilesh Kumar *et al.* Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: Implications in brain health and diseases. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 162, n. 12, p. 37–69, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.12.003>.

JHA, Kumar Abhiram *et al.* Mesenchymal stem cell secretome protects against oxidative stress-induced ocular blast visual pathologies. **Experimental Eye Research**, [s. l.], v. 215, n. 1, 2022.

JHA, Mithilesh Kumar *et al.* Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. **Neuroscientist**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 227–240, 2019.

JIANG, Dongdong *et al.* Neuron-derived exosomes-transmitted miR-124-3p protect traumatically injured spinal cord by suppressing the activation of neurotoxic microglia and astrocytes. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00665-8>.

JUNG, Yeon Joo; CHUNG, Won Suk. Phagocytic roles of glial cells in healthy and diseased brains. **Biomolecules and Therapeutics**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 350–357, 2018.

KADOMATSU, Kenji; MURAMATSU, Takashi. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 204, n. 2, p. 127–143, 2004.

KAHLE, Philipp J.; WAAK, Jens; GASSER, Thomas. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 10, p. 1354–1361, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.003>.

KAHROBA, Houman *et al.* The role of Nrf2 in neural stem/progenitors cells: From maintaining stemness and self-renewal to promoting differentiation capability and facilitating therapeutic application in neurodegenerative disease. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 65, n. 11, p. 1–29, 2020.

KAMINSKI, Nicole *et al.* Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles reduce neuroinflammation, promote neural cell proliferation and improve oligodendrocyte maturation in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. December, p. 1–14, 2020.

KARVE, Ila P.; TAYLOR, Juliet M.; CRACK, Peter J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 173, n. 4, p. 692–702, 2016.

KATSUDA, Takeshi *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 1–11, 2013.

KIM, Kiyoon *et al.* Antioxidant activity is required for the protective effects of cyclophilin A against oxidative stress. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 712–718, 2015.

KIM, Won Serk *et al.* Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: Protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. **Journal of Dermatological Science**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 133–142, 2008.

KIM, Han Soo *et al.* Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 839–849, 2012.

KIM, Won Serk; PARK, Byung Soon; SUNG, Jong Hyuk. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. **Expert Opinion on Biological Therapy**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 879–887, 2009.

KLINGEMANN, Hans; MATZILEVICH, David; MARCHAND, James. Mesenchymal stem cells - Sources and clinical applications. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 272–277, 2008.

KORSHUNOVA, Irina *et al.* Characterization of BASP1-mediated neurite outgrowth. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 86, n. 10, p. 2201–2213, 2008.

LANA, Daniele *et al.* The emerging role of the interplay among astrocytes, microglia, and neurons in the hippocampus in health and disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 1–15, 2021.

LEE, Jaeim *et al.* Enhanced therapeutic potential of the secretome released from adipose-derived stem cells by PGC-1 $\alpha$ -driven upregulation of mitochondrial proliferation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 1–15, 2019.

LI, Qiang *et al.* Exosomes derived from miR-188-3p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells protect Parkinson's disease. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s. l.], v. 23, n. March, p. 1334–1344, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.01.022>.

LIU, Xiaoli *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury-induced neuroinflammation and pyroptosis by modulating microglia M1/M2 phenotypes. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 341, p. 1–16, 2021.

LIU, Jifei *et al.* Effects of Peroxiredoxin 2 in Neurological Disorders: A Review of its Molecular Mechanisms. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 720–730, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02971-x>.

LIU, Beihui; TESCHEMACHER, A. G.; KASPAROV, Sergey. Neuroprotective potential of astroglia. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 95, n. 11, p. 2126–2139, 2017.

LUBOS, Edith; LOSCALZO, Joseph; HANDY, Diane E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 1957–1997, 2011.

MA, Y. H. *et al.* Thioredoxin-1 attenuates post-ischemic neuronal apoptosis via reducing oxidative/nitrative stress. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 475–483, 2012.

