

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 memorian), 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; R^2 = 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; R^2 = 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. Ensaios *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. Ensaios, 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>	<i>2</i>
<i>Diferenciação celular</i>	<i>5</i>
<i>Apoptose Celular.....</i>	<i>7</i>
<i>Bancos de Células tronco</i>	<i>8</i>
OBJETIVOS.....	11
<i>Objetivo Geral:</i>	<i>11</i>
<i>Objetivos específicos:</i>	<i>11</i>
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>	<i>28</i>
<i>Isolamento e Cultivo</i>	<i>29</i>
<i>Criopreservação.....</i>	<i>29</i>
<i>Diferenciação.....</i>	<i>31</i>
<i>Diferenciação Adipogênica e controle (Grupo D14)</i>	<i>31</i>
<i>Diferenciação Osteogênica e controle (Grupo D21)</i>	<i>31</i>
<i>Citometria de Fluxo</i>	<i>31</i>
<i>Análise Quantitativa PCR em Tempo Real</i>	<i>32</i>
<i>PCR em tempo real Biomark HD 96.96 (Versão Beta).....</i>	<i>33</i>
ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
RESULTADOS.....	35
<i>Viabilidade e Reconstituição das CTMs derivadas de Gelatina de Wharton</i>	<i>35</i>

<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 (ensaio)</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 (D_0, 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 – Endoglinta

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 nas 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

resposta imune (MARTI et al., 2011) tanto celular, como inata. Para que isso ocorra as células devem liberar fatores anti-inflamatórios como o TGF β -1 e PTG2 e modular a liberação de citocinas como TNF, IL1, IL6 e INF γ (AMABLE et al., 2014a; CARDOSO et al., 2017; KYURKCHIEV et al., 2014; LEE et al., 2012; SEMEDO et al., 2009; WAN et al., 2008).

As células tronco de origem adulta podem ser obtidas de diversos tecidos. A medula óssea (MO) é uma das principais e mais estudadas fontes de células tronco adultas. Através de sua coleta em ossos longos, podemos isolar células tronco multipotentes tecido-específicas e células mesenquimais.

As células multipotentes tecido-específicas são as células tronco hematopoiéticas, ou seja, células progenitoras das células sanguíneas, representada por uma porção 0,05% a 1% das células totais da medula óssea, e exercem funções vitais como a reposição de todas as células do sangue. Estas foram as primeiras a serem identificadas e são bem caracterizadas (ZAGO & COVAS, 2006).

O transplante dessas células já é utilizado na rotina de hospitais humanos, para o tratamento de neoplasias hematológicas e de alguns tumores sólidos (MASSUMOTO; MASSUMOTO; AYOUB, 2011; OKAMOTO; CAMPOS, 2004).

A fração de células mesenquimais da MO, é ainda mais rara, compondo 0,001-0,01% das células totais da MO (ZAGO & COVAS, 2006) e foi identificada na década de 70 como células formadoras de colônias fibroblásticas (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHJAN, LALYKINA, 1970).

Contudo, a MO não é uma opção abundante como fonte de células tronco mesenquimais, além disso a forma de coleta requer habilidade técnica, e é um procedimento que com frequência leva a dor e desconforto do animal. Assim torna-se necessária a busca por fontes alternativas, das quais podemos destacar o tecido adiposo, membranas fetais e o cordão umbilical.

O tecido adiposo é um tecido que promove um estoque do excesso de energia do indivíduo, além disso é considerado um órgão endócrino (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; KERSHAW; FLIER, 2004; PINTO, 2014), e assim como a medula óssea tem origem do mesoderma embrionário. Em 2001 Zuck et al. isolaram pela primeira vez as células troncos mesenquimais do tecido adiposo. A partir disto, foi

demonstrado que além da facilidade na coleta, este tecido apresenta características como: seleção de um número maior de células et al., 2001), resistência à criopreservação (MARTINELLO et al., 2011), diferenciação em linhagens mesodermiais como: osteogênica, adipogênica, condrogênica e também miogênica (MILNER et al., 2018). Estas particularidades demonstraram o grande potencial para a utilização desta fonte na pesquisa clínica (BAJEK et al., 2016; VIEIRA et al., 2010; ZUK; BENHAİM; HEDRICK, 2004).

Apesar do tecido adiposo ser de origem mesenquimal há evidências de que é possível a diferenciação destas células em tecidos que não são de origem mesenquimal, como por exemplo o tecido nervoso (SEO et al., 2009; ZUK et al., 2002)., Tal fato amplia as possibilidades de aplicação terapêutica destas células.

Na medicina humana esta fonte é bastante utilizada, e pode ser considerada uma fonte ideal para a medicina regenerativa (SALER et al., 2017) e, assim como na veterinária, já existem aplicações clínicas descritas. Contudo são necessários mais estudos consistentes que confirmem este tipo de terapia (BAJEK et al., 2016).

O fato de as duas fontes já citadas anteriormente necessitarem de um procedimento cirúrgico exclusivo para coleta, sugeriu a possibilidade do isolamento de CTMs de anexos fetais. Estes tecidos estão sendo denominado como uma nova classe de células tronco, uma vez que suas células exibem características de multipotência e pluripotência, pois elas são consideradas menos diferenciadas (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE CONSIGLIO, 2011; IACONO; ROSSI; MERLO, 2015). Além disso exibem ótima potencialidade, propriedades imunomodulatórias, facilidade na obtenção e baixo custo (OLIVER-VILA et al., 2016).

As principais fontes com maior recrutamento de células tronco mesenquimais são a membrana amniótica, o líquido amniótico e o cordão umbilical (IACONO; ROSSI; MERLO, 2015). A expressão de marcadores das linhagens neuroectodérmicas e endodérmicas (LA ROCCA et al., 2009), sugerem que estas células apresentam características semelhantes as CT embrionárias e aumentam as possibilidades da utilização clínica, tanto em humanos, quanto em animais (MONTEIRO; NETO; CARLO, 2009).

Dentre estes tecidos podemos destacar a gelatina de Wharton (GW), também chamada matriz extravascular do cordão umbilical, que é um tecido gelatinoso conectivo localizado entre os vasos do cordão umbilical composto por células estromais semelhantes a miofibroblastos, fibras colágenas e proteoglicanos (KOBAYASHI; KUBOTA; ASO, 1998).

O primeiro estudo que identificou células semelhantes a fibroblastos obtidas da GW foi realizado em 1991 em cordão umbilical humano (MCELREAVEY; IRVINE, 1991), na sequência estudos evidenciaram que estas células possuíam características de CTMs (LU et al., 2006; SESHAREDDY; TROYER; WEISS, 2008; WANG et al., 2004; WEISS et al., 2006) e alta taxa de proliferação *in vitro* (FONG et al., 2010).

Actredita-se que as CTMs derivadas de gelatina de Wharton seriam uma fonte interessante para a terapia de cartilagem (PASCHOS; SENNETT, 2017). Em estudo *in vitro*, com esta fonte, Liu et al. (LIU et al., 2014a) observaram que estas células possuem características pré-condrócitas bem como secretam glicosaminoglicanos e colágeno tipo II em grandes quantidades quando cultivadas em meios indutores para a diferenciação condrogênica. Além disso se diferenciam em linhagens não mesodermas, como a linhagem neural (MITCHELL et al., 2003). Estas características ampliam as possibilidades terapêuticas destas células.

Diferenciação celular

Além da imunohistoquímica tradicionalmente utilizada para confirmar a diferenciação celular (ALIMPERTI et al., 2014; BAKSH; YAO; TUAN, 2007; CSAKI et al., 2007; KANG et al., 2012), este processo pode ser demonstrado através da expressão de genes associados a proteínas marcadoras relacionados à adipócitos (*PPAR γ* , *PPAR α* e *AdipoQ*) e a osteócitos (*OSC* e *RUNX2*) (NEUPANE et al., 2008; NTAMBI; KIM, 2000; XU et al., 2015).

Os genes da família PPAR (receptores ativados por proliferadores de peroxissomas) são expressos em níveis diferentes no tecido adiposo, e desempenham uma importante função na adipogênese (BRUN et al., 1996; LEMBERGER et al., 1996; TONTONNOZ; HU; SPIEGELMAN, 1995). O *PPAR α* está presente no tecido adiposo marrom e sua expressão está relacionada à oxidação de ácidos graxos, o *PPAR γ* está presente no tecido adiposo marrom e branco e sua expressão está relacionada ao

acúmulo lipídico e diferenciação adipogênica (POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012), porém sabe-se que os dois juntos desempenham um papel importante tanto no metabolismo lipídico como na diferenciação adipogênica (SCHOONJANS; STAELS; AUWERX, 1996). A adiponectina (*AdipoQ*) é sintetizada no tecido adiposo branco e é expressa durante o processo de diferenciação adipogênica *in vivo* e *in vitro* em CTMs do tecido adiposo (AMABLE et al., 2014b; HU; LIANG; SPIEGELMAN, 1996; NAJAR et al., 2018).

O RUNX2 é um fator de transcrição essencial para a diferenciação e maturação de osteoblastos, porém sua alta expressão pode inibir a diferenciação em osteoblastos (LEE et al., 1999; LIU et al., 2001; XU et al., 2015) e ainda regular a expressão do OSC (KOMORI et al., 1997). Já o OSC é exclusivamente expresso em osteoblastos e é essencial para iniciar e regular o processo de mineralização (DESBOIS; HOGUE; KARSENTY, 1994). Assim, estudos indicam que *RUNX2* e o OSC estão presentes na fase inicial e final, respectivamente, na diferenciação de osteoblastos (LEE et al., 2000; SONOMOTO et al., 2016; XU et al., 2015).

A presença de precursores neurogênicos, como a nestina (NES) já foi demonstrado em CTMs, e essa característica é importante para o sucesso da indução neuronal destas células (MONTZKA et al., 2009; WISLET-GENDEBIEN et al., 2012). Contudo a expressão do NES não necessariamente pode estar envolvida com a linhagem neurogênica, pois esta proteína pode ser expressa também por células epiteliais, fibroblastos durante a formação de novos vasos, podendo até ser considerada um importante marcador de CTMs (KISHABA; MATSUBARA; NIKI, 2010; WIESE et al., 2004; XIE et al., 2015).

O *GDNF* é membro da família do Fator de Crescimento Transformado (TGF) e é considerado um fator neurotrófico e associado à outros fatores podem promover a sobrevivência e o desenvolvimento de populações neurais específicas, além disso ele está sendo utilizado associado às CTMs principalmente para o tratamento de nervos periféricos, isquemia renal e em modelo experimental para lesões cerebrais (CHENG et al., 2010; JEZIERSKI et al., 2014; WANG et al., 2018; YAN et al., 2013). Recentemente foi descrito que CTMs-GW foram capazes de desenvolver efeitos neuroprotetores que pode estar associada a secreção de fatores tróficos como o *GDNF* (JI et al., 2018).

Apesar dos estudos estarem voltados para o sistema nervoso, foi descrito que o *GDNF* aumenta a secreção de fatores angiogênicos e mitogênico das células tronco, além de criar um ambiente de proteção e evitar os danos do estresse oxidativo (ROTA et al., 2012; SHI et al., 2007).

Apoptose Celular

A utilização de meio sintéticos e potencialmente agressivos para as células pode levar as células à um processo de apoptose. O gene *TP53* possui como principal função a proteção do material genético da célula, e sua expressão é estimulada por estresse celular como perigos à integridade do DNA, ativação oncogênica e estresse oxidativo, regulando a expressão de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2012; LEVINE; OREN, 2009; SIVIERO, 2013; VOUSDEN; PRIVES, 2009).

O indicador de estresse celular, Clusterina (CLU) está envolvida em diversos processos fisiológicos como morte celular, regulação do ciclo celular, adesão celular e estresse oxidativo, porém sua baixa expressão causa a parada do ciclo celular através da via P53 (SHIRASAWA et al., 2009; YANG; QIN, 2015).

O gene *BCL2L1* é conhecido pela característica anti-apoptótica, e estudos demonstram que o produto desse gene se mantém após aplicação clínica alogênica, tornando-o uma ferramenta promissora para minimizar falhas em procedimentos de transplantes de órgãos ou terapia celular autóloga (KOLLEK et al., 2017; MURPHY; PH, 2018).

Todo o processo de apoptose termina como a ativação das caspases, elas são expressas em todas as células de maneira inativa e sua ativação ocorre através de um estímulo apoptótico (BHOLA; LETAI, 2016). Dentre as caspases, a Caspase 3 é a efetora de todo este processo (BERGMANN; STELLER, 2010; DINITTO et al., 2010; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

O *C-Kit* (*Proto-Oncogene Tyrosine Kinase*) tem funções biológicas envolvidas na transição epitelial-mesenquimal durante o desenvolvimento embrionário. Este fator não é expresso no tecido mesenquimal adulto e sua expressão pode estar relacionada

com processos cancerígenos (LATIFI et al., 2011; NIETO et al., 1994; SAVAGNER; YAMADA; THIERY, 1997).

Frente a estes dados, a finalidade do presente experimento foi investigar a influência do SFB na proliferação celular e diferenciação de células tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo e gelatina de wharton nas linhagens adipogênica e osteogênica, bem como a expressão de genes relacionados à apoptose (*BCL2L1*, *CASP3*, *TP53* e *CLU*).

