

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 29/06/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS CRIOPRESERVADAS OBTIDAS DE
GELATINA DE WHARTON E TECIDO ADIPOSEO CANINO E
CULTIVADAS EM DUAS CONCENTRAÇÕES DE SORO FETAL
BOVINO.

ISADORA ARRUDA

Botucatu – São Paulo

Junho - 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS CRIOPRESERVADAS OBTIDAS DE
GELATINA DE WHARTON E TECIDO ADIPOSEO CANINO E
CULTIVADAS EM DUAS CONCENTRAÇÕES DE SORO FETAL
BOVINO.

ISADORA ARRUDA

Defesa de Tese de Doutorado apresentada
junto ao programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal.

Orientadora: Prof. Dr^a. Fernanda da Cruz
Landim

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Arruda, Isadora.

Avaliação do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais criopreservadas obtidas de gelatina de Wharton e tecido adiposo canino e cultivadas em duas concentrações de soro fetal bovino / Isadora Arruda. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Expressão gênica. 2. Terapia celular. 3. Bovino - Genética. 4. Matriz extracelular. 5. Cordão umbilical.

Palavras-chave: Expressão gênica; Matriz extravascular do cordão umbilical; Soro fetal bovino; Terapia celular.

Nome do Autor: Isadora Arruda

Título: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS CRIOPRESERVADAS OBTIDAS DE GELATINA DE WHARTON E TECIDO ADIPOSEO CANINO E CULTIVADAS EM DUAS CONCENTRAÇÕES DE SORO FETAL BOVINO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Fernanda da Cruz Landim

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP- Botucatu

Profª Drª Ana Liz Garcia Alves

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ - UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho

Membro

Departamento – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Presidente Prudente

Profª Drª Cláudia Barbosa Fernandes

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ – USP – São Paulo

Data da defesa: 29 de Junho de 2018.

Dedico este trabalho à minha família, por todo o apoio, e compreensão em todos os momentos. Em especial ao meu avô Milton Aparecido (in memoriam), pelo apoio em toda a minha vida e principalmente na vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, ter fé me ajudou a chegar até aqui.

À minha família, meus pais Walmir e Lúcia, irmãos Natália e Vitor, e cunhada Daiane, sem o apoio deles não seria possível percorrer todo esse caminho.

Em especial ao meu sobrinho Lucas e afilhada Beatriz Maria, tão pequeninos, mas fundamentais na minha vida.

Ao meu namorado Maurício, por todo amor, compreensão e apoio ao longo desses anos, que não foram fáceis.

À minha orientadora, Professora Dra. Fernanda da Cruz Landim, por todo o ensinamento ao longo desses oito anos trabalhando juntas, sempre com palavras certas nos momentos certos.

Ao Renan, entrou para um estágio, virou IC e eu encontrei um amigo, braço direito no laboratório, me acompanhando em todas as rotinas de PCR, entre erros e acertos, conseguimos sobreviver. E em especial à Bianca por esses últimos anos de parceria e amizade.

À Professora Dra. Maria Denise Lopes, sem o apoio dela, talvez hoje não estaria onde estou.

À todos os colegas de laboratório, a rotina não é fácil para ninguém, e apesar de todos os problemas e adversidade, o trabalho em equipe é fundamental para o sucesso.

Agradeço ao Laboratório FitoFarmatec – Departamento de Farmacologia – IBB/ Unesp-Botucatu, Professor Marcelo Fábio Gouveia Nogueira por disponibilizar toda estrutura em favor do meu experimento. À Patrícia, pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos, com uma pessoa leiga em biologia molecular. E em especial à Elisa, me ajudou em todas as etapas da realização do Biomark.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal, Edilson, Edivaldo, Evandro e Felipe, por toda ajuda, em especial à Dona Raquel, sem o trabalho deles nada disso seria possível.

Agradeço ao Ambulatório de Dor e Acupuntura – FMVZ- Unesp/Botucatu, ao Dr. Jean, Maíra (ex-residente) e Suelen (residente atual), pela dedicação das aplicações de célula-tronco de toda sexta-feira, aprendi muito frequentando o ambulatório, e hoje ele é fundamental para o desenvolvimento da nossa pesquisa.

Agradeço também ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, ao Conselho da pós-graduação, o qual tive o prazer de fazer parte por dois anos, que mesmo com todas as dificuldades de um curso novo, foi capaz de oferecer a estrutura necessária.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Ilustração Esquemática do tempo de cultivo das CTMs-GW, indicando o momento em que cada análise foi realizada. Dias = total de dias utilizados em cultivo, onde 0 é o dia em que as células foram plaqueadas e 26 o último dia de cultivo. No quinto dia de cultivo, denominado de M₀, os meios basais foram substituídos por meios de indução adipogênica e osteogênica. O 19º dias de cultivos, denominado de M₁₄ ou Grupo D14, as amostras induzidas para a linhagem adipogênica foram fixadas e coradas com Oil Red. No 26º dias de cultivo, denominado de M₂₁ ou Grupo D21, as amostras foram fixadas e coradas com Alizarin Red. Nos grupos D14 e D21 as CTMs-GW as amostras induzidas e não induzidas às linhagens osteogênica e adipogênica foram submetidas à extração de RNA para a análise de RT-qPCR. 30