MARKOV, Alexander *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. **Stem Cell Research and Therapy**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–30, 2021.

MAZINI, Loubna *et al.* Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 1–30, 2019.

MELO, Fernanda Rosene *et al.* Transplantation of Human Skin-Derived Mesenchymal Stromal Cells Improves Locomotor Recovery After Spinal Cord Injury in Rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 941–947, 2017.

MERELLI, Amalia *et al.* Hypoxia, oxidative stress, and inflammation: Three faces of neurodegenerative diseases. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 82, p. 1–18, 2021.

MERIMI, Makram *et al.* The therapeutic potential of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine: Current knowledge and future understandings. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, p. 1–18, 2021.

MISHRA, Vineet Kumar *et al.* Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1–30, 2020.

MITCHELL, Robert *et al.* Secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells promotes skeletal muscle regeneration through synergistic action of extracellular vesicle cargo and soluble proteins. **Stem Cell Research and Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–19, 2019.

MOHAMMAD, Karamat *et al.* Quiescence entry, maintenance, and exit in adult stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 1–43, 2019.

MOKHTARI, Behnaz *et al.* Human amniotic membrane mesenchymal stem cells-conditioned medium attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by targeting oxidative stress. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1453–1461, 2020.

MUHAMMAD, Suleiman A. Mesenchymal stromal cell secretome as a therapeutic strategy for traumatic brain injury. **BioFactors**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 880–891, 2019.

MUSHAHARY, Dolly *et al.* Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. **Cytometry Part A**, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 19–31, 2018.

NAKANO, Masako *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. April, p. 1–14, 2016.

NAKANO, Masako; FUJIMIYA, Mineko. Potential effects of mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles and exosomal miRNAs in neurological disorders. **Neural Regeneration Research**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 2359–2366, 2021.

NAKASHIMA, Yoshiki *et al.* A liquid chromatography with tandem mass spectrometry-based proteomic analysis of cells cultured in DMEM 10% FBS and chemically defined medium using human adipose-derived mesenchymal stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1–15, 2018.

NERI, Simona. Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 1–26, 2019.

NG, Si Yun; LEE, Alan Yiu Wah. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. November, p. 1–23, 2019.

NGUYEN, Doan C. *et al.* Extracellular vesicles from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells support ex vivo survival of human antibody secreting cells. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–16, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1463778>.

NIADA, Stefania *et al.* Differential proteomic analysis predicts appropriate applications for the secretome of adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells and dermal fibroblasts. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2018, p. 1–11, 2018.

NIADA, Stefania *et al.* Proteomic analysis of extracellular vesicles and conditioned medium from human adipose-derived stem/stromal cells and dermal fibroblasts. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 232, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104069>.

NIRZHOR, Saif Shahriar Rahman; KHAN, Rubayat Islam; NEELOTPOL, Sharmind. The biology of glial cells and their complex roles in Alzheimer's disease: New opportunities in therapy. **Biomolecules**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 1–21, 2018.

OH, Yoojung *et al.* Neuroprotective effects of overexpressed cyclophilin B against A $\beta$ -induced neurotoxicity in PC12 cells. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 905–920, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.036>.

OKADA, Seiji *et al.* Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury. **Neuroscience Research**, [s. l.], v. 126, p. 39–43, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2017.10.004>.

ORTIZ, Luis Miguel Guamán *et al.* Berberine, an epiphany against cancer. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 12349–12367, 2014.

OTERO-ORTEGA, Laura *et al.* Role of Exosomes as a Treatment and Potential Biomarker for Stroke. **Translational Stroke Research**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 241–249, 2019.

PALOMARES, Teodoro *et al.* The neuroprotective effect of conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem Cells is impaired by N-acetyl cysteine supplementation. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 13–25, 2018.

PALUMBO, Paola *et al.* Methods of isolation, characterization and expansion of human adipose-derived stem cells (ASCs): An overview. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, 2018.