Bancos de Células tronco

As características das CTMs de: auto renovação, alta taxa de proliferação, diferenciação *in vitro* (LEE et al., 2004a, 2004b; LIU et al., 2011), imunomodulação, e o fato de expressarem antígenos de histocompatibilidade (MHC) classe I, mas não expressarem os de classe II, (KLYUSHNENKOVA et al., 2005; LE BLANC et al., 2003; MAJUMDAR et al., 2003; TYNDALL et al., 2007) indicam que elas são alternativas atraentes para a formação de bancos celulares, bem como para a aplicação alogênica.

Os bancos celulares são utilizados para o armazenamento de células, por curto ou longo tempo através da criopreservação (LECHANTEUR et al., 2016). A criopreservação possui como objetivo preservar o material vivo de maneira que ao ser reconstituído, se recupere com alto grau de viabilidade e integridade funcional, sem induzir toxicidade ao organismo (Masumoto et al., 2011). Para isso torna-se necessário a utilização de substâncias que fornecem uma proteção para as células, que são denominadas crioprotetoras.

Existem dois tipos principais de crioprotetores: intracelular, os quais penetram nas células e que previnem a formação de cristais de gelo e consequentemente a ruptura da células, dentre eles os mais estudados são o dimetilsofóxido (Me₂SO) e glicerol. Os crioprotetores extracelulares não penetram na membrana celular e minimizam a perda de água e danos de desidratação, pois formam uma película protetora ao redor das células, e os exemplos mais comuns são a hidroxietilstarch (HES) e polivinilpirrolidona (PVP) (Masumoto et al., 2011).

O Me2SO é o crioprotetor mais utilizado para células, pois apresenta os melhores resultados (DE LARA JANZ et al., 2012; NIKNEJAD et al., 2013), possui baixo custo e é pouco tóxico. Porém foram observadas reações tóxicas e efeitos adversos após e a indução à diferenciação para a linhagem neurogênica das células tratadas com ME2SO, esta toxicidade pode estar envolvida com a alta concentração do Me2SO (DAVIS et al., 1990; NEUHUBER et al., 2004; SYME et al., 2004).

Para obter melhor viabilidade e qualidade das células o Me2SO é associado ao soro fetal bovino (SFB) ou soro autólogo que atuam como reguladores da pressão osmótica e protege a membrana celular, minimizando os riscos que os cristais de gelo podem causar nas células no momento da criopreservação ou reconstituição da solução (FUJII et al., 2017; RENZI et al., 2012).

O SFB é obtido do sangue de fetos bovinos de aproximadamente 6 meses de gestação. O sangue é coletado, de forma asséptica, do coração do feto sem anticoagulante e através de centrifugações a fração líquida, sem as células vermelhas, fibrina e fatores de coagulação, é isolada e denominada de soro (HEMEDA; GIEBEL; WAGNER, 2014). Este mesmo procedimento também pode ser utilizado para a obtenção de soro autólogo (TEKKATTE et al., 2011).

Apesar de sua função não estar totalmente elucidada, sabe-se que é um suplemento essencial para o crescimento das CTMs, composto por altos níveis de fatores de crescimento, fatores nutricionais, hormônios e fatores aderentes (EAGLE, 1955; HEMEDA; GIEBEL; WAGNER, 2014; LEIST; MEYER; FIECHTER, 1990; MANNELLO; TONTI, 2007).

Contudo foi descrito que o ácido graxo, presente no SFB, podem influenciar positivamente a diferenciação adipogênica (DIASCRO et al., 1998), ou seja, ele pode induzir uma diferenciação espontânea de células cultivadas e criopreservadas com SFB, como foi observado em trabalho realizado pelo nosso grupo (Arruda et al., aceito para publicação). Desta forma a tendência seria de minimizar a utilização do SFB nos processos de cultivo (MAHMOUDIAN-SANI et al., 2017; SWAMYNATHAN et al., 2014; THIRUMALA; GIMBLE; DEVIREDDY, 2010) e criopreservação das células (MAIA et al., 2017; MATSUMURA; HYON, 2009).

Os primeiros relatos de transplante de células da medula óssea criopreservadas ocorreram na década de 60 de forma autóloga (MANNICK et al., 1960) e alogênica (STORB et al., 1969), utilizando o cão como modelo experimental. Na década de 80 iniciaram os transplantes autólogos e alogênicos de medula óssea humana criopreservada, que são realizados até hoje (JOHNSON et al., 1984; NEGRIN, 2000; SIMÕES et al., 2016; STIFF et al., 1987; VOSE et al., 2001).

Contudo a medula óssea é composta por uma pequena fração de CTMs e sua coleta requer habilidade técnica, e uma opção bastante atraente é o tecido adiposo que é um tecido abundante e pode ser coletado de forma simples em qualquer procedimento cirúrgico, demonstrando sucesso no processo de criopreservação por longos períodos (MARTINELLO et al., 2011; REQUICHA et al., 2012; ZUK P.A., ZHU M., MIZUNO H., HUANG J., 2001).

Outra fonte interessante para a formação de bancos são as obtidas das membranas fetais (membrana amniótica, líquido amniótico, cordão umbilical e sangue do cordão umbilical), uma vez que estes materiais são descartados após o parto.

Estudos com líquido amniótico, demonstraram sucesso na criopreservação e manutenção da proliferação, potencial de diferenciação, bem como ausência de alteração de cariótipo. O mesmo é demonstrado com células do sangue e do cordão umbilical e membrana amniótica (LEE et al., 2004a, 2005; LIU et al., 2011; NIKNEJAD et al., 2013; POLCHOW et al., 2012).

Em especial as CTMs-WJ tem sido descritas como uma fonte abundante e segura para estudos pré-clínicos e clínicos apresentando estabilidade genética, multipotencialidade de diferenciação e propriedade imunomoduladora (OLIVER-VILA et al., 2016).

Vale ressaltar que a fonte deve ser escolhida a partir do objetivo da aplicação clínica e não pela facilidade de obtenção do tecido, uma vez que as fontes podem apresentar diferenças imunofenotípicas e na capacidade de diferenciação (AL-NBAHEEN et al., 2013).

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Verificar a manutenção das características mesenquimais de células mantidas sob criopreservação por longo tempo, para a formação de bancos celulares, a partir de Gelatina de Wharton e Tecido Adiposo canino. Além disso, realizar um estudo microscópico e molecular do processo de diferenciação (adipogenica e osteogencia) induzido e não induzido, de CTMs expostas a diferentes concentrações de soro fetal bovino em cultivo *in vitro*.

Objetivos específicos:

Artigo 1

- Verificar o potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais, criopreservadas por longo tempo, obtidas de Gelatina de Wharton canina, através dos métodos de imunocitoquímica e expressão gênica;
- Verificar as características imunofenotípicas de células criopreservadas através da técnica de citometria de fluxo;
- Verificar a expressão de genes neurais em células obtidas de Gelatina de Wharton submetidas a diferenciação adipogênica e osteogênica.

Artigo 2

- Comparar as características de aderência ao plástico e curva de crescimento, de células cultivadas com 10% e 20% de SFB, originadas de duas fontes diferentes, o tecido adiposo e gelatina de wharton caninas;
- Investigar a influência de diferentes concentrações de SFB (10 e 20%) na diferenciação (adipogênica e osteogênica) e não induzidas;
- Investigar as influências do processo de diferenciação (adipogênica e osteogênica) na expressão gênica de CTMs-TA e CTMs-GW.

REFERÊNCIAS

AL-NBAHEEN, M. et al. Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 9, n. 1, p. 32–43, 2013.

ALIMPERTI, S. et al. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 4, p. 974–983, 2014.

AMABLE, P. et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 2, p. 53, 2014a.

AMABLE, P. R. et al. Gene expression and protein secretion during human mesenchymal cell differentiation into adipogenic cells. **BMC Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2014b.

BAJEK, A. et al. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 64, n. 6, p. 443–454, 2016.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **J.Cell Mol.Med.**, v. 8, n. 1582–1838 (Print), p. 301–316, 2004.

BAKSH, D.; YAO, R.; TUAN, R. S. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. **Stem Cells**, v. 25, n. 2, p. 1384–1392, 2007.

BALCI, D.; CAN, A. The Assessment of Cryopreservation Conditions for Human Umbilical Cord Stroma-Derived Mesenchymal Stem Cells towards a Potential Use for Stem Cell Banking. **Current Stem Cells Research & Therapy**, v. 8, p. 60–72, 2013.

BARLOW, S. et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. **Stem cells and development**, v. 17, n. 6, p. 1095–1107, 2008.

BERGMANN, A.; STELLER, H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. **Science Signaling**, v. 3, n. 145, 2010.

BHOLA, P. D.; LETAI, A. Mitochondria-Judges and Executioners of Cell Death Sentences. **Molecular Cell**, v. 61, n. 5, p. 695–704, 2016.

BRANDÃO, J. S. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in healthy equine superficial digital flexor tendon: A study of the local inflammatory response. **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 423–430, 2018.

BRUN, R. P. et al. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. **Genes and Development**, v. 10, n. 8, p. 974–984, 1996.

BYDŁOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 25–35, 2009.

CAMPAGNOLI, C. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2396–2402, 2001.

CARDOSO, C.; ARRUDA, A. C. F. Revisão O papel das células tronco na engenharia tecidual. **Ciências & Cognição**, v. 14, n. 3, p. 214–219, 2009.

CARDOSO, T. C. et al. Isolation, characterization and immunomodulatory-associated gene transcription of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells at different trimesters of cow pregnancy. **Cell and Tissue Research**, v. 367, n. 2, p. 243–256, 2017.

CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. C. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2012.

CHENG, F.-C. et al. Enhancement of regeneration with glia cell line-derived neurotrophic factor-transduced human amniotic fluid mesenchymal stem cells after sciatic nerve crush injury [RETRACTED]. **Journal of Neurosurgery**, v. 112, n. 4, p. 868–879, 2010.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1400–15, maio 2011.

CSAKI, C. et al. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: A biochemical, morphological and ultrastructural study.

Histochemistry and Cell Biology, v. 128, n. 6, p. 507–520, 2007.

DAVIS, J. M. et al. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. **Blood**, v. 75, n. 3, p. 781–6, 1990.

DE LARA JANZ, F. et al. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

DESBOIS, C.; HOGUE, D. A.; KARSENTY, G. The Mouse Osteocalcin Gene-Cluster Contains 3 Genes with 2 Separate Spatial and Temporal Patterns of Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 1183–1190, 1994.

DIASCRO, D. D. et al. High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 1, p. 96–106, 1998.

DINITTO, J. P. et al. Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-Kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance. **Journal of Biochemistry**, v. 147, n. 4, p. 601–609, 2010.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006.

EAGLE, H. Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. **American Association for the Advancement of Science**, v. 122, n. 3168, p. 501–504, 1955.

FONG, C. Y. et al. Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, n. 3, p. 391–401, 2010.

FRIEDENSTEIN, A. J. CHAILAKHJAN, R. K. LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet.**, v. 3, p. 393–403, 1970.

FUJII, S. et al. Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from cryopreserved umbilical cord blood cells. **Journal of clinical and experimental hematopathology**, v. 57, n. 1, p. 8, 2017.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129–139, 2010.

HEMEDA, H.; GIEBEL, B.; WAGNER, W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. **Journal of Cytotherapy**, v. 16, n. 2, p. 170–180, 2014.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10697–10703, 1996.

IACONO, E.; ROSSI, B.; MERLO, B. Stem cells from foetal adnexa and fluid in domestic animals: An update on their features and clinical application. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 3, p. 353–364, 2015.

JEZIERSKI, A. et al. Neuroprotective Effects of GDNF-expressing Human Amniotic Fluid Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 10, n. 2, p. 251–268, 2014.

JI, S. et al. Neuroprotection of Transplanting Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in a Microbead Induced Ocular Hypertension Rat Model. **Current Eye Research**, v. 00, n. 00, p. 1–11, 2018.

JOHNSON, F. L. et al. Bone-Marrow Transplantation in a Patient with Sickle-Cell Anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 311, n. 12, p. 780–783, 1984.

KANG, B. 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. v. 13, p. 299–310, 2012.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.

KIRK, K. et al. Human embryonic stem cell derived islet progenitors mature inside an encapsulation device without evidence of increased biomass or cell escape. **Stem Cell Research**, v. 12, n. 3, p. 807–814, 2014.

KISHABA, Y.; MATSUBARA, D.; NIKI, T. Heterogeneous expression of nestin in myofibroblasts of various human tissues. **Pathology International**, v. 60, n. 5, p. 378–385, 2010.

KLYUSHNENKOVA, E. et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: Immunogenicity, tolerance, and suppression. **Journal of Biomedical Science**, v. 12, n. 1, p. 47–57, 2005.

KOBAYASHI, K.; KUBOTA, T.; ASO, T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton ' s jelly Expression and localization of α -smooth muscle actin. **Early Human Development**, v. 51, p. 223–233, 1998.

KOLLEK, M. et al. Transient apoptosis inhibition in donor stem cells improves hematopoietic stem cell transplantation. **The Journal of Experimental Medicine**, p. jem.20161721, 2017.

KOMORI, T. et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 755–764, 1997.

KYURKCHIEV, D. et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 552, 2014.

LA ROCCA, G. et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: Differentiation potential and detection of new markers. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 131, n. 2, p. 267–282, 2009.

LATIFI, A. et al. Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 10, p. 2850–2864, 2011.

LE BLANC, K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, v. 31, n. 10, p. 890–896, 2003.

LECHANTEUR, C. et al. Clinical-scale expansion of mesenchymal stromal cells: A large banking experience. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2016.