Figura 2. Microscopia de luz de Células tronco Mesenquimais derivadas de Gelatina de Wharton (CTM-GW), submetidas a diferenciação adipogênica, M₁ a M₄ em formato fibroblastóide (A e B, respectivamente), a partir de M₅ aumento no tamanho do citoplasma (C e D – setas pretas) e a partir do M₉ aparecimento de células semelhantes a “neurônios” (E – seta vermelha). Escala: 200µm (A, B, C e E) e 100µm (D). 36

Figura 3. Microscopia de luz – Grupo D14 - Células tronco Mesenquimais derivadas de Gelatina de Wharton (CTM-GW), submetidas a indução adipogênica Grupo D14 (A), onde a seta indica célula em formato de neurônios, e controle Grupo D14 (B) corados com Oil Red (A e B), confirmando a diferenciação na linhagem adipogênica, bem com a diferenciação espontânea (B); Grupo D21 - CTM-GW submetidas a diferenciação osteogênica e corados com Alizarin Red (C), também o controle (D) com ausência de marcação. Escala: 100µm (A e B) e 200µm (C e D). 37

Figura 4. Microscopia de luz de Células tronco Mesenquimais derivadas de Gelatina de Wharton (CTM-GW), submetidas a indução osteogênica. Espaçamento entre as células (A), início de formação de acúmulos esbranquiçados, em forma de trabéculas (B e C), que se intensificam (D). Escala: 200µm (A, B C e D). 38

Capítulo 3

Figura 1. Ilustração esquemática do tempo de cultivo, indicando o momento em que cada análise foi realizada. Linha preta = tempo total que as células permaneceram em cultivo; D1- dia em que as células foram plaqueadas; D5 = D₀ – início da indução à diferenciação (adipogênica, osteogênica), neste momento as primeiras amostras foram fixadas e coradas com *Oil Red* e *Alizarin Red*, compondo o grupo D₀ (espontânea inicial); D_{14esp}, D_{14ind}, D_{21esp} e D_{21ind} - Fixação e marcação das amostras, induzidas e não induzidas, nas linhagens osteogênica e adipogênica. RT – qPCR realizado no D19 e D26. O mesmo esquema foi realizado para as CTMs-GW e CTMs-TA. 61

Figura 2. Teste de proliferação celular das CTMs-TA cultivadas com diferentes concentrações de soro fetal bovino em relação ao tempo de cultivo. Tratamento= 10%

de SFB; Tratamento 2= 20% d SFB; Y=total do número de células; x=tempo; R²= Coeficiente de correlação..... 66

Figura 3. Teste de proliferação celular das CTMs-GW cultivadas com diferentes concentrações de soro fetal bovino em relação ao tempo de cultivo. Tratamento 1= 10% de SFB; Tratamento 2= 20% d SFB; Y=total do número de células; x=tempo; R²= Coeficiente de correlação..... 67

Figura 4. Microscopia de luz - Células tronco mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo cultivadas com 10 % (A e C) e 20% (B e D) de SFB, submetidas ao processo de diferenciação nas linhagens adipogênica (A e B) e osteogênica (C e D). Escala: 100µm (A e B) e 200µ (C e D). 68

Figura 5. Microscopia de luz - Células tronco mesenquimais derivadas de Gelatina de Wharton cultivadas com 10 % (A e C) e 20% (B e D) de SFB, submetidas ao processo de diferenciação nas linhagens adipogênica (A e B) e osteogênica (C e D). Escala: 100µm (A e B) e 200µ (C e D). 69

Figura 6. Microscopia de luz – Células tronco mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo (A, B, E e F), e Gelatina de Wharton (C, D, G e H), cultivadas com 10% e 20% de SFB, coradas com cinco dias de cultivo (Grupo D₀) para a linhagem osteogênica – Alizarin Red (A, B, C e D), com ausência de qualquer marcação, e coradas com Oil Red e contra corado com hematoxilina de Harris, corantes utilizados para evidenciar diferenciação adipogênica (E, F, G e H). Escala: 200µm (A, B, C, D, E e F) e 100µ (G e H). 70

Figura 7. Microscopia de luz – Células tronco mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo (A, B, E e F), e Gelatina de Wharton (C, D, G e H), cultivadas com 10% e 20% de SFB, coradas com 19 dias de cultivo (Grupo D₁₄) para a linhagem osteogênica – Alizarin Red (A, B, C e D), com ausência de qualquer marcação, e coradas com Oil Red e contra corado com hematoxilina de Harris, corantes utilizados para evidenciar diferenciação adipogênica (E, F, G e H). Escala: 200µm (A, B, C e D) e 100µ (E, F, G e H). 71

Figura 8. Microscopia de luz – Células tronco mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo (A, B, E e F), e Gelatina de Wharton (C, D, G e H), cultivadas com 10% e 20% de SFB, coradas com 26 dias de cultivo (Grupo D₂₁) para a linhagem osteogênica – Alizarin Red (A, B, C e D), com ausência de qualquer marcação, e coradas com Oil Red e contra corado com hematoxilina de Harris, corantes utilizados para evidenciar diferenciação adipogênica (E, F, G e H). Escala: 200µm (A, B, C e D) e 100µ (E, F, G e H). 72

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Anticorpos caninos utilizados para a realização da citometria de fluxo. 32

Tabela 2. Ensaio *TaqMan™ Gene Expression Assay* (Applied Biosystems®) utilizados para o RT-qPCR..... 33

Tabela 3. Efeito da indução à diferenciação adipogênica (D14) e osteogênica (D21) na expressão gênica em células tronco mesenquimais derivadas da gelatina de Wharton.. 39