PEKKNY, Milos *et al.* Astrocyte activation and reactive gliosis - A new target in stroke?. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 689, p. 45–55, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.021>.

PHAM, Thang L.; BAZAN, Haydee E.P. Docosanoid signaling modulates corneal nerve regeneration: Effect on tear secretion, wound healing, and neuropathic pain. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 62, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1194/jlr.TR120000954>.

PHATNANI, Hemali; MANIATIS, Tom. Astrocytes in neurodegenerative disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 1–18, 2015.

PINHO, Andreia G. *et al.* Cell secretome: Basic insights and therapeutic opportunities for CNS disorders. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1–18, 2020.

PIRES, Ana O. *et al.* Unveiling the differences of secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue derived stem cells and human umbilical cord perivascular cells: A proteomic analysis. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 25, n. 14, p. 1–37, 2016.

PRAVEEN, L. Kumar *et al.* The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. **Cytokine and Growth**

**Factor Reviews**, [s. l.], v. 46, n. April, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>.

PUIG-PIJUAN, Teresa *et al.* Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells protect neural cells from oxidative stress through paracrine mechanisms. **Future Science OA**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 1–16, 2020.

QU, Jing; ZHANG, Huanxiang. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injury. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2017, p. 1–12, 2017.

RAJAN, Thangavelu Soundara *et al.* Conditioned medium from human gingival mesenchymal stem cells protects motor-neuron-like NSC-34 cells against scratch-injury-induced cell death. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 383–394, 2017.

REVUELTA, Miren *et al.* Ischemic stroke in neonatal and adult astrocytes. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s. l.], v. 183, p. 1–31, 2019.

RIAZIFAR, Milad *et al.* Stem Cell-Derived Exosomes as Nanotherapeutics for Autoimmune and Neurodegenerative Disorders. **ACS Nano**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 6670–6688, 2019.

RIBEIRO, Carlos A. *et al.* The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. **Stem Cell Research and Therapy**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 1–7, 2012.

RIZOR, Asha *et al.* Astrocytic oxidative/nitrosative stress contributes to Parkinson's disease pathogenesis: The dual role of reactive astrocytes. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1–19, 2019.

SALGADO, Antonio *et al.* Adipose Tissue Derived Stem Cells Secretome: Soluble Factors and Their Roles in Regenerative Medicine. **Current Stem Cell Research & Therapy**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 103–110, 2010.

SANDONÀ, Martina *et al.* Mesenchymal Stromal Cells and Their Secretome: New Therapeutic Perspectives for Skeletal Muscle Regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 9, p. 1–9, 2021.

SANTAMARIA, Giulia *et al.* Intranasal delivery of mesenchymal stem cell secretome repairs the brain of Alzheimer's mice. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 203–218, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-020-0592-2>.

SARALAMMA, Venu Venkatarama Gowda *et al.* Proteome Profiling of Membrane-Free Stem Cell Components by Nano-LS/MS Analysis and Its Anti-Inflammatory Activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2019, p. 1–13, 2019.

SELBACH, Matthias *et al.* Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. **Nature**, [s. l.], v. 455, n. 7209, p. 58–63, 2008.

SHIBUKI, Hiroto *et al.* Expression and neuroprotective effect of hepatocyte growth factor in retinal ischemia-reperfusion injury. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 528–536, 2002.

SIES, Helmut; JONES, Dean P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 363–383, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.

SINGH, Anju *et al.* Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 1–20, 2019.

SOEDA, Shinji *et al.* Anti-apoptotic roles of plasminogen activator inhibitor-1 as a neurotrophic factor in the central nervous system. **Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 100, n. 6, p. 1014–1020, 2008.

SONG, Miyeoun *et al.* Comparison of the effects of human dental pulp stem cells and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on ischemic human astrocytes in vitro. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 973–983, 2015.