LEE, J. M. et al. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. **International immunopharmacology**, v. 13, n. 2, p. 219–24, jun. 2012.

LEE, K.-S. et al. Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor beta 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 23, p. 8783–8792, 2000.

LEE, M. H. 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. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 114–125, 1999.

LEE, M. W. et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 1, p. 273–278, 2004a.

LEE, M. W. et al. Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. **International journal of hematology**, v. 81, n. 2, p. 126–30, 2005.

LEE, O. K. et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1669–1675, 2004b.

LEIST, C. H.; MEYER, H. P.; FIECHTER, A. Potential and problems of animal cells in suspension culture. **Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 1–2, p. 1–46, 1990.

LEMBERGER, T. et al. PPAR Tissue Distribution and Interactions with Other Hormone-Signaling Pathways. **Annual NY Academi Science**, n. 804, p. 231–251, 1996.

LEVINE, A. J.; OREN, M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 749–758, 2009.

LI, X. et al. Transplantation of hUC-MSCs seeded collagen scaffolds reduces scar formation and promotes functional recovery in canines with chronic spinal cord injury. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 43559, 2017.

LIU, G. et al. Osteogenic differentiation of GFP-labeled human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 63, n. 2, p. 125–128, 2011.

LIU, S. et al. Characteristics of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 2, p. 229–235, 2014a.

LIU, W. et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. **Journal of Cell Biology**, v. 155, n. 1, p. 157–166, 2001.

LIU, X. et al. Mesenchymal stem cells systemically injected into femoral marrow of dogs home to mandibular defects to enhance new bone formation. **Tissue engineering. Part A**, v. 20, n. 3–4, p. 883–92, 2014b.

LU, L. et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. **Haematologica**, v. 91, p. 1017–1026, 2006.

MAHMOUDIAN-SANI, M.-R. et al. Comparison of Three Types of Mesenchymal Stem Cells (Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord-Derived) as Potential Sources for Inner Ear Regeneration. **The International Tinnitus Journal**, v. 21, n. 2, p. 122–127, 2017.

MAIA, L. et al. Conditioned medium: a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v. 41, n. 3, p. 239–248, 2017.

MAJUMDAR, M. K. et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 10, n. 2, p. 228–241, 2003.

MALGIERI, A. et al. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: State of the art. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 3, n. 4, p. 248–269, 2010.

MANNELLO, F.; TONTI, G. A. Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, Feeder Layer, or Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium, o. **Stem Cells**, v. 25, n. 7, p. 1603–1609, 2007.

- MANNICK, J. A. et al. Autografts of Bone Marrow in Dogs After Lethal Total-Body Radiation. **Blood**, v. 15, p. 255–266, 1960.
- MARION, N. W.; MAO, J. J. Mesenchymal Stem Cells and Tissue Engineering. **Methods in Enzymology**, v. 420, n. 06, p. 339–361, 2006.
- MARTI, L. C. et al. O efeito imunomodulatório de células-tronco mesenquimais. **Einstein**, v. 9, n. 11, p. 224–228, 2011.
- MARTINELLO, T. et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 1, p. 18–24, 2011.
- MASSUMOTO, C.; MASSUMOTO, S. M.; AYOUB, C. A. **Células-Tronco: Como coletar, processar e criopreservar**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.
- MATSUMURA, K.; HYON, S. H. Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. **Biomaterials**, v. 30, n. 27, p. 4842–4849, 2009.
- MCELREAVEY, K. D.; IRVINE, A. I. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, n. 1, p. 29S, 1991.
- MILNER, D. J. et al. Myogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from porcine adipose tissue. **Cell and Tissue Research**, p. 1–16, 2018.
- MITCHELL, K. et al. Matrix Cells from Wharton's Jelly From Neurons and Glia. **Cell Transplantation**, v. 21, p. 50–60, 2003.
- MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; CARLO, R. J. D. Células-tronco mesenquimais. **Ciencia Rural**, p. 1–8, 2009.
- MONTZKA, K. et al. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: Misleading marker gene expression. **BMC Neuroscience**, v. 10, p. 1–12, 2009.
- MURPHY, W. J.; PH, D. Clinical Implications of Basic Research : Making a Better Hematopoietic Stem Cell — Timing Is Everything. **The new engl and journal of medicine**, v. 378, n. 1, p. 89–91, 2018.

NAALDIJK, Y. et al. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. **BMC Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 10, 2012.

NAJAR, M. et al. Aldehyde Dehydrogenase Activity in Adipose Tissue: Isolation and Gene Expression Profile of Distinct Sub-population of Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2018.

NEGRIN, R. S. Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, v. 6, p. 262–271, 2000.

NEUHUBER, B. et al. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, n. 2, p. 192–204, 2004.

NEUPANE, M. et al. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue engineering. Part A**, v. 14, n. 6, p. 1007–1015, 2008.

NIETO, M. A. et al. Control of Cell Behavior During Vertebrate Development by Slug , a Zinc Finger Gene. **American Association for the Advancement of Science Stable**, v. 264, n. 5160, p. 835–839, 1994.

NIKNEJAD, H. et al. Serum-free cryopreservation of human amniotic epithelial cells before and after isolation from their natural scaffold. **Cryobiology**, v. 67, n. 1, p. 56–63, 2013.

NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 2, p. 126–131, 2011.

NTAMBI, M. J.; KIM, Y.-C. Symposium: Adipocyte Function, Differentiation and Metabolism Regulation of Leptin Production in Humans. **J. Nutr**, v. 130, p. 3127–3131, 2000.

OKAMOTO, O. K.; CAMPOS, A. H. Perspectivas em terapia celular : células-tronco. **Einstein**, v. 2, n. 4, p. 355–358, 2004.

OLIVER-VILA, I. et al. Evaluation of a cell-banking strategy for the production of clinical grade mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly. **Cytotherapy**, v. 18, n. 1, p. 25–35, 2016.

PASCHOS, N. K.; SENNETT, M. L. Update on mesenchymal stem cell therapies for cartilage disorders. **World Journal of Orthopedics**, v. 8, n. 12, p. 853–860, 2017.

PINTO, W. D. J. a Função Endócrina Do Tecido Adiposo. p. 111–120, 2014.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 143, n. 1999, 1999.

POLCHOW, B. et al. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. **Journal of Trans**, v. 10, p. 1–17, 2012.

POULSEN, L. LA C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 6, p. 631–639, 2012.

REICH, C. M. et al. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study. **Veterinary research communications**, v. 36, n. 2, p. 139–48, jun. 2012.

RENZI, S. et al. Mesenchymal stromal cell cryopreservation. **Biopreservation and biobanking**, v. 10, n. 3, p. 276–281, 2012.

REQUICHA, J. F. et al. Effect of Anatomical Origin and Cell Passage Number on the Stemness and Osteogenic Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 4, p. 1211–1222, 2012.

ROTA, C. et al. Human Amniotic Fluid Stem Cell Preconditioning Improves Their Regenerative Potential. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 11, p. 1911–1923, 2012.

SALER, M. et al. hASC and DFAT, multipotent stem cells for regenerative medicine: A comparison of their potential differentiation in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2017.

SAVAGNER, P.; YAMADA, K. M.; THIERY, J. P. The Zinc-Finger Protein Slug

Causes Desmosome Dissociation, an Initial and Necessary Step for Growth Factor–induced Epithelial–Mesenchymal Transition. v. 137, n. 6, p. 1–17, 1997.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1302, n. 2, p. 93–109, 1996.

SEMEDO, P. et al. Papel imunossupressor e remodelador das células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de doença renal crônica. **Einstein**, v. 7, p. 469–479, 2009.

SEO, M. S. et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 181–187, 2009.

SESHAREDDY, K.; TROYER, D.; WEISS, M. L. Method to Isolate Mesenchymal-Like Cells from Wharton’s Jelly of Umbilical Cord. **Methods in Cell Biology**, v. 86, n. 08, p. 101–119, 2008.

SHI, H. et al. Glial cell line-derived neurotrophic growth factor increases motility and survival of cultured mesenchymal stem cells and ameliorates acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 294, n. 1, p. 229–235, 2007.

SHIRASAWA, T. et al. Deficiency of clusterin inhibits neointimal hyperplasia after vascular injury. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 16, n. 6, p. 772–781, 2009.

SIMÕES, B. P. et al. Allogenic bone marrow transplantation in sickle-cell diseases . **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 1, p. 16–22, 2016.

SIVIERO, F. **Biologia celular: bases moleculares e metodologia de pesquisa**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2013.

SONOMOTO, K. et al. Spontaneous differentiation of human mesenchymal stem cells on poly-lactic-co- glycolic acid nano-fiber scaffold. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–15, 2016.

STIFF, P. J. et al. Autologous Bone Marrow Transplantation Using Unfractionated Cells Cryopreserved in Dimethylsulfoxide an Hydroxyethyl Starch Without Controlled-Rate Freezing. **Blood**, v. 70, n. 4, p. 974–978, 1987.

STORB, R. et al. Transplantation of Allogenic Canine Bone Marrow Stored at -80°C in Dimethyl Sulfoxide. **Blood**, v. 33, n. 6, p. 918–923, 1969.

SWAMYNATHAN, P. 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 Research & Therapy**, v. 5, n. 4, p. 88, 2014.

SYME, R. et al. The Role of Depletion of Dimethyl Sulfoxide before Autografting: On Hematologic Recovery, Side Effects, and Toxicity. **Byology of Blood an Marrow Transplantation**, v. 10, p. 135–141, 2004.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231–241, 2008.

TEKKATTE, C. et al. “ Humanized ” Stem Cell Culture Techniques : The Animal Serum Controversy. **Stem Cells International**, v. 2011, p. 14, 2011.

THIRUMALA, S.; GIMBLE, J. M.; DEVIREDDY, R. V. Evaluation of Methylcellulose and Dimethyl Sulfoxide as the Cryoprotectants in a Serum-Free Freezing Media for Cryopreservation of Adipose-Derived Adult Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 4, p. 513–522, 2010.

TODOROV, P. et al. Comparative studies of different cryopreservation methods for mesenchymal stem cells derived from human fetal liver. **Cell Biology International**, v. 34, p. 455–462, 2010.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor γ . **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 5, n. 5, p. 571–576, 1995.

TYNDALL, A. et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: A review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. **Arthritis Research and Therapy**, v. 9, n. 3, p. 1–10, 2007.

VIEIRA, N. M. et al. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 3, p. 279–289, 2010.

VOSE, J. M. et al. Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with recurrent indolent non-Hodgkin's lymphoma. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 7, n. 12, p. 680–687, 2001.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 413–431, 2009.

WAN, C.-D. et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT**, v. 7, n. 1, p. 29–33, fev. 2008.

WANG, H.-S. et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem cells**, v. 22, n. 7, p. 1330–1337, 2004.

WANG, J. et al. Protective effect of GDNF - - engineered amniotic fluid- - derived stem cells on the renal ischaemia reperfusion injury in vitro. n. June 2017, p. 1–8, 2018.

WEISS, M. L. et al. Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells: Preliminary Characterization and Effect of Transplantation in a Rodent Model of Parkinson's Disease. **Stem Cells**, v. 24, n. 3, p. 781–792, 2006.

WIESE, C. et al. Nestin expression - A property of multi-lineage progenitor cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 19–20, p. 2510–2522, 2004.

WISLET-GENDEBIEN, S. et al. Mesenchymal stem cells and neural crest stem cells from adult bone marrow: Characterization of their surprising similarities and differences. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 15, p. 2593–2608, 2012.

XIE, L. et al. Characterization of Nestin, a Selective Marker for Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2015, 2015.

XU, J. et al. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. **American journal of translational research**, v. 7, n. 12, p. 2527–35, 2015.

YAN, Z.-J. et al. Neural Stem-Like Cells Derived from Human Amnion Tissue are Effective in Treating Traumatic Brain Injury in Rat. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 5, p. 1022–1033, 2013.

YANG, N.; QIN, Q. Apolipoprotein J: A new predictor and therapeutic target in cardiovascular disease? **Chinese Medical Journal**, v. 128, n. 18, p. 2530–2534, 2015.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-Tronco, a nova fronteira da medicina**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

ZUK, P. A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. December, p. 2372–2384, 2002.

ZUK, P. A.; BENHAÏM, P.; HEDRICK, M. H. Stem Cells from Adipose Tissue. In: **Handbook of Stem Cells**. [s.l: s.n.]. v. 2p. 425–447.

ZUK P.A., ZHU M., MIZUNO H., HUANG J., ET AL. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

Capítulo 2

Trabalho científico 1.

Trabalho enviado para a revista Cryobiology – Normas no endereço eletrônico:
<https://www.elsevier.com/journals/cryobiology/0011-2240/guide-for-authors>

Efeitos da criopreservação, por longo tempo, nas células tronco mesenquimais derivadas da gelatina de Wharton canina

[Effects of long-term cryopreserved storage on canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells]

**Isadora Arruda^{a*}, Bianca A. Monteiro^a; Renan A. Vígaro^b, Amanda J. Listoni^c,
 Elisa M. Peoltine^c, Ferrnanda C. Landim^a**

^a Universidade de São Paulo (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Distrito de Rubião Júnior, s/n. Botucatu, São Paulo, Brasil

^b Faculdade Marechal Rondon, Vicinal Dr. Nilo Lisboa Chayasco, s/n, São Manuel, São Paulo, Brasil.

^c Universidade de São Paulo (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu, Distrito Rubião Júnior, s/n. Botucatu, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente: Universidade de São Paulo (UNESP), Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular, Distrito de Rubião Júnior, s/n. Botucatu, São Paulo, Brasil.