Capítulo 3

Tabela 1. Ensaio, específicos para a espécie canina, utilizados para o RT-qPCR..... 63

Tabela 2. Efeito do cultivo de CTMs-TA com 10% e 20% de SFB na expressão gênica de CTMs induzidas e não induzidas a diferenciação. 73

Tabela 3. Efeito do cultivo de CTMs-GW com 10% e 20% de SFB na expressão gênica de CTMs induzidas e não induzidas a diferenciação. 75

SUMÁRIO

Capítulo 1	1
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	2
<i>Célula Tronco Mesenquimal e suas principais fontes</i>	2
<i>Diferenciação celular</i>	5
<i>Apoptose Celular</i>	7
<i>Bancos de Células tronco</i>	8
OBJETIVOS	11
<i>Objetivo Geral:</i>	11
<i>Objetivos específicos:</i>	11
Capítulo 2	26
Trabalho científico 1.	26
Efeitos da criopreservação, por longo tempo, nas células tronco mesenquimais derivadas da gelatina de Wharton canina	26
Resumo	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
<i>Obtenção das amostras</i>	28
<i>Isolamento e Cultivo</i>	29
<i>Criopreservação</i>	29
<i>Diferenciação</i>	31
<i>Diferenciação Adipogênica e controle (Grupo D14)</i>	31
<i>Diferenciação Osteogênica e controle (Grupo D21)</i>	31
<i>Citometria de Fluxo</i>	31
<i>Análise Quantitativa PCR em Tempo Real</i>	32
<i>PCR em tempo real Biomark HD 96.96 (Versão Beta)</i>	33
ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
RESULTADOS	35
<i>Viabilidade e Reconstituição das CTMs derivadas de Gelatina de Wharton</i>	35

<i>Citometria de Fluxo</i>	35
<i>Diferenciação induzida Osteogênica e Adipogênica</i>	35
<i>Adipogênica</i>	35
<i>Osteogênica</i>	37
<i>Resultados do RT-qPCR</i>	38
<i>Genes relacionados à linhagem adipogênica: AdipoQ, PPARα e PPARγ</i>	39
<i>Genes relacionados à linhagem osteogênica: Runx2 e Osteocalcina</i>	39
<i>Genes relacionados à linhagem neurogênica: GDNF, NES e GFAP</i>	40
DISCUSSÃO	40
REFERÊNCIAS	45
Capítulo 3	55
Trabalho Científico 2. Influência do Soro Fetal Bovino na diferenciação de células tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo e cordão umbilical canino.	55
Resumo	55
INTRODUÇÃO	56
MATERIAL E MÉTODOS	58
<i>Obtenção das amostras</i>	58
<i>Isolamento, Cultivo e Criopreservação</i>	59
<i>Matriz Extra vascular do cordão umbilical ou Gelatina de Wharton</i>	59
<i>Tecido Adiposo</i>	59
<i>Criopreservação</i>	59
<i>Teste de proliferação celular</i>	60
<i>Diferenciação não induzida e induzida</i>	60
<i>Análise Quantitativa PCR em Tempo Real (RT- qPCR)</i>	62
<i>Primers e Sondas (ensaios)</i>	62
<i>Extração do RNA total das células-tronco mesenquimais</i>	62
<i>PCR em tempo real Biomark HD 96.96 (Versão Beta)</i>	63
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	65
RESULTADOS	65
<i>Teste de proliferação celular</i>	65
<i>Diferenciação induzida</i>	67

<i>Diferenciação Não Induzida (D₀, D_{14esp} e D_{21esp})</i>	68
<i>Resultados da expressão gênica (RT-qPCR)</i>	70
<i>Células do Tecido Adiposo</i>	70
<i>Células Tronco Mesenquimais da Gelatina de Wharton</i>	74
DISCUSSÃO	76
REFERÊNCIAS	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

LISTA DE ABREVIATURAS

- CTEs – Células Tronco Embrionária
- CTMs /*MSCs* – Células Tronco Mesenquimais/*Mesenchymal Stem Cells*
- MO – Medula Óssea
- CTH – Célula Tronco Hematopoiética
- CTMs-TA/*AD-MSCs* – Células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo/*Adipose tissue derived mesenchymal stem cell*
- CTMs-GW/*WJ-MSCs* – Células tronco mesenquimais derivadas de gelatina de wharton/*Wharton's Jelly derived mesenchymal stem cells*
- MO – Medula Óssea
- HES – Hidroxietilstarch
- PVP – Polivinilpirrolidona
- Me₂SO – Dimetilsulfóxido
- SFB/*FBS* – Soro fetal bovino/*Fetal bovine serum*
- RT-qPCR - Reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real
- CD44 – Células tronco mesenquimais
- CD34 – Célula tronco hematopoiética
- CD105 – Endoglin
- MHC-II/ HLA-DR – Complexo maior de histocompatibilidade – classe II/*Human Leukocyte antigen*
- CD90 – Antígeno de superfície Thy-1
- PPAR α – Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas - α
- PPAR γ – Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas - γ
- AdipoQ – Adiponectina
- RUNX2 – Fator de transcrição relacionado ao Runt-2
- OSC – Osteocalcina
- GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial
- NES – Nestina
- GDNF – Fator Neurotrófico Derivado da Glia
- B2M – β 2- Microglobulina
- RPL13 – Proteína Ribossomal – L13
- GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