SONG, Yuxian *et al.* Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of Interleukin-1 $\beta$ -Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis. **Stem Cells**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 1208–1221, 2017.

STAFF, Nathan P.; JONES, David T.; SINGER, Wolfgang. Mesenchymal Stromal Cell Therapies for Neurodegenerative Diseases. **Mayo Clinic Proceedings**, [s. l.], v. 94, n. 5, p. 892–905, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.001>.

STAVELY, Rhian; NURGALI, Kulmira. The emerging antioxidant paradigm of mesenchymal stem cell therapy. **Stem Cells Translational Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 985–1006, 2020.

TIZON, Belen *et al.* Induction of autophagy by cystatin C: A mechanism that protects murine primary cortical neurons and neuronal cell lines. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1–12, 2010.

TORRENTE, D. *et al.* Paracrine factors of human mesenchymal stem cells increase wound closure and reduce reactive oxygen species production in a traumatic brain injury in vitro model. **Human and Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 673–684, 2014.

TRENTIN, Andréa Gonçalves. Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 189, n. 2, p. 189–197, 2006.

TSIAPALIS, Dimitrios; O'DRISCOLL, Lorraine. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1–27, 2020.

VASILE, Flora; DOSSI, Elena; ROUACH, Nathalie. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. **Brain Structure and Function**, [s. l.], v. 222, n. 5, p. 2017–2029, 2017.

VENERUSO, V. *et al.* Stem cell paracrine effect and delivery strategies for spinal cord injury regeneration. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 300, n. February, p. 141–153, 2019.

VERKHRATSKY, Alexei; NEDERGAARD, Maiken. Physiology of astroglia. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 239–389, 2018.

VIDYASAGAR, Aparna; WILSON, Nancy A.; DJAMALI, Arjang. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. **Fibrogenesis and Tissue Repair**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–7, 2012.

VIGO, Tiziana *et al.* Mesenchymal stem cells instruct a beneficial phenotype in reactive astrocytes. **GLIA**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 1204–1215, 2021.

VOULGARI-KOKOTA, A. *et al.* Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 236, n. 1, p. 161–170, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.04.011>.

WEN, Caiyan *et al.* The Secretion from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Pretreated with Berberine Rescues Neurons with Oxidative Damage Through Activation of the Keap1-Nrf2-HO-1 Signaling Pathway. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 59–73, 2020.

WHITTAKER, Thomas E. *et al.* Experimental artefacts can lead to misattribution of bioactivity from soluble mesenchymal stem cell paracrine factors to extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–15, 2020.

XU, Limin *et al.* Exosomes Derived From CircAkap7-Modified Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Protect Against Cerebral Ischemic Injury. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 8, n. October, p. 1–16, 2020.

XU, Weilin *et al.* Selective autophagy as a therapeutic target for neurological diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 1369–1392, 2021.

XUN, Chengfeng *et al.* Insight into the proteomic profiling of exosomes secreted by human OM-MSCs reveals a new potential therapy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 131, n. July, 2020.

YAMAZAKI, Kazuyoshi *et al.* Clinical trials of stem cell treatment for spinal cord injury. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 1–19, 2020.

YANG, Jen Tsung *et al.* Protection against Neurodegeneration in the Hippocampus Using Sialic Acid- and 5-HT-Moduline-Conjugated Lipopolymer Nanoparticles. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1311–1320, 2019.

YANG, Lingyan *et al.* The Regulatory Functionality of Exosomes Derived from hUMSCs in 3D Culture for Alzheimer's Disease Therapy. **Small**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 1–11, 2020.

YIN, Lei *et al.* Therapeutic Advances of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Regenerative Medicine. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 1–28, 2020.

YOUNG, Mook Lee *et al.* Oxidative modification of peroxiredoxin is associated with drug-induced apoptotic signaling in experimental models of Parkinson disease. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 15, p. 9986–9998, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M800426200>.

YU, Shi *et al.* Profiling the secretome of human stem cells from dental apical papilla. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 499–508, 2016.