Phone +55 14 3880 2140

E-mail adress: isadora.arruda@hotmail.com (I. Arruda)

Resumo

A facilidade de obtenção e isolamento tornam as células tronco mesenquimais derivadas da gelatina de Wharton do cordão umbilical (CTMs-GW) atrativas para a terapia celular. A possibilidade de criopreservação destas células é particularmente desejável, pois amplia a possibilidade de sua utilização na rotina clínica. Neste estudo, as CTMs-GW foram preservadas utilizando um método simples (Mr. Frosty) com 10% de Dimetilsulfóxido (Me₂SO) e 90% Soro Fetal Bovino (SFB) por longo tempo e

analisamos a manutenção da viabilidade por câmara de Neubauer, características imunofenotípicas por citometria de fluxo e manutenção do potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica por imunocitoquímica e reação qualitativa de cadeia polimerase em tempo real (RT-qPCR) e também a abundância gênica de *GDNF* e *NES* em células induzidas e não induzidas nas linhagens adipogênica e osteogênica. Após a reconstituição não houve diferença significativa na viabilidade, através da citometria observamos a expressão de características mesenquimais (CD44+, CD90+ e CD105+), além disso expressão CD34+ e MHCII+. O potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica e adipogênica foram confirmados por imunocitoquímica e abundância gênica de OSC, contudo não apresentou diferença significativa na abundância gênica de *AdipoQ*, *PPARα* e *RUNX2*. Os transcritos *GDNF* e *NES* expressaram em todas as amostras analisadas. Desta forma conclui-se que o protocolo utilizado para a criopreservação, e as condições de manutenção do material foram adequadas para a manutenção da viabilidade e potencial de diferenciação das CTMs-GW. A expressão imunofenotípica CD34⁺ e CD105⁺ associada à expressão gênica de *NES* e *GDNF* sugerem uma característica endotelial às CTMs-GW criopreservadas por longo tempo.

Palavras chave: Dimetilsulfóxido, criopreservação, diferenciação espontânea, fator neurotrófico derivado da glia

INTRODUÇÃO

As células tronco mesenquimais (CTMs) são obtidas de tecidos adultos de origem mesodermal, e possuem particularidades de células multipotentes. Quando isoladas apresentam crescimento rápido, com morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico, sendo capazes de se diferenciar *in vitro* em tecidos estromais como osso, cartilagem, gordura. Devido a sua atividade paracrina de modulação da resposta imune, e estímulo da proliferação de precursores endógenos, estas células vem sendo utilizadas para tratar lesões de medula espinhal [1–3], doenças auto imune [4,5], remodelação óssea [6,7], terapias cardíacas [8,9], demonstrando resultados promissores.

Dentre as fontes estudadas para obtenção de CTMs o cordão umbilical, apresenta vantagens, por ser um tecido rico em células estromais, e não apresentar entraves éticos, por ser considerado descarte após o nascimento. Assim como as CTMs

de outras fontes as CTMs de cordão umbilical apresentam multipotencialidade, ou seja, a capacidade de se diferenciar em diferentes tecidos, o que as tornam atraentes para utilização na terapia celular [10].

A obtenção, isolamento, cultivo e multiplicação das células do cordão umbilical é extremamente fácil e sua metodologia está muito bem estabelecida [11–14], no entanto, para a utilização na pesquisa e até mesmo na rotina clínica, requer a manutenção destas, em banco celulares. Para tanto há a necessidade de estudos para adequação de protocolos, para a manutenção a curto e longo prazo. Na literatura encontra-se descrito alguns protocolos já testados, a maioria deles utilizam o Me2SO como agente crioprotetor associado ou não, ao soro fetal bovino [15,16], e recentemente ao meio condicionado [17,18]. Porém sabe-se que além do protocolo da criopreservação, as condições de manutenção e o momento da reconstituição das células também é fundamental [19].

O objetivo do nosso trabalho, foi verificar a manutenção das características morfológicas e fenotípicas, bem como análise da diferenciação (*in vitro* e expressão genica) das CTMs-GW, submetidas a criopreservação e mantidas por longo período de tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu.

Obtenção das amostras

As amostras da matriz extravascular do cordão umbilical, também chamada de Gelatina de Wharton, foram obtidas de cadelas submetidas a cesarianas (aproximadamente 60 dias gestacionais). Os procedimentos foram realizados no centro cirúrgico do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP - Botucatu, onde os animais foram devidamente anestesiados, e sua coleta foi aprovada pelo Comitê de ética no uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária

e Zootecnia de Botucatu, sob o nº de protocolo: 94/2015 - CEUA, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

As amostras (n=5) foram mantidas em banco celular, em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C presente no Laboratório de Terapia Celular e Reprodução Avançada (Lança), no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Unesp/Botucatu. Foram utilizadas 5 amostras de gelatina de Wharton, em um delineamento inteiramente casualizado.

Isolamento e Cultivo

Os fragmentos de gelatina de Wharton foram lavados *em Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS - Gibco®), fracionados (digestão mecânica), com auxílio de uma pinça e um bisturi, e colocados em solução a 0,02% de collagenase Tipo 1 (Sigma) a temperatura de 37,5°C em banho termostático por aproximadamente 40 minutos.

A suspensão celular foi submetida à Força Centrífuga Relativa (FCR) 500 g por 10 minutos, formando um *pellet*, então o mesmo foi ressuspensionado em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose/F12* (DMEM/F12 - baixa glicose - Gibco®) com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco®), suplementado com antibióticos (1% de solução de Penicilina e Estreptomicina - Gibco®) e antimicótico (1,2% de solução de Anfotericina - Gibco®) e centrifugado novamente a FCR 500 g por 10 minutos para a retirada completa da solução de collagenase. O precipitado celular ressuspensionado em 5 mL do meio já citado, colocados em frascos de 25cm² (T25) e cultivados em estufa úmida com 5% de CO₂ em temperatura de 37,5°C. O primeiro meio de cultivo foi trocado após 48 horas, seguido de duas trocas semanais.

Criopreservação

Após a tripsinização, em primeira passagem, as células foram colocadas em criotubos contendo aproximadamente uma concentração de 5x10⁵ células/criotubo, com 1,5 mL de meio crioprotetor composto por 90% de SFB (Gibco®) e 10% de Dimetil Sulfóxido (Me₂SO - Sigma). Os criotubos foram acondicionados no contêiner criogênico (Mr. Frosty Nalgene™, Cat. 5100-001), e mantido por 24 horas no Ultra Freezer -80°C (Thermo Scientific – Forma 8800 Series), resfriando gradualmente as células a aproximadamente - 1°C por minuto. Em seguida os criotubos foram colocados no nitrogênio líquido (-196°C), e mantidos até o momento das análises (Figura 1).

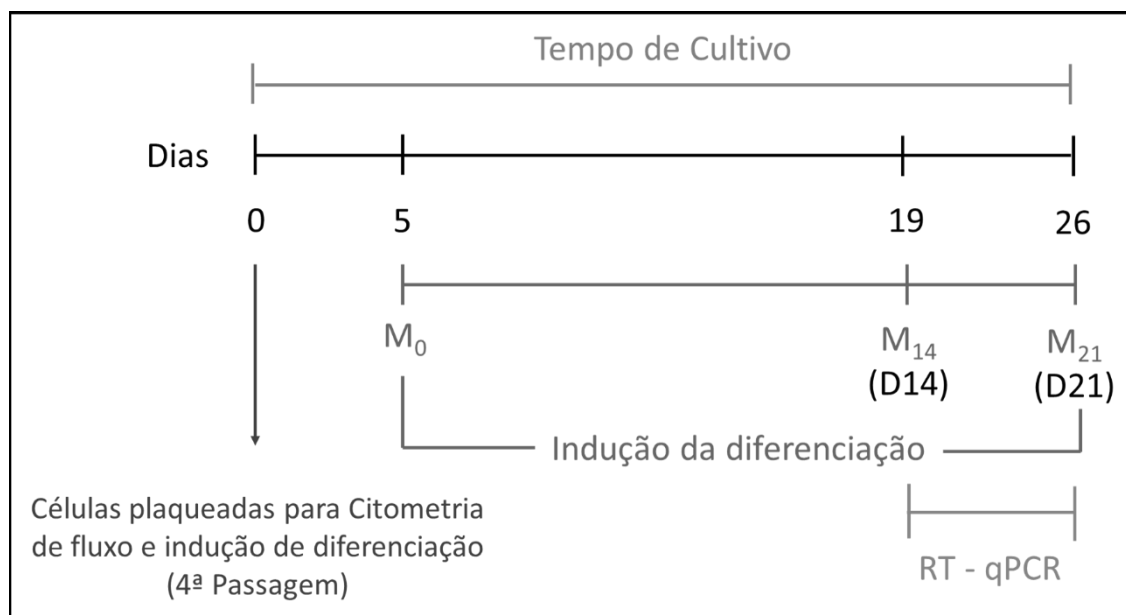


FIGURA 1. Ilustração Esquemática do tempo de cultivo das CTMs-GW, indicando o momento em que cada análise foi realizada. Dias = total de dias utilizados em cultivo, onde 0 é o dia em que as células foram plaqueadas e 26 o último dia de cultivo. No quinto dia de cultivo, denominado de M_0 , os meios basais foram substituídos por meios de indução adipogênica e osteogênica. O 19º dias de cultivos, denominado de M_{14} ou Grupo D14, as amostras induzidas para a linhagem adipogênica foram fixadas e coradas com Oil Red. No 26º dias de cultivo, denominado de M_{21} 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.

As amostras foram reconstituídas, utilizando o protocolo descrito por Chaytor et al. [19], visando a melhor viabilidade celular. Foi então realizado o teste de viabilidade com a técnica de exclusão do Azul de Trypan (Gibco®) e após esta as células foram plaqueadas em garrafas T75 (Sarstedt, Alemanha) e para a futura realização da citometria de fluxo em quarta passagem.

O ensaio de diferenciação, bem como os controles negativos, foram realizados em quarta passagem, e para isso as células foram semeadas em placas com 24 poços, na concentração de 3×10^3 célula/poço.

Dos 10 poços, 6 foram utilizados para o tratamento de indução da diferenciação e os demais foram utilizados para o tratamento controle. As induções começaram a partir do 5º dia de cultivo, assim o dia seguinte ao início da indução foi denominado M_1 . As amostras induzidas para diferenciação adipogênica foram mantidas em cultivo por 19 dias (M_{14}) e as induzidas para diferenciação osteogênica foram mantidas por 26 dias (M_{21}) até serem corados. Para melhor descrever os resultados o M_{14} foi denominado de Grupo D14 e o M_{21} foi denominado Grupo 21.

Dois poços das células induzidas a diferenciação (1 do D14 e 1 do D21) e dois do controle negativo (1 do D14 e 1 do D21) não foram corados e foram submetidos ao RT-qPCR através da técnica do Biomark *HD Real-Time PCR system* (Fluidigm, USA).

Diferenciação

Diferenciação Adipogênica e controle (Grupo D14)

No quinto dia de cultivo, o meio basal, foi substituído por meio de indução adipogênica (StemPro – Adipogenesis Kit - Gibco®), exceto nos controles negativos onde foi mantido o meio basal. Os meios dos dois tratamentos (indução e controle) foram trocados a cada três dias até completarem 14 dias (M₁₄), quando as diferenciações foram comprovadas com o Oil Red (Sigma), que marcaram ou não, em vermelho, as gotículas lipídicas no citoplasma celular. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris, que marcou, em roxo, o núcleo celular.

Diferenciação Osteogênica e controle (Grupo D21)

No quinto dia de cultivo, o meio basal foi substituído por meio de indução osteogênica (StemPro – Osteogenesis Kit - Gibco®), exceto os controles negativos que foram mantidos no meio basal, e os meios dos dois tratamentos (indução e controle) eram trocados a cada três dias até completarem 21 dias (M₂₁), neste período as diferenciações foram comprovadas com a marcação utilizando o Alizarin Red (Sigma), que marcou ou não em vermelho a produção de uma matriz extracelular rica em cálcio.

Análise das diferenciações

Após a coloração (Oil Red e Alizarin Red) e imunocitoquímica, as placas foram fotografadas em microscópio invertido (Leica) com o uso do programa de análise de imagem LAS 4.0 (Leica).

Citometria de Fluxo

A caracterização imunofenotípica das CTMs-GW foi realizada no momento da quarta passagem das células, após a reconstituição destas. Para tanto, utilizou-se a marcação celular com anticorpos de superfície caninos através da análise por citometria de fluxo, utilizado o protocolo padrão sugerido pelo fabricante de cada anticorpo. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD LSFFortessa™, para tanto foram utilizados os seguintes anticorpos, todos espécie específicos (Tabela 1).

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

Anticorpos	Fabricante	Código	Fluorocromo	Diluição
CD44	AbD Serotec	MCA1041A488	AlexaFluor®488	1:100
CD90	eBioscience	YKIX337217	PE	1:100
CD105	Biorbyt	orb102264	FITC	1:100
CD34	AbD Serotec	MCA2411F	FITC	1:100
MHC-II	AbD Serotec	MCA1044F	FITC	1:100

Análise Quantitativa PCR em Tempo Real

O procedimento de PCR em tempo real foi realizado no Laboratório Fitofarmatec – Departamento de Farmacologia - IBB-UNESP-Botucatu/SP, com a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira.