DMP-1 – Fosfoproteína ácida da matriz de dentina
HBSS – *Hank's balanced salt solution*
FCR – Força centrífuga relativa
DMEM/F12 - *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12 Nutriente Mixture*
T25 – 25 cm²
CO₂ – Dióxido de carbono
ANOVA – Análise de Variância
EPM – Erro Padrão da Média
P – Probabilidade
PIDFF -
IFN γ – Interferon gama
APCs – Células apresentadoras de antígenos profissionais
MEPE – Matriz extracelular fosfoglicoproteína
GND – Nexina derivada da glia
bFGF – Fator de crescimento fibroblástico
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial
TGF – Fator de crescimento transformador
TP53 – Proteína tumoral P53
CLU – Clusterina
BCL2L1 – Regulador de apoptose
CASP3 – Caspase 3
C-Kit – *Proto-Oncogene Tyrosine Kinase*
SOX2 – *SRY-box 2 (Sex determining region Y)*
OCT4 – *POU class 5 homeobox 1*
VIM - Vimentina
LANÇA – Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular
FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
UNESP – Universidade Estadual Paulista
IBB – Instituto de Biociências

ARRUDA, I. Avaliação do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais criopreservadas obtidas de gelatina de wharton e tecido adiposo canino e cultivadas em duas concentrações de soro fetal bovino. **Botucatu, 2018. 105 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista.**

RESUMO

As células tronco mesenquimais (CTMs) são indicadas para a terapia alogênica pois seus riscos de rejeição são significativamente reduzidos, uma vez que não são células apresentadoras de antígenos. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da criopreservação por longo tempo e das concentrações de SFB (10 e 20%) na: viabilidade, proliferação e potencial de diferenciação de CTMs. Para isso CTMs-TA e CTMs-GW criopreservadas por 43 meses foram submetidas ao processo de caracterização através da citometria de fluxo, teste de proliferação e diferenciação (por imunocitoquímica e expressão gênica). Também foi avaliada a influência de duas concentrações de SFB sobre a expressão gênica de células induzidas e não induzidas à diferenciação adipogênica e osteogênica, sendo observada também a influência, do processo de indução de diferenciação sobre a expressão gênica de CTMs-TA e CTMs-GW. As CTM criopreservadas por longo tempo mantiveram sua viabilidade após a reconstituição e também o potencial de diferenciação osteogênica *in vitro* confirmada no RT-qPCR. No teste de proliferação realizado com as CTMs-TA e CTM-GW com 10 e 20% de SFB, observamos que as CTMs-TA podem ser cultivadas com qualquer uma das concentrações, porém nas CTMs-GW identificamos que a proliferação é maior quando são cultivadas com 20% de SFB. Através da imunocitoquímica observamos que a concentração de SFB não influencia a diferenciação induzida em nenhuma das duas fontes estudadas. Já a análise da diferenciação espontânea, por imunocitoquímica, mostrou maior acúmulo de gotículas de gordura nas CTMs-TA e CTMs-GW cultivadas com 20% de SFB, indicando a diferenciação espontânea para tecido adipogênico. Este fato não foi confirmado por RT-qPCR, uma vez que não houve a expressão do transcrito *PPAR γ* que deveria ser encontrado em células diferenciadas para essa linhagem. Considerando a influência da diferenciação na expressão de transcritos específicos para a linhagem adipogênica as CTMs-TA passaram a expressar menos os *AdipoQ* e *PPAR α* e mantiveram a baixa expressão do *PPAR γ* , nas CTMs-GW não foi observada a expressão do *PPAR γ* e manteve a baixa expressão dos *AdipoQ* e *PPAR α* . Os genes relacionados a diferenciação osteogênica nas CTMs-TA o *RUNX2* apresentou maior expressão, enquanto que o *OSC* foi mantido. Dos genes relacionados a neuroproteção o *GDNF* apresentou-se mais expresso após a diferenciação adipogênica nas CTMs-GW, o mesmo foi observado quanto ao *NES* nas duas fontes estudadas. A diferenciação adipogênica influenciou de forma significativa as expressão dos transcritos *TP53*, *CASP3* e *BCL2L1* nas CTMs-TA e *BCL2L1* nas CTMs-GW, já a diferenciação osteogênica influenciou na expressão de *BCL2L1* e *CLU* nas CTMs-TA e CTMs-WJ. Concluindo, o protocolo para criopreservação e a manutenção das células foram adequados, porém algumas alterações encontradas como expressão de $CD34^+$ e $CD105^+$ associada à expressão gênica de *NES* e *GDNF* podem indicar uma tendência a diferenciação espontânea para a linhagem endotelial. Além disso, nosso trabalho demonstrou que as diferenças na concentração de SFB não influenciam a expressão gênica das células. Contudo podemos sugerir que o processo de diferenciação induziu as CTMs a um estresse, porém as CTMs responderam de forma compensatória à esse

estimulo, evidenciando assim suas características terapêuticas. **Palavras-chave:** Matriz extravascular do cordão umbilical, soro fetal bovino, expressão gênica, terapia celular.