ZHANG, Meng *et al.* Exosomes with high level of miR-181c from bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit inflammation and apoptosis to alleviate spinal cord injury. **Journal of Molecular Histology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 301–311, 2021.

ZHAO, Linlin *et al.* Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells overexpressing microRNA-25 protect spinal cords against transient ischemia. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, [s. l.], v. 157, n. 2, p. 508–517, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.07.095>.

ZHOU, Min *et al.* The Modulation of Regulatory T Cells via HMGB1/PTEN/ $\beta$ -Catenin Axis in LPS Induced Acute Lung Injury. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. July, p. 1–14, 2019.

ZOMER, Helena Debiazi *et al.* In vitro comparative study of human mesenchymal stromal cells from dermis and adipose tissue for application in skin wound healing. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 729–741, 2019.

ZOMER, Helena Debiazi *et al.* Mesenchymal stromal cells from dermal and adipose tissues induce macrophage polarization to a pro-repair phenotype and improve skin wound healing. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 247–260, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.02.003>.

ZOMER, Helena Debiazi. **Derme versus tecido adiposo: influência da fonte de células estromais mesenquimais em engenharia de tecidos para o reparo cutâneo**. 2017. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

## APÊNDICES

APÊNDICE A - Quadro 4 - Estratégia de busca detalhada da literatura referente aos efeitos do MC-CEM sobre astrócitos submetidos a estresse oxidativo

Base de dados	Estratégia de busca (abril 2021)	Nº de artigos
EMBASE	(("mesenchymal stem cell" OR "mesenchymal stromal cell" OR "multipotent stromal cell" OR "mesenchymal stromal/stem cell" OR "mesenchymal stem/stromal cell" OR "Multipotent Mesenchymal Stromal Cell" OR "mesenchymal stem cells" OR "mesenchymal stromal cells" OR "multipotent stromal cells" OR "mesenchymal stromal/stem cells" OR "mesenchymal stem/stromal cells" OR "Multipotent Mesenchymal Stromal Cells" OR "Mesenchymal Progenitor Cell" OR "Mesenchymal Progenitor Cells") AND ("oxidative stress" OR "oxidative stresses" OR "oxidant stress" OR "oxidant stresses" OR "Oxidative Damage" OR "Oxidative Damages" OR "Oxidative Stress Injury" OR "Oxidative Stress Injuries" OR "Oxidative Injury" OR "Oxidative Injuries" OR "Oxidative DNA Damage" OR "Oxidative DNA Damages" OR "DNA Oxidative Damage" OR "DNA Oxidative Damages" OR "reactive oxygen species" OR "Active Oxygen" OR "Oxygen Radicals" OR "Pro-Oxidant" OR "Pro Oxidant" OR "Pro-Oxidants" OR "Pro Oxidants" OR oxidant OR oxidants OR "reactive nitrogen species" OR "Oxidizing Agent" OR "oxidizing agents" OR antioxidant OR antioxidants OR "Anti-Oxidants" OR "Anti Oxidants" OR "Anti-Oxidant" OR "Anti Oxidant") AND ("conditioned media" OR "conditioned medium" OR "Conditioned Culture Media" OR "Conditioned	45