A análise quantitativa da reação em cadeia polimerase em tempo real (qTR-PCR) foi realizada nas células induzidas a diferenciação adipogênica e seu controle negativo (Grupo D14) e osteogênica e controle negativo (Grupo D21) e avaliou a expressão dos genes descritos a seguir. Os ensaios utilizados foram *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, USA) todos específicos para cão, que estão descritos abaixo (Tabela 2).

Para a extração do RNA total, foi realizado com o TRIzol Reagente (Life Technologies - EUA) seguindo as recomendações do fabricante e ao fim dissolvido em 30µL de água livre de RNA. A concentração de RNA foi determinada através da análise de densidade óptica das amostras em espectrofotômetro - NanoDrop (NanoDrop™, Thermo Fisher Scientific, USA), nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. O grau de pureza das amostras foi dado pela relação A260/A280, considerando o RNA puro, ou seja, livre de contaminantes, quando compreendida entre $1,8 \leq \text{razão} \leq 2,2$ e mantido em Freezer -80°C até a próxima etapa. As amostras (400ng) foram tratadas com DNase (Deoxyribonuclease I - Life Technologies) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. Para a Transcrição do RNA em cDNA utilizado o Kit de transcrição reversa *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®) a ordem e as etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante dos reagentes, obtendo um volume final de 20 µL.

TABELA 2. Ensaios *TaqMan*[™] *Gene Expression Assay* (Applied Biosystems®) utilizados para o RT-qPCR.

Genes	Identificação
Runx2 (Fator de transcrição relacionado ao Runt-2)	cf02694691_m1
OSC (Osteocalcina)	cf02623891_g1
PPARα (Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas– α)	Cf02682567_m1
AdipoQ (Adiponectina)	cf02624380_m1
PPARγ (Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas– γ)	cf02682567_m1
GFAP (Proteína ácida fibrilar glial)	cf02655694_m1
GDNF (Fator neurotrófico derivado da glia)	cf02691052_s1
NES (Nestina)	cf02706322_g1
B2M (Beta2-Microglobulina)	cf0265079_m1
RPL13 (Proteína ribossomal L13)	cf02666375_g1
GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)	cf04419463_gH

PCR em tempo real Biomark HD 96.96 (Versão Beta)

O método RT-qPCR Biomark é multiplex em sistema micro fluídico da 50 Fluidigm, no qual é analisado um painel de genes, dentre ele, nossos genes de interesse, avaliando até 96 amostras de uma única vez, neste experimento foram utilizadas 16 amostras. As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real (*TaqMan*[™] *Gene Expression Assay*, Applied Biosystems) para a espécie canina.

Antes do ciclo térmico do qPCR, cada amostra foi submetida à uma sequência específica de pré-amplificação da seguinte forma: 1,25 μ L de mistura de ensaios (*TaqMan assay* – preparado uma mistura de todos os ensaios com tampão de DNA numa concentração final de 0,2x), 2,5 μ L *TaqMan PreAmp Master Mix* (Applied Biosystems, USA), e 1,25 μ L de cDNA. As reações foram ativadas a 95°C por 10 minutos seguido por 10 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e amplificação a 60°C por 4 minutos. Estes produtos pré-amplificados foram diluídos 7 vezes antes da análise de RT-qPCR.

Cada amostra preparada para o termociclador do qPCR era composta por 2,25 μ L de cDNA pré-amplificado diluído 2,5 μ L de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (2X, Applied Biosystems, USA) e 0,25 μ L de 20X *GE Sample Loading Reagent* (Fluidigm,

USA). A solução de ensaio (genes) consistia em 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) e 2,5µL de 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm, USA).

Um 96.96 *Dinamic Array*TM *Integrated Fluidic Circuits Chip* (Fluidigm, USA) foi utilizado para colocar as amostras e os genes, de um lado foi adicionado 5µL da solução com amostra e do outro 5µL de solução com os ensaios, e então o ciclo térmico do qPCR foi realizado no sistema *Biomark HD* (Fluidigm, USA) utilizando o protocolo do TaqMan GE 96x96, que consiste do *Thermal Mix* (50°C por 2 minutos, 70°C por 20 minutos e 25°C por 10 minutos), seguido por um estágio de início quente (50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, e então por 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) e finalizando com extensão (60°C por 60 segundos).

Os ensaios *TaqMan* utilizados neste estudo foi selecionado considerando a análise de transcrição dependentes do DNA relacionados principalmente nas características de células tronco mesenquimais, embrionárias e diferenciação celular. Foram obtidos através do programa do Biomark (*Biomark Real Time PCR Analyzed*, Fluidigm, USA) valores de Cq das amostras e respectivos genes analisados. Os genes referência foram selecionados a partir de uma análise de estabilidade, dos gene o teste Cq comparativo (Teste de normalidade das amostras onde: $p > 0,05$ era realizado teste ANOVA para comparação de médias identificando os genes, $p < 0,05$ foi realizado uma transformação dos dados em log e então submetidos ao teste de normalidade, para a amostras com distribuição normal foi feito os teste ANOVA com os dados em log, para amostras com distribuição não considerada normal (não paramétrica) foi realizado o teste de Wilcoxon com os dados originais) no programa JMP® 7.0.

Desta forma, identificou-se uma homogeneidade dos dados através do NormFinder, e a média geométrica de todos os genes endógenos foram utilizados como referência: B2M (β2-Microglobulina – Gene ID: 100855741), RPL13 (Proteína Ribossomal L13 – Gene ID: 479612) e GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase – Gene ID: 403755).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizado o programa *Statistical Analysis System* (SAS - Versão 9.4, 2012), sendo primeiramente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias por teste de Welch. Estes

dados foram submetidos à análise de variância, pelo PROC MIXED, que contemplará como causas de variação de efeito fixo os tratamentos (não induzido e induzido).

RESULTADOS

Viabilidade e Reconstituição das CTMs derivadas de Gelatina de Wharton

As células foram criopreservadas com viabilidade de $96 \pm 1,5\%$ (Média $\pm$ Erro Padrão da média) e após a reconstituição não foram observadas diferenças significativas ($p=0,3188$) entre os momentos. As células foram então plaqueadas em garrafas e todas as amostras apresentaram as características de aderência ao plástico e formato fibroblastóide no dia seguinte a reconstituição.

Citometria de Fluxo

Na a análise imunofenotípica realizada após a criopreservação, o CD44 apresentou boa marcação positiva, com média de $82,0 \pm 7,4\%$, a marcação do CD90 foi positiva em $54,6 \pm 12,2\%$ das células e o CD105 apresentou-se fracamente positivo com média de somente $19,7 \pm 3,4\%$ de marcação. Os marcadores considerados negativos CD34 e MHC II também apresentaram positiva ($>3\%$), $18,7 \pm 9,8\%$ e $12,6 \pm 4,6\%$, respectivamente, mas em baixa incidência.

Diferenciação induzida Osteogênica e Adipogênica

Adipogênica

O dia seguinte ao início da indução foi denominado de M₁ (Figura 1 - A) e a partir deste momento as células foram fotografadas todos os dias, com a finalidade de observar as mudanças morfológicas.

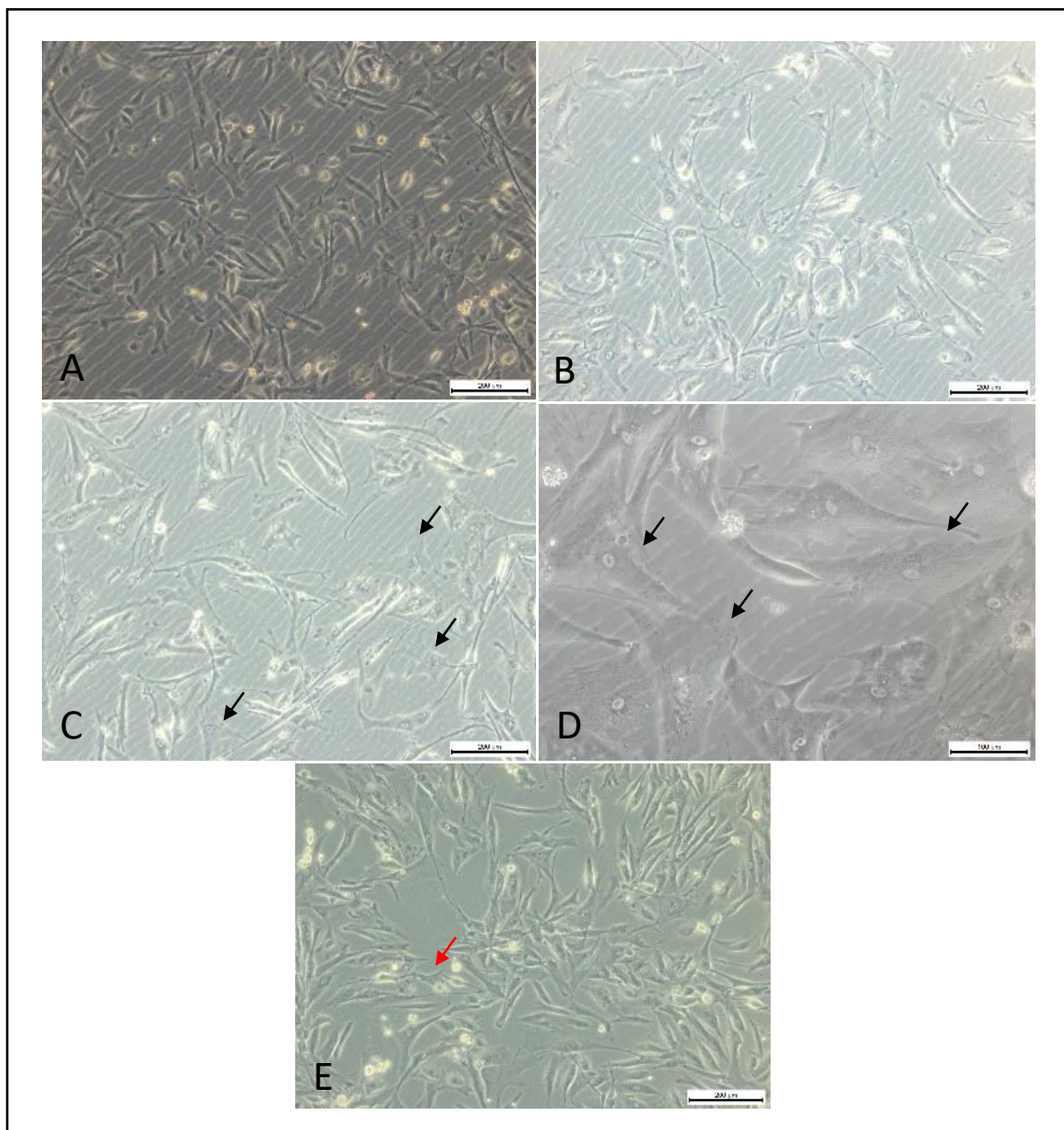


FIGURA 2. Microscopia de luz de Células tronco Mesenquimais derivadas de Gelatina de Wharton (CTM-GW), submetidas a diferenciação adipogênica, M₁ a M₄ em formato fibroblastóide (A e B, respectivamente), a partir de M₅ aumento no tamanho do citoplasma (C e D – setas pretas) e a partir do M₉ aparecimento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

Até o quarto dia de indução (M₄) (Figura 1. B), as células apresentam formato fibroblastóide característico. A partir do quinto dia (M₅) de indução adipogênica pequenas alterações morfológicas começaram a ser observadas. As células adquiriram um aspecto mais achatado e foi observada uma dilatação da área citoplasmática próximo ao núcleo (Figura 1. C e D).

A partir do 9º dia de indução adipogênica foi possível ver células em formato estrelado (Figura 1. E – Seta vermelha), com muitos prolongamentos citoplasmáticos.

Ao final dos 14 dias de diferenciação (M_{14}), as células foram coradas e apresentaram marcação adipogênica positiva (Figura 2. A) com presença de gotículas de gordura em seu citoplasma, localizadas principalmente na região perinuclear.

Paralelamente ao grupo induzido foram cultivadas células que não foram tratadas com as substâncias indutoras (controle). Ao final dos 14 dias de cultivo, estas células também foram marcadas com Oil Red e apresentaram a presença de gotículas de gordura semelhantes as encontradas no grupo tratado (Figura 2. B).