ARRUDA, I. Evaluation of the differentiation potential of cryopreserved Canine Wharton's Jelly- And Adipose Tissue- Derived Mesenchymal Stem Cells and culture in two concentration of fetal bovine serum. Botucatu, 2018. 105 p. Thesis (PhD). Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. São Paulo State University.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are recommended for allogeneic therapy because their risks of rejection are significantly reduced since they are not antigen presenting cells. The objective of this work was to investigate the influence of long-term cryopreservation and FBS concentrations (10 and 20%) on viability, proliferation and differentiation potential of MSCs. For this, MSCs from adipose tissue (-AT) and CTMs from Wharton jelly (-WJ) cryopreserved for 43 months were submitted to the characterization process through flow cytometry, proliferation and differentiation test (by immunocytochemistry and gene expression). The influence of two concentrations of FBS on gene expression of cells induced and non-induced for adipogenic and osteogenic differentiation was also evaluated. Long-term cryopreserved MSCs maintained their viability after reconstitution and also the potential for in vitro osteogenic differentiation confirmed in RT-qPCR. In the proliferation test performed with MSC-AT and MSC-WG with 10 and 20% FBS, we observed that the MSC-AT can be grown at any of the concentrations, but in the MSC-WG proliferation is greater when cultivated with 20% FBS. Through immunocytochemistry we observed that the concentration of FBS does not influence the induced differentiation in either sources of cells studied. The analysis of the spontaneous differentiation, by immunocytochemistry, showed greater accumulation of fat droplets in MSC-AT and MSC-WG cultured with 20% FBS, indicating the spontaneous differentiation for adipogenic tissue. This fact was not confirmed by RT-qPCR, since there was no expression of the *PPAR γ* transcript that should be found in cells differentiated for this lineage. Considering the influence of the differentiation in the expression of specific transcripts for the adipogenic lineage the MSC-AT express less the *AdipoQ* and *PPAR α* and maintained the low expression of the *PPAR γ* , in the MSC-WG group *PPAR γ* expression was not observed and maintained the low expression of *AdipoQ* and *PPAR α* . From the genes related to osteogenic differentiation in MSC-AT, *RUNX2* presented higher expression, while the *OSC* was maintained. Of the genes related to neuroprotection, *GDNF* was more expressed after adipogenic differentiation in MSC-WG, the same was observed for *NES* in the two studied sources. Adipogenic differentiation significantly influenced the expression of the *TP53*, *CASP3* and *BCL2L1* transcripts in the MSC-AT and *BCL2L1* in the MSC-WG, whereas the osteogenic differentiation influenced the expression of *BCL2L1* and *CLU* in MSC-AT and MSC-WG. In conclusion, the protocol for cryopreservation and cell maintenance were adequate, but some alterations found as increased expression of CD34 + and CD105 + associated with the gene expression of *NES* and *GDNF* may indicate a tendency for spontaneous differentiation into the endothelial cell lineage. In addition, our work demonstrated that differences in FBS concentration do not influence gene expression. However, we can suggest that the differentiation process induced the MSCs to a stress, but the MSCs responded in a compensatory way to this stimulus, thus showing its therapeutic characteristics. **Key words:** Matrix extracellular umbilical cord, fetal bovine serum, gene expression, cell therapy

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa tem como foco a reparação tecidual e por isso os estudos com células tronco tem ganhado cada vez maior visibilidade. Elas estão presentes na maioria dos tecidos e órgãos e desempenham um papel importante do desenvolvimento embrionário à reparação tecidual (ZAGO; COVAS, 2006).

As células tronco embrionárias (CTEs), obtidas das massa celular interna do blastocisto, atualmente são utilizadas em pesquisas *in vitro* ou em modelos experimentais *in vivo*. Apresentam resultados interessantes e importantes para o conhecimento da biologia deste tipo celular (KIRK et al., 2014), porém pouco se sabe sobre os mecanismos de controle da diferenciação dessa linhagem celular, o que dificulta sua aplicação clínica.

A utilização de células tronco indiferenciadas, principalmente as de origem embrionária, são muitas vezes questionadas, principalmente pela forma de obtenção por comissões éticas, culturais e religiosas (CARDOSO; ARRUDA, 2009).

Além disto, as células tronco embrionárias apresentam grande potencial tumorigênico, não estando ainda disponíveis para utilização em terapias celulares. Tal fato, tem gerado mais espaço para pesquisa com células tronco de origem adulta (NOMBELA-ARRIETA; RITZ; SILBERSTEIN, 2011), utilizando fontes não embrionárias para a terapia celular.

Já as células tronco obtidas de tecidos já diferenciados, também chamadas de adultas, são uma alternativa atraente, pois apesar de não se diferenciarem em todos os tipos celulares do organismo, elas apresentam característica como plasticidade e multipotencialidade (BAKSH; SONG; TUAN, 2004; MARION; MAO, 2006) o que as torna indicadas para o uso clínico.

As células estromais multipotentes, também chamadas de células tronco mesenquimais(CTMs), foram identificadas na década de 70, em um cultivo de células tronco hematopoiéticas. De acordo com FRIEDENSTEIN et al., (1970) foi observado a formação de colônias de células, que aderiram no fundo da placa Petri, com formato

semelhante à fibroblastos. Elas foram inicialmente denominadas Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e desde então se iniciaram os estudos com este tipo celular.

Através do seu uso terapêutico, já foram observados resultados satisfatórios na recuperação de diversos tipos de lesões, principalmente as osteoarticulares e medulares (LI et al., 2017; LIU et al., 2014b; PASCHOS; SENNETT, 2017), contudo ainda existem algumas lacunas importantes a serem esclarecidas quanto a utilização destas células em especial a ocorrência de diferenciação destas em múltiplos tecidos.