	Culture Medium" OR secretome) AND (astrocyte OR astrocytes OR astroglia OR astroglia OR "Astroglial Cells" OR "Astroglial Cell" OR "Astroglia Cells" OR "Astroglia Cell" OR Neuroglia OR "Glial Cells" OR "Glial Cell" OR "Glial Cells" OR "Glial Cell" OR Glia OR Glia OR "Neuroglial Cells" OR "Neuroglial Cell")):ti:ab:kw	
Google Scholar (inglês)	allintitle: ("mesenchymal stem cell" OR "mesenchymal stromal cell" OR "multipotent stromal cell" OR "Multipotent Mesenchymal Stromal Cell" OR "mesenchymal stem cells" OR "mesenchymal stromal cells" OR "multipotent stromal cells" OR "Multipotent Mesenchymal Stromal Cells") AND (astrocyte OR astrocytes OR astroglia OR astroglia OR "Astroglial Cells" OR "Astroglial Cell" OR neuroglia OR Neuroglia OR "Glial Cells" OR "Glial Cell" OR Glia OR Glia OR "Neuroglial Cells" OR "Neuroglial Cell" OR "central nervous system" OR "cns" OR brain) - transplantation	757
Google Scholar (português)	allintitle: ("célula-tronco mesenquimal" OR "células-tronco mesenquimais" OR "célula estromal mesenquimal" OR "células estromais mesenquimais" OR "célula estromal multipotente" OR "células estromais multipotentes" OR "Célula estromal mesenquimal multipotente" OR "Células estromais mesenquimais multipotentes") AND (astrócito OR astrócitos OR "Células gliais" OR "Célula Glial" OR "sistema nervoso central" OR "snc" OR nervo OR nervoso OR nervosa OR encefálico OR cerebral)	29
PubMed	((("mesenchymal stem cell" OR "mesenchymal stromal cell" OR "multipotent stromal cell" OR "mesenchymal	82

	<p>stromal/stem cell" OR "mesenchymal stem/stromal cell" OR "Multipotent Mesenchymal Stromal Cell" OR "mesenchymal stem cells" OR "mesenchymal stromal cells" OR "multipotent stromal cells" OR "mesenchymal stromal/stem cells" OR "mesenchymal stem/stromal cells" OR "Multipotent Mesenchymal Stromal Cells" OR "Mesenchymal Progenitor Cell" OR "Mesenchymal Progenitor Cells") AND ("oxidative stress"[Title/Abstract] OR "oxidative stresses"[Title/Abstract] OR "oxidant stress" OR "oxidant stresses" OR "Oxidative Damage" OR "Oxidative Damages" OR "Oxidative Stress Injury" OR "Oxidative Stress Injuries" OR "Oxidative Injury" OR "Oxidative Injuries" OR "Oxidative DNA Damage" OR "Oxidative DNA Damages" OR "DNA Oxidative Damage" OR "DNA Oxidative Damages" OR "reactive oxygen species"[Title/Abstract] OR "Active Oxygen" OR "Oxygen Radicals" OR "Pro-Oxidant" OR "Pro Oxidant" OR "Pro-Oxidants" OR "Pro Oxidants" OR oxidant OR oxidants OR "reactive nitrogen species"[Title/Abstract] OR "Oxidizing Agent"[Title/Abstract] OR "oxidizing agents" OR antioxidant OR antioxidants OR "Anti-Oxidants" OR "Anti Oxidants" OR "Anti-Oxidant" OR "Anti Oxidant") AND ("conditioned media"[Title/Abstract] OR "conditioned medium" OR "Conditioned Culture Media" OR "Conditioned Culture Medium" OR secretome) AND (astrocyte OR astrocytes OR astroglia OR astroglia OR "Astroglial Cells" OR "Astroglial Cell" OR "Astroglia Cells" OR "Astroglia Cell" OR Neuroglia OR "Glial Cells" OR "Glial Cell" OR "Glia Cells" OR "Glia Cell" OR Glia OR Glia OR "Neuroglial Cells" OR "Neuroglial Cell"))</p>	
--	---	--