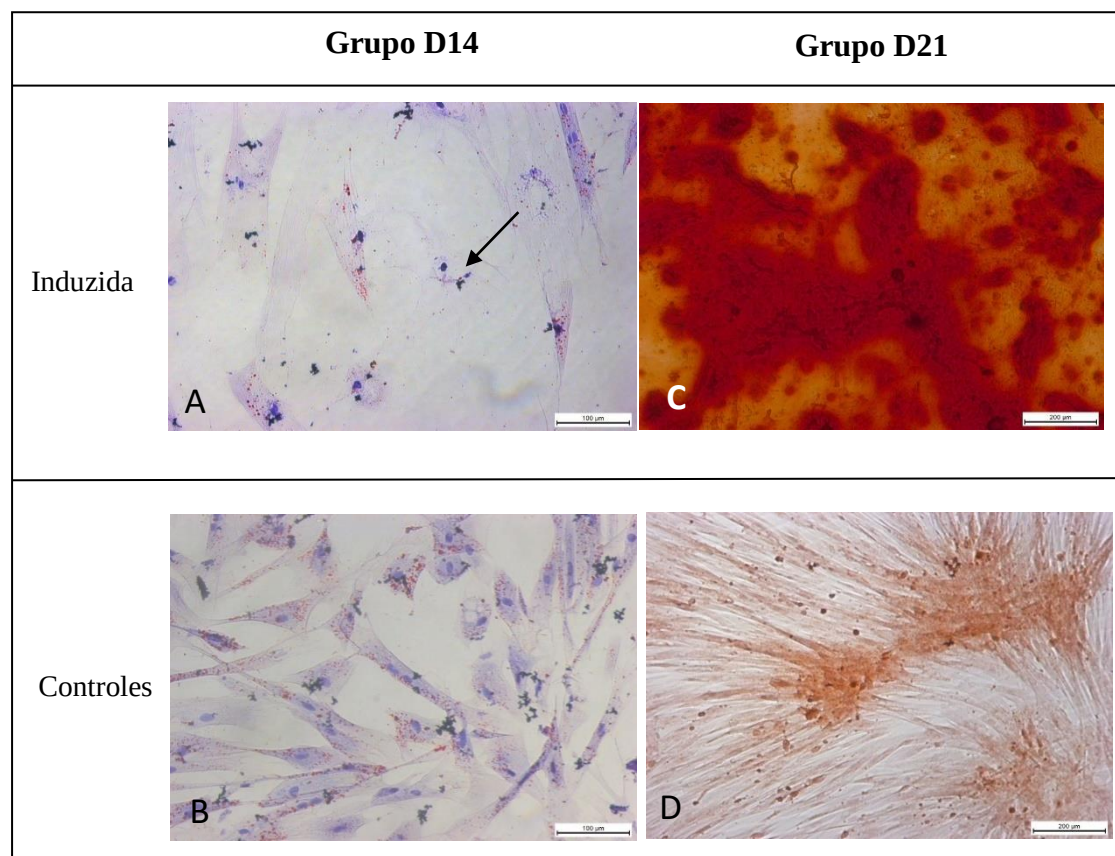


FIGURA 3. Microscopia de luz – Grupo D14 - Células tronco Mesenquimais derivadas de Gelatina de Wharton (CTM-GW), submetidas a indução adipogênica Grupo D14 (A), onde a seta indica célula em formato de neurônios, e controle Grupo D14 (B) corados com Oil Red (A e B), confirmando a diferenciação na linhagem 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).

Osteogênica

As células induzidas para diferenciação osteogênica começam a apresentar mudança morfológica a partir do sétimo dia de indução (Figura 3. A). Foi possível observar espaços mais amplos entre as células (Figura 3. A). A partir deste momento começou a aparecer um acúmulo de material esbranquiçado que se assemelhava a trabéculas (Figura 3. B e C). A quantidade deste material continuou aumentando até M_{21}

(Figura 3. D). As células foram coradas com o *Alizarin Red* e apresentaram marcação positiva para depósito de cálcio (Figura 2. C).

Também neste caso foram plaqueadas células, as quais foram cultivadas sem a adição dos agentes indutores. Os 21 dias de cultivo, foi realizada a marcação com *Alizarin Red* e não foi detectada a presença de matriz extracelular rica em cálcio (Figura 2. D).

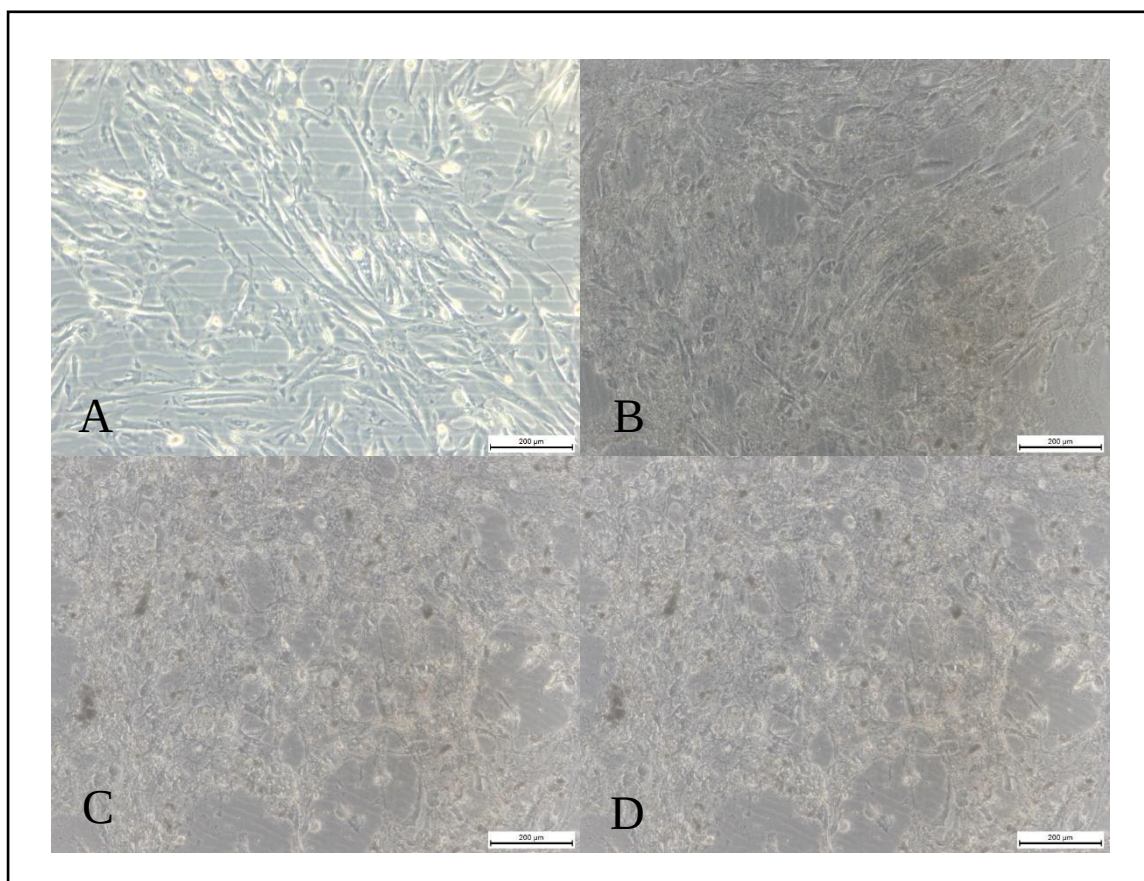


FIGURA 4. Microscopia de luz de Células tronco Mesenquimais derivadas de Gelatina de Wharton (CTM-GW), submetidas a indução osteogênica. Espaçamento entre as células (A), início de formação de acúmulos esbranquiçados, em forma de trabéculas (B e C), que se intensificam (D). Escala: 200µm (A, B C e D).

Resultados do RT-qPCR

Para melhor visualizar os resultados, os dados de todos os genes analisados podem ser observados na Tabela 3, demonstrando a média e EPM (Erro Padrão da Média) de cada tratamento (Controle e Induzido).

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

Grupos	Genes	Tratamento		EPM [#]	Probabilidade*
		Controle	Induzido		
D14	<i>AdipoQ</i>	0,000049	0,001400	0,000702	0,1671
	<i>PPARα</i>	0,00011	0,00020	0,0001	0,5602
	<i>PPARγ</i>	0,00	0,00	**	**
	<i>GDNF</i>	0,99	0,99	0,00081	0,4028
	<i>NES</i>	0,007112	0,00066	0,001526	0,0243*
	<i>GFAP</i>	0,00	0,00	**	**
D21	<i>Runx2</i>	0,01145	0,008065	0,003324	0,4987
	<i>OSC</i>	0,006720	0,06163	0,027240	0,0368*
	<i>GDNF</i>	0,006961	0,01522	0,005354	0,3174
	<i>NES</i>	0,004413	0,002355	0,001600	0,3981
	<i>GFAP</i>	0,00	0,00	**	**

[#]Erro Padrão da Média, *Efeito significativo para análise de variância quando $p < 0,05$, **não foram calculados (genes não expressos).

Genes relacionados à linhagem adipogênica: AdipoQ, PPARα e PPARγ

Foi observado uma diferença numérica entre os transcritos *AdipoQ* (controle e induzido) e *PPARα* (controle e induzido), onde nas amostras tratadas a expressão foi maior, porém não havendo significância estatística ($p > 0,05$). Em relação ao *PPARγ* não foi observada expressão (Tabela 3).

Genes relacionados à linhagem osteogênica: Runx2 e Osteocalcina

O gene *Runx2* foi expresso em ambos os tratamentos, não apresentando diferença significativa entre eles ($p > 0,05$), porém o gene *OSC* foi significativamente mais expresso nas células induzidas ($p < 0,05$), indicando que houve diferenciação para osteoblastos.

Genes relacionados à linhagem neurogênica: GDNF, NES e GFAP

Nas amostras do grupo de diferenciação adipogênica o gene *GDNF* se expressou de forma semelhante no grupo tratado e controle, e não apresentando diferença significativa ($p>0,05$), já o *NES* apresentou-se de forma mais expressiva e significativa ($p<0,05$) no grupo controle.

Da mesma maneira, no grupo de diferenciação osteogênica a expressão do *GDNF* foi observada tanto no grupo controle como no tratado, mas com maior expressão numérica nas células induzidas. Já o *NES* foi observado em maior quantidade nas células do grupo controle, mas sem diferença significativa ($p>0,05$). O *GFAP*, que é expresso em neurônios maduros, não foi expresso pelas CTMs-JW em cultivo, independente do tratamento.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado que o armazenamento de CTMs –GW por longo tempo em bancos criobiológicos não influencia sua viabilidade e potencial de diferenciação *in vitro*.

Sabe-se que a criopreservação a longo prazo, é a melhor forma de preservar células ou tecidos viáveis para futura utilização, ou para a formação de bancos para utilização de forma alogênica. No entanto, por melhor que seja o protocolo de criopreservação, é esperado que ocorram danos aos tecidos armazenados. Além disso, a manutenção das amostras por longos períodos depende de um manejo adequado dos containers criobiológicos de forma às células não serem submetidas, nem mesmo a pequenas variações de temperatura.

A solução crioprotetora também é um fator fundamental na criopreservação de tecidos e células e, portanto, deve ser cuidadosamente selecionada. O crioprotetor tradicionalmente utilizado para criopreservação de células somáticas é o Me2SO [20–22] e alguns trabalhos sugerem que a adição de SFB favorece a qualidade da célula após a criopreservação de médio a longo prazo [17,23]. Desta forma, no presente experimento foi utilizado o meio crioprotetor composto por 90% de SFB e 10% de Me2SO, de acordo com o encontrado em outros estudos [17,20,24]. Este protocolo resultou em boa qualidade da preservação, não acarretando em perda da viabilidade celular após o aquecimento, quando comparado ao mesmo grupo de células em seu

estado fresco. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura em protocolos com 10% de Me2SO para criopreservação de longo prazo [20,24,25].

De acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular [36] [26] o CD34 é um marcador de células progenitoras hematopoiéticas, mas também é expresso em células endoteliais (vasos de pequeno calibre) e fibroblastos embrionários [27] não devendo ser expresso por CTMs [14,28–32]. Esta característica foi demonstrada por nosso grupo em CTMs-GW frescas e criopreservadas por curto tempo (ARRUDA et al., no prelo). Apesar disso, após longo tempo de criopreservação foi possível observar que a células passaram a expressar, fracamente, este fator. Resultados semelhantes ao deste experimento foram relatados por Walecka et al. [34] em estudo comparativo (células frescas x cultivadas *in vitro*) e sugeriram que as células derivadas da GW possuem potencial de expressão do CD34 tanto *in vivo* como após o cultivo *in vitro*. De fato, já foi descrito em CTMs de tecido adiposo, subpopulações celulares CD34+ e CD146+ (células hematopoiéticas e pericitos respectivamente, ambos envolvidos na angiogênese) [35]. Apesar deste estudo utilizar células de uma fonte diferente a característica angiogênica da população de CTMs-GW não pode ser descartada.

O CD105 é um marcador de células endoteliais em proliferação [36] assim como está relacionado à processos de neovascularização tumoral [37–39]. Além disso, é um dos marcadores estabelecidos como expresso por células mesenquimais [26] devido à origem mesenquimal dos vasos sanguíneos [40] é amplamente demonstrado na literatura em CTMs frescas [14,41,42] e criopreservadas [43,44]. Essa característica também foi observada no nosso trabalho.

O MHC II (HLA-DR) é uma molécula presente nas células que se ligam aos receptores das células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs - células dendríticas, macrófagos e células B) que ativam as células T desencadeando uma resposta imune [45]. A ausência de expressão do MHCII [44,46] bem como suas moléculas co-estimulatórias [47] em CTMs, demonstram que CTMs não são identificadas pelo sistema imune, tornando-as atrativas para a terapia alogênica, uma vez que a necessidade de imunossupressão do paciente é minimizada [48].

Esta característica também foi observada por nosso grupo (ARRUDA et al., no prelo) em CTMs-GW caninas frescas e criopreservadas por curto tempo, contudo, após longo tempo de criopreservação, algumas células passaram a expressar o MHCII. Este

fato também já foi relatado em outras espécies [49–51]. Fisiologicamente a expressão de MHC II nas APCs é estimulada pelo Interferon Gama (INF γ), que é uma glicoproteína produzida principalmente por linfócitos, porém sabe-se que células de divisão rápida ou tratadas com o INF γ podem expressar o MHC II [52] e mesmo assim inibir a proliferação de linfócitos [53], contudo são necessários estudos específicos com nossa linhagem celular na ativação de linfócitos para confirmar esta características.