Além disso, existe a necessidade do armazenamento destas células (curto ou longo tempo) para facilitar a terapia e desta forma as CTMs exibem características que permitem a formação de bancos celulares (BARLOW et al., 2008; CAMPAGNOLI et al., 2001; TODOROV et al., 2010), ampliando as perspectivas para a realização de terapias celulares autólogas e alogênicas (BALCI; CAN, 2013; BRANDÃO et al., 2018; NAALDIJK et al., 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho é verificar a manutenção das características mesenquimais das células obtidas de Gelatina de Wharton e tecido adiposo canino mantido por longo tempo de criopreservação.

REVISÃO DE LITERATURA

Célula Tronco Mesenquimal e suas principais fontes

As células tronco mesenquimais, são células tronco somáticas, presentes na maioria dos tecidos, possuem uma habilidade de proliferação e para facilitar sua identificação *in vitro*, alguns critérios foram propostos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006).

Biologicamente os tecidos adultos possuem células que são capazes de se renovar, além de reparar danos ocasionados por trauma, doença ou envelhecimento (PITTENGER et al., 1999). Inicialmente já era conhecido que as CTMs participavam da regeneração dos tecido (BYDLOWSKI et al., 2009; CARDOSO; ARRUDA, 2009; MALGIERI et al., 2010). Contudo, estudos indicam que estas células possuem uma característica ainda mais importante que é o potencial imunomodulatório, ou seja, capacidade destas células em modular de forma eficiente a ativação de componentes da

REFERÊNCIAS

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* (80-). 1999;143.
2. Kang B, Ryu H, Park SS, Koyama Y, Kikuchi M, Kim WH, et al. Science Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues , bone marrow , umbilical cord blood , and Wharton ' s jelly for treating bone defects. 2012;13:299–310.
3. M M, a F, Y T, Torrente Y. Mesenchymal Stem Cells as Muscle Reservoir. *J Stem Cell Res Ther*. 2011;01:1–9.
4. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*. 2009;126:37–42.
5. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95:9–20.
6. Ryu HH, Lim JH, Byeon YE, Park JR, Seo MS, Lee YW, et al. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J Vet Sci*. 2009;10:273–84.
7. Wei G.-J. · An G. · Shi Z.-W. · Wang K.-F. · Guan Y. · Wang Y.-S. · Han B. · Yu E.-M. · Li P.-F. · Dong D.-M. · Wang L.-P. · Teng Z. ·. Suppression of MicroRNA-383 Enhances Therapeutic Potential of Human BoneMarrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Treating Spinal Cord Injury via GDNF. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2017 [citado 25 de abril de 2017];41:1435–44. Recuperado de: <https://www.karger.com/Article/Pdf/468057>
8. Lu Y, Gao H, Zhang M, Chen B, Yang H. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Transfected Placenta-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells for Treating Spinal Cord Injury. *Med Sci Monit* [Internet]. 2017;23:1800–11. Recuperado de: <http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/902754>
9. Duan X, Zhu X, Dong X, Yang J, Huang F, Cen S, et al. Repair of large osteochondral defects in a beagle model with a novel type i collagen/glycosaminoglycan-porous titanium biphasic scaffold. *Mater Sci Eng C*

- [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;33:3951–7. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.040>
10. Liu CK, Tan XY, Luo JC, Liu HW, Hu M, Yue W. Reconstruction of beagle hemi-mandibular defects with allogenic mandibular scaffolds and autologous mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2014;9.
 11. Fu Q, Song XF, Liao GL, Deng CL, Cui L. Myoblasts Differentiated From Adipose-derived Stem Cells to Treat Stress Urinary Incontinence. *Urology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;75:718–23. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2009.10.003>
 12. Pokrywczynska M, Jundzill A, Warda K, Buchholz L, Rasmus M, Adamowicz J, et al. Does the Mesenchymal Stem Cell Source Influence Smooth Muscle Regeneration in Tissue-Engineered Urinary Bladders? *Cell Transplant*. 2017;26:1780–91.
 13. Kim SJ, Moon GJ, Cho YH, Kang HY, Hyung NK, Kim D, et al. Circulating mesenchymal stem cells microparticles in patients with cerebrovascular disease. *PLoS One* [Internet]. 2012;7:e37036. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3352849&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 14. Carelli S, Colli M, Vinci V, Caviggioli F, Klinger M, Gorio A. Mechanical activation of adipose tissue and derived mesenchymal stem cells: Novel anti-inflammatory properties. *Int J Mol Sci*. 2018;19.
 15. Marti LC, Alice A, Ribeiro F, Hamerschlak N. O efeito imunomodulatório de células-tronco mesenquimais. *Einstein*. 2011;9:224–8.
 16. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: Immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci*. 2005;12:47–57.
 17. Insausti CL, Blanquer M, García-Hernández AM, Castellanos G, Moraleda JM. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning* [Internet]. 2014;7:53–63. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3969346&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 18. J. XU, H. LU, Z.-N. MIAO, W.-J. WU, Y.-Z. JIANG, F. GE, W.-F. FANG, A.-H. ZHU, G. CHEN, J.-H. ZHOU, Y.-Z. LU, Z.-F. TANG YW. Immunoregulatory effect of neuronal-like cells in inducing differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20:5041–8.