Scopus	TITLE-ABS-KEY(("mesenchymal stem cell" OR "mesenchymal stromal cell" OR "multipotent stromal cell" OR "mesenchymal stromal/stem cell" OR "mesenchymal stem/stromal cell" OR "Multipotent Mesenchymal Stromal Cell" OR "mesenchymal stem cells" OR "mesenchymal stromal cells" OR "multipotent stromal cells" OR "mesenchymal stromal/stem cells" OR "mesenchymal stem/stromal cells" OR "Multipotent Mesenchymal Stromal Cells" OR "Mesenchymal Progenitor Cell" OR "Mesenchymal Progenitor Cells") AND ("oxidative stress" OR "oxidative stresses" OR "oxidant stress" OR "oxidant stresses" OR "Oxidative Damage" OR "Oxidative Damages" OR "Oxidative Stress Injury" OR "Oxidative Stress Injuries" OR "Oxidative Injury" OR "Oxidative Injuries" OR "Oxidative DNA Damage" OR "Oxidative DNA Damages" OR "DNA Oxidative Damage" OR "DNA Oxidative Damages" OR "reactive oxygen species" OR "Active Oxygen" OR "Oxygen Radicals" OR "Pro-Oxidant" OR "Pro Oxidant" OR "Pro-Oxidants" OR "Pro Oxidants" OR oxidant OR oxidants OR "reactive nitrogen species" OR "Oxidizing Agent" OR "oxidizing agents" OR antioxidant OR antioxidants OR "Anti-Oxidants" OR "Anti Oxidants" OR "Anti-Oxidant" OR "Anti Oxidant") AND ("conditioned media" OR "conditioned medium" OR "Conditioned Culture Media" OR "Conditioned Culture Medium" OR secretome) AND (astrocyte OR astrocytes OR astroglia OR astroglia OR "Astroglial Cells" OR "Astroglial Cell" OR "Astroglia Cells" OR "Astroglia Cell" OR Neuroglia OR "Glial Cells" OR "Glial Cell" OR "Glia Cells" OR "Glia Cell" OR Glia OR	66
--------	---	----

	Glias OR "Neuroglial Cells" OR "Neuroglial Cell"))	
Web of Science	<p>TS=(("mesenchymal stem cell" OR "mesenchymal stromal cell" OR "multipotent stromal cell" OR "mesenchymal stromal/stem cell" OR "mesenchymal stem/stromal cell" OR "Multipotent Mesenchymal Stromal Cell" OR "mesenchymal stem cells" OR "mesenchymal stromal cells" OR "multipotent stromal cells" OR "mesenchymal stromal/stem cells" OR "mesenchymal stem/stromal cells" OR "Multipotent Mesenchymal Stromal Cells" OR "Mesenchymal Progenitor Cell" OR "Mesenchymal Progenitor Cells") AND ("oxidative stress" OR "oxidative stresses" OR "oxidant stress" OR "oxidant stresses" OR "Oxidative Damage" OR "Oxidative Damages" OR "Oxidative Stress Injury" OR "Oxidative Stress Injuries" OR "Oxidative Injury" OR "Oxidative Injuries" OR "Oxidative DNA Damage" OR "Oxidative DNA Damages" OR "DNA Oxidative Damage" OR "DNA Oxidative Damages" OR "reactive oxygen species" OR "Active Oxygen" OR "Oxygen Radicals" OR "Pro-Oxidant" OR "Pro Oxidant" OR "Pro-Oxidants" OR "Pro Oxidants" OR oxidant OR oxidants OR "reactive nitrogen species" OR "Oxidizing Agent" OR "oxidizing agents" OR antioxidant OR antioxidants OR "Anti-Oxidants" OR "Anti Oxidants" OR "Anti-Oxidant" OR "Anti Oxidant") AND ("conditioned media" OR "conditioned medium" OR "Conditioned Culture Media" OR "Conditioned Culture Medium" OR secretome) AND (astrocyte OR astrocytes OR astroglia OR astroglia OR "Astroglial Cells" OR "Astroglial Cell" OR "Astroglia Cells" OR "Astroglia Cell" OR Neuroglia OR "Glial Cells" OR "Glial Cell"</p>	47

	OR "Glia Cells" OR "Glia Cell" OR Glia OR Glias OR "Neuroglial Cells" OR "Neuroglial Cell"))	
--	---	--

Fonte: elaborado pela autora (2021).