Considerando o potencial de diferenciação nas linhagens adipogênica e osteogênica, este foi mantido após o período de criopreservação, característica já evidenciada na literatura [43,49]. A análise dos grupos controle, que foram cultivados por tempos iguais, mas sem a adição dos agentes indutores de diferenciação mostrou que não houve diferenciação espontânea para a linhagem osteogênica.

Os genes *RUNX2* e *OSC* estão envolvidos na diferenciação osteogênica, o *RUNX2* é essencial para a diferenciação e maturação de osteoblastos [54], porém sabe-se que sua expressão é reduzida significativamente durante o processo de diferenciação em osteoblastos maduros [55]. No nosso experimento a expressão do *RUNX2* foi baixa, mas não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e tratado. Por outro lado, a maior expressão do *OSC* nas amostras tratadas com indutores osteogênicos indicam a diferenciação das CTMs em osteoblastos maduros [56]. Este fato foi confirmado pela observação da presença do depósito extracelular de cálcio marcado pelo *Alizarin Red*. Entretanto, os osteoblastos são células de origem mesenquimal que ainda não terminaram seu processo de diferenciação [57] e para confirmação do completo processo de diferenciação seria interessante a análise dos genes *DMP-1* e *MEPE*, para identificação de características de osteócitos [56].

Quando comparamos os grupos controle e tratado para diferenciação adipogênica observamos a presença de gotículas de gordura no citoplasma de células de ambos os grupos. Esta característica também já havia sido observada em experimento anterior realizado por nosso grupo (Arruda et al., aceito para publicação) e também foi relatada por Polchow et al. [58] em CTMs criopreservadas e pôr [59] em CTMs cultivadas *in vitro* por muito tempo. De fato, a análise molecular revelou uma discreta expressão de genes da linhagem adipogênica em ambos os grupos.

Já foi descrita a expressão do *AdipoQ* em células induzidas para diferenciação adipogênica [60], concordando com nossos resultados. A abundância gênica dos *AdipoQ* e *PPAR α* , nas células tratadas, sugere que elas estão em processo de

diferenciação inicial [61], contudo a ausência de expressão do *PPAR γ* , indica que estas células não são adipócitos [62,63].

Algumas das células submetidas a diferenciação adipogênica passaram a apresentar uma morfologia estrelada, com longos prolongamentos, após 14 dias em cultivo. O fenótipo dessas células apresenta semelhança morfológica com as imagens obtidas após indução neural realizada por Mitchell et al. [49], porém apresentaram expressão negativa para o *GFAP* que é expresso em neurônios maduros, independente do tratamento. Estes resultados diferem dos obtidos por Cardoso et al. [64] que observaram a expressão deste gene em CTMs não induzidas de gelatina de Wharton obtidas de todas as fases gestacionais de fêmeas bovinas.

Em células progenitoras neurais Teixeira et al. [65] observaram que o meio condicionado por CTMs-GW foi capaz de modular a proliferação e diferenciação de células progenitoras neurais, resultados também encontrados por outros autores [66,67]. Isso pode acontecer, pois as CTMs secretam alguns fatores neurotróficos que permanecem no meio condicionado, dentre eles os mais importantes são a nexina derivada da glia (GND) [66], o fator de crescimento fibroblástico (bFGF) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) [68], tais substâncias estão envolvidas na indução neural [69], e também com a atividade pró angiogênica [70,71].

No nosso trabalho as células utilizadas eram CTMs-GW e não células progenitoras neurais. Diversos estudos mostram que as células de origem mesenquimal possuem o potencial para a diferenciação neural [28,72]. De fato, no nosso trabalho a expressão de genes característicos de células neurais (*NES* e *GDNF*) foi observada tanto nos grupos controle como induzidos, para diferenciação adipogênica e osteogênica. No entanto, também já foi demonstrado que a simples expressão de fatores produzidos por células nervosas, não implica que as CTMs apresentem diferenciação em neurônios funcionais [30]. Por outro lado, a expressão do *GDNF* e *NES* não são observadas somente em células neurais, sabe-se que eles também são expressos em células de origem mesenquimal [73,74].

O gene *NES* também pode estar expresso em tumores de origem mesenquimal e estar associados a proliferação celular [75,76], além disso sua expressão está relacionada com a formação de vasos sanguíneos, ou seja célula endotelial em proliferação [77,78]. A expressão do *NES* e *GDNF* estão envolvidas com uma função neuroprotetora importante [79]. O *GDNF* pertence à família do fator de crescimento

transformador (TGF) [73] e seu produto auxilia no processo de proliferação e diferenciação de células tronco para a linhagem endotelial [80]. Estudos tem demonstrado sua expressão em lesões pós-isquêmicas, acredita-se que a hipóxia estimule a expressão de *VEGF* que por sua vez estimule a expressão do *GDNF*, [81], além disso em estudo *in vitro* foi observado que as CTMs *GDNF*⁺ possuem maior potencial para diferenciação na linhagem endotelial [80].

Desta forma, sugerimos que a alta expressão do *GDNF* observada nas CTMs-GW pode ocorrer de forma compensatória, ao estresse oxidativo causado pela criopreservação [82], e consequentemente estimular uma possível diferenciação das CTMs-GW para a linhagem endotelial.

Contudo, para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos neste processo, torna-se imprescindível estudos mais específicos relacionados aos efeitos do acúmulo espécies reativas a oxigênio (EROs), causados pelo criopreservação, bem como o efeito antioxidante dos transcritos *GDNF* e *NES* nas CTMs.

Concluindo, com este estudo demonstramos que o processo de criopreservação e a manutenção a longo tempo em nitrogênio líquido foi eficiente demonstrando a manutenção da viabilidade, bem como o potencial de diferenciação nas linhagens adipogênica e osteogênica. Além disso, sugerimos que expressão imunofenotípica do CD34⁺ e CD105⁺ associados as expressão do *GDNF* e *NES*, podem indicar a diferenciação espontânea à linhagem endotelial de CTMs-GW criopreservadas por longo tempo.

REFERÊNCIAS

- [1] 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.* 41 (2017) 1435–1444. doi:10.1159/000468057.
- [2] X. Li, J. Tan, Z. Xiao, Y. Zhao, S. Han, D. Liu, W. Yin, J. Li, J. Li, S. Wanggou, B. Chen, C. Ren, X. Jiang, J. Dai, Transplantation of hUC-MSCs seeded collagen scaffolds reduces scar formation and promotes functional recovery in canines with chronic spinal cord injury, *Sci. Rep.* 7 (2017) 43559. doi:10.1038/srep43559.
- [3] J.-H. Lee, H.-S. Chang, E.-H. Kang, D.-J. Chung, C.-B. Choi, J.-H. Lee, S.-H. Hwang, H. Han, H.-Y. Kim, Percutaneous transplantation of human umbilical cord blood-derived multipotent stem cells in a canine model of spinal cord injury., *J. Neurosurg. Spine.* 11 (2009) 749–757. doi:10.3171/2009.6.SPINE08710.
- [4] F. Dazzi, M. Krampera, Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases., *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 24 (2011) 49–57. doi:10.1016/j.beha.2011.01.002.
- [5] E. Zappia, S. Casazza, E. Pedemonte, F. Benvenuto, I. Bonanni, E. Gerdoni, D. Giunti, A. Ceravolo, F. Cazzanti, F. Frassoni, G. Mancardi, A. Uccelli, Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy, *Blood.* 106 (2005) 1755–1761. doi:10.1182/blood-2005-04-1496.
- [6] J.L. Calvo-Guirado, G. Gomez Moreno, A. Aguilar-Salvatierra, J.E. Mate Sanchez de Val, M. Abboud, C.E. Nemcovsky, Bone remodeling at implants with different configurations and placed immediately at different depth into extraction sockets. Experimental study in dogs, *Clin. Oral Implants Res.* 26 (2014) 507–515. doi:10.1111/clr.12433.
- [7] W. Zhang, X. Zhang, S. Wang, L. Xu, M. Zhang, G. Wang, Y. Jin, X. Jiang, Comparison of the use of adipose tissue-derived and bone marrow-derived stem cells for rapid bone regeneration., *J. Dent. Res.* 92 (2013) 1136–41. doi:10.1177/0022034513507581.

- [8] M.F. Pittenger, B.J. Martin, Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics, *Circ. Res.* 95 (2004) 9–20. doi:10.1161/01.RES.0000135902.99383.6f.
- [9] J.J. Minguell, A. Erices, Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease., *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 231 (2006) 39–49.
- [10] D. Baksh, R. Yao, R.S. Tuan, Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow, *Stem Cells.* 25 (2007) 1384–1392. doi:10.1634/stemcells.2006-0709.
- [11] T.C. Cardoso, H.F. Ferrari, A.F. Garcia, J.B. Novais, C. Silva-Frade, M.C. Ferrarezi, A.L. Andrade, R. Gameiro, Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system., *BMC Biotechnol.* 12 (2012) 18. doi:10.1186/1472-6750-12-18.
- [12] M.-S. Seo, S.-B. Park, K.-S. Kang, Isolation and characterization of canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells., *Cell Transplant.* 21 (2012) 1493–502. doi:10.3727/096368912X647207.
- [13] D.L. Troyer, M.L. Weiss, Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population., *Stem Cells.* 26 (2008) 591–9. doi:10.1634/stemcells.2007-0439.
- [14] M. Filioli Uranio, L. Valentini, A. Lange-Consiglio, M. Caira, A.C. Guaricci, A. L'Abbate, C.R. Catacchio, M. Ventura, F. Cremonesi, M.E. Dell'Aquila, 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.* 78 (2011) 361–373. doi:10.1002/mrd.21311.
- [15] Y. Naaldijk, M. Staude, V. Fedorova, A. Stolzing, Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide, *BMC Biotechnol.* 12 (2012) 10. doi:10.1186/1472-6750-12-49.
- [16] O.K. Lee, T.K. Kuo, W.-M. Chen, K.-D. Lee, S.-L. Hsieh, T.-H. Chen, Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood., *Blood.* 103 (2004) 1669–75. doi:10.1182/blood-2003-05-1670.
- [17] L. Maia, M.C. Dias, C.N. de Moraes, C. de Paula Freitas-Dell'Aqua, L.S.L.S. da

- Mota, V. Santiloni, F. da Cruz Landim-Alvarenga, Conditioned medium: a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells, *Cell Biol. Int.* 41 (2017) 239–248. doi:10.1002/cbin.10708.
- [18] H.D. Lin, A. Bongso, Human Wharton ' s Jelly Stem Cell Conditioned Medium Enhances Freeze-Thaw Survival and Expansion of Cryopreserved CD34 + Cells, *Stem Cell Rev Rep.* 2013 (2013) 172–183. doi:10.1007/s12015-013-9426-7.
- [19] J.L. Chaytor, J.M. Tokarew, L.K. Wu, M. Leclre, R.Y. Tam, C.J. Capicciotti, L. Guolla, E. Von Moos, C.S. Findlay, D.S. Allan, R.N. Ben, Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation, *Glycobiology.* 22 (2012) 123–133. doi:10.1093/glycob/cwr115.
- [20] I. Ginis, B. Grinblat, M.H. Shirvan, Evaluation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells After Cryopreservation and Hypothermic Storage in Clinically Safe Medium, *Tissue Eng. Part C Methods.* 18 (2012) 453–463. doi:10.1089/ten.tec.2011.0395.
- [21] M.W. Lee, J. Choi, M.S. Yang, Y.J. Moon, J.S. Park, H.C. Kim, Y.J. Kim, Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (2004) 273–278. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.206.
- [22] P.F. Costa, A.F. Dias, R.L. Reis, M.E. Gomes, Cryopreservation of Cell/Scaffold Tissue-Engineered Constructs, *Tissue Eng. Part C Methods.* 18 (2012) 852–858. doi:10.1089/ten.tec.2011.0649.
- [23] D. Balci, A. Can, The Assessment of Cryopreservation Conditions for Human Umbilical Cord Stroma-Derived Mesenchymal Stem Cells towards a Potential Use for Stem Cell Banking, *Curr. Stem Cells Res. Ther.* 8 (2013) 60–72.
- [24] F. De Lara Janz, A. De Aguiar Debes, R. De Cássia Cavaglieri, S.A. Duarte, C.M. Romão, A.F. Morón, M. Zugaib, S.P. Bydlowski, Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation, *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012). doi:10.1155/2012/649353.
- [25] J.C. Schulz, A. Germann, B. Kemp-Kamke, A. Mazzotta, H. von Briesen, H. Zimmermann, Towards a xeno-free and fully chemically defined cryopreservation medium for maintaining viability, recovery, and antigen-specific functionality of PBMC during long-term storage, *J. Immunol. Methods.* 382 (2012) 24–31. doi:10.1016/j.jim.2012.05.001.