19. Peng R, Yao X, Cao B, Tang J, Ding J. The effect of culture conditions on the adipogenic and osteogenic inductions of mesenchymal stem cells on micropatterned surfaces. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33:6008–19. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.010>
20. Eagle H. Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Am Assoc Adv os Sci* [Internet]. 1955;122:501–4. Recuperado de: <http://www.jstor.org/stable/1751011>
21. Zhao C, Andersen H, Ozyilmaz B, Ramaprabhu S, Pastorin G, Ho HK. Spontaneous and specific myogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on polyethylene glycol-linked multi-walled carbon nanotube films for skeletal muscle engineering. *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry; 2015;7:18239–49.
22. Lee JH, Shin YC, Jin OS, Kang SH, Hwang Y-S, Park J-C, et al. Reduced graphene oxide-coated hydroxyapatite composites stimulate spontaneous osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanoscale* [Internet]. Royal Society of Chemistry; 2015;7:11642–51. Recuperado de: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5NR01580D>
23. Sonomoto K, Yamaoka K, Kaneko H, Yamagata K, Sakata K, Zhang X, et al. Spontaneous differentiation of human mesenchymal stem cells on poly-lactic-co-glycolic acid nano-fiber scaffold. *PLoS One*. 2016;11:1–15.
24. Zhang N, Xiao Q-R, Man X-Y, Liu H-X, Lü L-X, Huang N-P. Spontaneous osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on electrospun nanofibrous scaffolds. *RSC Adv* [Internet]. 2016;6:22144–52. Recuperado de: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA22578G>
25. Naruse K, Urabe K, Mukaida T, Ueno T, Migishima F, Oikawa A, et al. Spontaneous differentiation of mesenchymal stem cells obtained from fetal rat circulation. *Bone*. 2004;35:850–8.
26. Diascro DD, Vogel RL, Johnson TE, Witherup KM, Pitzemberger SM, Rutledge SJ, et al. High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res*. 1998;13:96–106.
27. Polchow B, Kebbel K, Schmiedeknecht G, Reichardt A, Henrich W, Hetzer R, et al. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. *J Trans*. 2012;10:1–17.
28. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical

Cord and Bone Marrow. *Stem Cells*. 2007;25:1384–92.

29. Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: A biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol*. 2007;128:507–20.

30. Alimperti S, Lei P, Wen Y, Tian J, Campbell AM, Andreadis ST. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. *Biotechnol Prog*. 2014;30:974–83.

31. Ntambi MJ, Kim Y-C. Symposium: Adipocyte Function, Differentiation and Metabolism Regulation of Leptin Production in Humans. *J Nutr*. 2000;130:3127–31.

32. Neupane M, Chang C-C, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2008;14:1007–15. Recuperado de: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2007.0207>

33. Xu J, Li Z, Hou Y, Fang W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res* [Internet]. 2015;7:2527–35. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26885254> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4731654>

34. Chaytor JL, Tokarew JM, Wu LK, Leclre M, Tam RY, Capicciotti CJ, et al. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology*. 2012;22:123–33.

35. Saeed MA, El-Rahman MA, Helal ME, Zaher AR, Grawish ME. Efficacy of human platelet rich fibrin exudate vs fetal bovine serum on proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. *Int J Stem Cells*. 2017;10:38–47.

36. Seo J, Tsuzuki N, Haneda S, Yamada K, Furuoka H, Tabata Y, et al. Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci*. 2013;95:693–8.

37. Swamynathan P, Venugopal P, Kannan S, Thej C, Kolkundar U, Bhagwat S, et al. Are serum-free and xeno-free culture conditions ideal for large scale clinical grade expansion of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells? A comparative study. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2014;5:88. Recuperado de: <http://stemcellres.com/content/5/4/88>

38. Cimino M, Gonçalves RM, Barrias CC, Martins MCL. Xeno-free strategies for safe

human mesenchymal stem/stromal cell expansion: Supplements and coatings. *Stem Cells Int.* 2017;2017.

39. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.* 2006;30:681–7.

40. Filioli Uranio M, Valentini L, Lange-Consiglio A, Caira M, Guaricci AC, L'Abbate A, et al. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Mol Reprod Dev.* 2011;78:361–73.

41. Alves EG, Serakides R, Boeloni JN, Rosado IR, Ocarino NM, Oliveira HP, et al. Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. *BMC Vet Res [Internet].* 2014;10:190. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25178540>

42. Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, Jafari N, Khalilian A, Rahmani Z. Wharton ' s Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells : Isolation and Characterization. 2017;

43. Esteves CL, Sheldrake TA, Mesquita SP, Pesántez JJ, Menghini T, Dawson L, et al. Isolation and characterization of equine native MSC populations. *Stem Cell Res Ther [Internet]. Stem Cell Research & Therapy;* 2017;8:80. Recuperado de: <http://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0525-2>

44. Kyllönen L, Haimi S, Mannerström B, Huhtala H, Rajala KM, Skottman H, et al. Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther [Internet]. BioMed Central Ltd;* 2013;4:17. Recuperado de: <http://stemcellres.com/content/4/1/17>

45. Carneiro J, Junqueira LC. *Biologia Celular e Molecular.* 9º ed. Guanabara Koogan; 2012.

46. Gerhardt CC, Romero IA, Canello R, Camoin L, Strosberg AD. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;175:81–92.

47. Kluth SM, Buchheiser A, Houben AP, Geyh S, Krenz T, Radke TF, et al. DLK-1 as a Marker to Distinguish Unrestricted Somatic Stem Cells and Mesenchymal Stromal Cells in Cord Blood. *Stem Cells Dev [Internet].* 2010;19:1471–83. Recuperado de: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/scd.2010.0070>

48. Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV, Granjeiro JM, Borojevic R. Gene expression and protein secretion during human mesenchymal cell differentiation into adipogenic cells. *BMC Cell Biol.* 2014;15:1–10.
49. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Adipose Tissue. *Exp Biol Med [Internet].* 2008;233:901–13. Recuperado de: <http://ebm.rsmjournals.com/cgi/doi/10.3181/0712-RM-356>
50. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: Reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells fro. *J Cell Biochem [Internet].* 2011;112:1206–18. Recuperado de: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.23042>
51. Lee MH, Javed A, Kim HJ, Shin HI, Gutierrez S, Choi JY, et al. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor β 1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 1999;73:114–25.
52. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci [Internet].* Springer International Publishing; 2018;1–19. Recuperado de: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2794-z>
53. Ono N, Ono W, Mizoguchi T, Nagasawa T, Frenette PS, Kronenberg HM. Vasculature-associated cells expressing nestin in developing bones encompass early cells in the osteoblast and endothelial lineage. *Dev Cell [Internet].* Elsevier Inc.; 2014;29:330–9. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2014.03.014>
54. Wang J, Wang F, Wang Z, Li S, Chen L, Liu C, et al. Protective effect of GDNF - - engineered amniotic fluid- - derived stem cells on the renal ischaemia reperfusion injury in vitro. 2018;1–8.
55. Hellmich HL, Kos L, Cho ES, Mahon KA, Zimmer A. Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev.* 1996;54:95–105.
56. Zhang R, Lu Y, Li J, Wang J, Liu C, Gao F, et al. Glial cell line-derived

- neurotrophic factor induced the differentiation of amniotic fluid-derived stem cells into vascular endothelial-like cells in vitro. *J Mol Histol* [Internet]. 2016;47:9–19. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26712153>
57. Yan Z-J, Zhang P, Hu Y-Q, Zhang H-T, Hong S-Q, Zhou H-L, et al. Neural Stem-Like Cells Derived from Human Amnion Tissue are Effective in Treating Traumatic Brain Injury in Rat. *Neurochem Res* [Internet]. 2013;38:1022–33. Recuperado de: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-013-1012-5>
58. Jezierski A, Rennie K, Zurakowski B, Ribocco-Lutkiewicz M, Haukenfrers J, Ajji A, et al. Neuroprotective Effects of GDNF-expressing Human Amniotic Fluid Cells. *Stem Cell Rev Reports*. 2014;10:251–68.
59. Ji S, Lin S, Chen J, Huang X, Wei C, Li Z, et al. Neuroprotection of Transplanting Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in a Microbead Induced Ocular Hypertension Rat Model. *Curr Eye Res* [Internet]. Taylor & Francis; 2018;00:1–11. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/02713683.2018.1440604>
60. Zhang X, Qin Z, Wang J. The role of p53 in cell metabolism. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;31:1208–12. Recuperado de: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/aps.2010.151>
61. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:231–41.
62. Bergmann A, Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal*. 2010;3.
63. Dinitto JP, Deshmukh GD, Zhang Y, Jacques SL, Coli R, Worrall JW, et al. Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-Kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance. *J Biochem*. 2010;147:601–9.
64. Abdallah BM, Alzahrani AM, Kassem M. Secreted Clusterin protein inhibits osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by suppressing ERK1/2 signaling pathway. *Bone* [Internet]. Elsevier Inc.; 2018;110:221–9. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.02.018>
65. Yang N, Qin Q. Apolipoprotein J: A new predictor and therapeutic target in cardiovascular disease? *Chin Med J (Engl)*. 2015;128:2530–4.
66. Kollek M, Voigt G, Molnar C, Murad F, Bertele D, Krombholz CF, et al. Transient apoptosis inhibition in donor stem cells improves hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med* [Internet]. 2017;jem.20161721. Recuperado de:

<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20161721>

67. Pang A-L, Xiong L-L, Xia Q-J, Liu F, Wang Y-C, Liu F, et al. Neural Stem Cell Transplantation Is Associated with Inhibition of Apoptosis, Bcl-xL Upregulation, and Recovery of Neurological Function in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Cell Transplant* [Internet]. 2017;26:1262–75. Recuperado de: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0963689717715168>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O protocolo para criopreservação utilizado permitiu a manutenção das CTMs em bancos criobiológicos por longo período, mantendo a viabilidade celular e o potencial de proliferação. Porém foram observadas alterações na expressão dos marcadores de membrana CD34⁺ e CD105⁺, bem como na expressão gênica de *NES* e *GDNF* indicando uma possível diferenciação espontânea para a linhagem endotelial.

Apesar da concentração de SFB influenciar a taxa de proliferação celular, foi possível demonstrar que diferenças na concentração de SFB não influenciam a expressão gênica das células.

Não foi observada diferenciação espontânea das CTMs para linhagem osteogênica, e apesar das modificações morfológicas observadas, a diferenciação espontânea para linhagem adipogênica também não foi confirmada.

O processo de diferenciação induziu as CTMs a um estresse. As CTMs responderam de forma compensatória à esse estímulo, evidenciando assim suas características adaptativas.

Este trabalho abre perspectivas, para a identificação de possíveis alteração, benéficas ou não, que podem ser causadas pela criopreservação, uma vez que houve a manutenção de propriedades fundamentais para a expansão destas células após a reconstituição, mas também expressaram alteração na expressão de marcadores específicos. Além disso a análise da expressão genica nos permitiu conhecer um pouco melhor as CTMs e entender que nem sempre uma mudança morfológica é acompanhada de mudanças moleculares.