- [26] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement., *Cytotherapy*. 8 (2006) 315–7. doi:10.1080/14653240600855905.
- [27] C. Massumoto, S.M. Massumoto, C.A. Ayoub, *Células-Tronco: Como coletar, processar e criopreservar*, 1^o ed, Editora Atheneu, São Paulo, 2011.
- [28] H.H. Ryu, J.H. Lim, Y.E. Byeon, J.R. Park, M.S. Seo, Y.W. Lee, W.H. Kim, K.S. Kang, O.K. Kweon, 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.* 10 (2009) 273–284. doi:10.4142/jvs.2009.10.4.273.
- [29] E.G. Alves, R. Serakides, J.N. Boeloni, I.R. Rosado, N.M. Ocarino, H.P. Oliveira, A.M. Góes, C.M. Rezende, Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs., *BMC Vet. Res.* 10 (2014) 190. doi:10.1186/s12917-014-0190-y.
- [30] L. Maia, F.C. Landim-Alvarenga, M. de Assis Golim, M.J. Sudano, M.O. Taffarel, B. De Vita, N.P.P. Freitas, R.M. Amorim, Potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais da medula óssea de equino, *Pesqui. Vet. Bras.* 32 (2012) 444–452. doi:10.1590/S0100-736X2012000500013.
- [31] S.M. Hoynowski, M.M. Fry, B.M. Gardner, M.T. Leming, J.R. Tucker, L. Black, T. Sand, K.E. Mitchell, Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007) 347–353. doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.182.
- [32] S. Liu, K.D. Hou, M. Yuan, J. Peng, L. Zhang, X. Sui, B. Zhao, W. Xu, A. Wang, S. Lu, Q. Guo, Characteristics of mesenchymal stem cells derived from Wharton’s jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage, *J. Biosci. Bioeng.* 117 (2014) 229–235. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.07.001.
- [33] I. Arruda, A.J. Listoni, L. Maia, C.M. Chavier, S. Mariana, M.A. Golim, M.F. Martins, C.N. Moraes, F. da C. Landim, POTENTIAL OF CANINE MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM AMNIOTIC

MEMBRANE AND WHARTON ' S JELLY FOR FORMATION OF A CELL BANK, Cryoletters. ([s.d.]).

- [34] I. Walecka, P. Gil-Kulik, A. Krzyżanowski, M. Czop, D. Galkowski, J. Karwat, P. Chomik, M. Świstowska, A. Kwaśniewska, A. Bogucka-Kocka, J. Kocki, Phenotypic Characterization of Adherent Cells Population CD34+ CD90+ CD105+ Derived from Wharton's Jelly, *Med. Sci. Monit.* 23 (2017) 1886–1895. doi:10.12659/MSM.902186.
- [35] C.L. Esteves, T.A. Sheldrake, S.P. Mesquita, J.J. Pesántez, T. Menghini, L. Dawson, B. Péault, F.X. Donadeu, Isolation and characterization of equine native MSC populations, *Stem Cell Res. Ther.* 8 (2017) 80. doi:10.1186/s13287-017-0525-2.
- [36] N.A. Dallas, S. Samuel, L. Xia, F. Fan, M.J. Gray, S.J. Lim, L.M. Ellis, Endoglin (CD105): A marker of tumor vasculature and potential target for therapy, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 1931–1937. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4478.
- [37] H.B. Salvesen, M.G. Gulluoglu, I. Stefansson, L.A. Akslen, Significance of CD105 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas, *Apmis.* 111 (2003) 1011–1018. doi:10.1111/j.1600-0463.2003.apm1111103.x.
- [38] T. Martone, P. Rosso, R. Albera, G. Migliaretti, F. Fraire, L. Pignataro, G. Pruneri, G. Bellone, G. Cortesina, Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome, *Oral Oncol.* 41 (2005) 147–155. doi:10.1016/j.oraloncology.2004.08.001.
- [39] N. Eshghyar, D.D.S. Ms, N. Mohammadi, S. Rahrotaban, P. Motahhary, lationship with Lymph Node Metastasis in Squamous Cell, 14 (2011) 19–21.
- [40] T.A. McGeady, P.J. Quinn, E.S. FitzPatrick, M.T. Ryan, *Veterinary Embriology.pdf*, 1^o ed, Blackwell Publishing Ltd, 2006.
- [41] P. Van Pham, N.C. Truong, P.T.-B. Le, T.D.-X. Tran, N.B. Vu, K.H.-T. Bui, N.K. Phan, Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications, *Cell Tissue Bank.* 17 (2016) 289–302. doi:10.1007/s10561-015-9541-6.
- [42] H. Ranjbaran, S. Abediankenari, M. Mohammadi, N. Jafari, A. Khalilian, Z. Rahmani, Wharton ' s Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells : Isolation and Characterization, (2017).

- [43] B. Polchow, K. Kebbel, G. Schmiedeknecht, A. Reichardt, W. Henrich, R. Hetzer, C. Lueders, Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks, *J. Trans.* 10 (2012) 1–17.
- [44] F. Di Giuseppe, L. Pierdomenico, E. Eleuterio, M. Sulpizio, P. Lanuti, A. Riviello, G. Bologna, M. Gesi, C. Di Ilio, S. Miscia, M. Marchisio, S. Angelucci, Cryopreservation Effects on Wharton's Jelly Stem Cells Proteome, *Stem Cell Rev. Reports.* 10 (2014) 429–446. doi:10.1007/s12015-014-9501-8.
- [45] A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai, *Imunologia Celular e Molecular*, 6^o ed, Elsevier, 2008.
- [46] L.C. Marti, A. Alice, F. Ribeiro, N. Hamerschlak, O efeito imunomodulatório de células-tronco mesenquimais, *Einstein.* 9 (2011) 224–228.
- [47] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *Science* (80-.). 143 (1999). doi:10.1126/science.284.5411.143.
- [48] W.T. Tse, J.D. Pendleton, W.M. Beyer, M.C. Egalka, E.C. Guinan, Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation, *Transplantation.* 75 (2003) 389–397. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9.
- [49] A. Mitchell, K.A. Rivas, R. Smith, A.E. Watts, Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95 % autologous serum and 5 % DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95 % and DMSO at 10 or 5 %, *Stem Cell Res. Ther.* 6 (2015) 231. doi:10.1186/s13287-015-0230-y.
- [50] R. Sarugaser, D. Lickorish, D. Baksh, M.M. Hosseini, J.E. Davies, Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors., *Stem Cells.* 23 (2005) 220–9. doi:10.1634/stemcells.2004-0166.
- [51] L.L. Campos, F.C. Landim-Alvarenga, T.L. Ikeda, B.A. Monteiro, L. Maia, C.P. Freitas-Dell'Aqua, B. De Vita, Isolation, culture, characterization and cryopreservation of stem cells derived from amniotic mesenchymal layer and umbilical cord tissue of bovine fetuses, *Pesqui. Vet. Bras.* 37 (2017) 278–286. doi:10.1590/S0100-736X2017000300012.

- [52] I.R. Tizard, Antígenos eritrocitários e Hipersensibilidade tipo II, *Imunol. Veterinária Uma introdução*. (2009) 357–365.
- [53] C. Götherström, O. Ringdén, C. Tammik, E. Zetterberg, M. Westgren, K. Le Blanc, Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190 (2004) 239–245. doi:10.1016/j.ajog.2003.07.022.
- [54] J. Xu, Z. Li, Y. Hou, W. Fang, Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells., *Am. J. Transl. Res.* 7 (2015) 2527–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26885254>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4731654>.
- [55] M.H. Lee, A. Javed, H.J. Kim, H.I. Shin, S. Gutierrez, J.Y. Choi, V. Rosen, J.L. Stein, A.J. Van Wijnen, G.S. Stein, J.B. Lian, H.M. Ryoo, 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.* 73 (1999) 114–125. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19990401)73:1<114::AID-JCB13>3.0.CO;2-M.
- [56] K. Sonomoto, K. Yamaoka, H. Kaneko, K. Yamagata, K. Sakata, X. Zhang, M. Kondo, Y. Zenke, K. Sabanai, S. Nakayamada, A. Sakai, Y. Tanaka, Spontaneous differentiation of human mesenchymal stem cells on poly-lactic-co-glycolic acid nano-fiber scaffold, *PLoS One.* 11 (2016) 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0153231.
- [57] P. Ducy, R. Zhang, V. Geoffroy, A.L. Ridall, G. Karsenty, *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation, *Cell.* 89 (1997) 747–754. doi:10.1016/S0092-8674(00)80257-3.
- [58] B. Polchow, K. Kebbel, G. Schmiedeknecht, A. Reichardt, W. Henrich, R. Hetzer, C. Lueders, Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks., *J. Transl. Med.* 10 (2012) 98. doi:10.1186/1479-5876-10-98.
- [59] Z. Husak, M.N. Dworzak, Chronic stress induces CD99, suppresses autophagy, and affects spontaneous adipogenesis in human bone marrow stromal cells, *Stem Cell Res. Ther.* 8 (2017) 1–13. doi:10.1186/s13287-017-0532-3.
- [60] B.K. Koo, I.Y. Park, J. Kim, J.-H. Kim, A. Kwon, M. Kim, Y. Kim, J.C. Shin, J.-

- H. Kim, Isolation and Characterization of Chorionic Mesenchymal Stromal Cells from Human Full Term Placenta, *J. Korean Med. Sci.* 27 (2012) 857. doi:10.3346/jkms.2012.27.8.857.
- [61] P.R. Amable, M.V.T. Teixeira, R.B.V. Carias, J.M. Granjeiro, R. Borojevic, Gene expression and protein secretion during human mesenchymal cell differentiation into adipogenic cells, *BMC Cell Biol.* 15 (2014) 1–10. doi:10.1186/s12860-014-0046-0.
- [62] J.K. Hamm, a K. el Jack, P.F. Pilch, S.R. Farmer, Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 892 (1999) 134–45. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07792.x.
- [63] S. Urs, C. Smith, B. Campbell, A.M. Saxton, J. Taylor, B. Zhang, J. Snoddy, B. Jones Voy, N. Moustaid-Moussa, Gene Expression Profiling in Human Preadipocytes and Adipocytes by Microarray Analysis, *J. Nutr.* 134 (2004) 762–770. <http://jn.nutrition.org/content/134/4/762.long>.
- [64] T.C. Cardoso, L.H. Okamura, J.C. Baptistella, R. Gameiro, H.L. Ferreira, M. Marinho, E.F. Flores, Isolation, characterization and immunomodulatory-associated gene transcription of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells at different trimesters of cow pregnancy, *Cell Tissue Res.* 367 (2017) 243–256. doi:10.1007/s00441-016-2504-9.
- [65] F.G. Teixeira, M.M. Carvalho, A. Neves-Carvalho, K.M. Panchalingam, L.A. Behie, L. Pinto, N. Sousa, A.J. Salgado, Secretome of Mesenchymal Progenitors from the Umbilical Cord Acts as Modulator of Neural/Glial Proliferation and Differentiation, *Stem Cell Rev. Reports.* 11 (2015) 288–297. doi:10.1007/s12015-014-9576-2.
- [66] F.G. Teixeira, K.M. Panchalingam, S.I. Anjo, B. Manadas, R. Pereira, N. Sousa, A.J. Salgado, L.A. Behie, Do hypoxia/normoxia culturing conditions change the neuroregulatory profile of Wharton Jelly mesenchymal stem cell secretome?, *Stem Cell Res. Ther.* 6 (2015) 133. doi:10.1186/s13287-015-0124-z.
- [67] a O. Pires, a Neves-Carvalho, N. Sousa, a J. Salgado, The Secretome of Bone Marrow and Wharton Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells Induces Differentiation and Neurite Outgrowth in SH-SY5Y Cells, *Stem Cells Int.* 2014 (2014) 438352. doi:10.1155/2014/438352.
- [68] C.C. Yang, Y.H. Shih, M.H. Ko, S.Y. Hsu, H. Cheng, Y.S. Fu, Transplantation

- of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord, *PLoS One*. 3 (2008). doi:10.1371/journal.pone.0003336.
- [69] N. Nakano, Y. Nakai, T.B. Seo, Y. Yamada, T. Ohno, A. Yamanaka, Y. Nagai, M. Fukushima, Y. Suzuki, T. Nakatani, C. Ide, Characterization of conditioned medium of cultured bone marrow stromal cells, *Neurosci Lett*. 483 (2010) 57–61. doi:10.1016/j.neulet.2010.07.062.
- [70] I. Arutyunyan, A. Elchaninov, A. Makarov, T. Fatkhudinov, Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy, (2016). doi:10.1155/2016/6901286.
- [71] R. a. Boomsma, D.L. Geenen, Mesenchymal Stem Cells Secrete Multiple Cytokines That Promote Angiogenesis and Have Contrasting Effects on Chemotaxis and Apoptosis, *PLoS One*. 7 (2012) e35685. doi:10.1371/journal.pone.0035685.
- [72] Y. Oda, K. Tani, T. Kanei, T. Haraguchi, K. Itamoto, H. Nakazawa, Y. Taura, Characterization of neuron-like cells derived from canine bone marrow stromal cells, *Vet. Res. Commun*. 37 (2013) 133–138. doi:10.1007/s11259-013-9555-0.
- [73] H.L. Hellmich, L. Kos, E.S. Cho, K.A. Mahon, A. Zimmer, Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions, *Mech. Dev*. 54 (1996) 95–105. doi:10.1016/0925-4773(95)00464-5.
- [74] L. Xie, X. Zeng, J. Hu, Q. Chen, Characterization of Nestin, a Selective Marker for Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells Int*. 2015 (2015). doi:10.1155/2015/762098.
- [75] J. Neradil, R. Veselska, Nestin as a marker of cancer stem cells, *Cancer Sci*. 106 (2015) 803–811. doi:10.1111/cas.12691.
- [76] A. Bernal, L. Arranz, Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications, *Cell. Mol. Life Sci*. (2018) 1–19. doi:10.1007/s00018-018-2794-z.
- [77] S. Suzuki, J. Namiki, S. Shibata, Y. Mastuzaki, H. Okano, The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature, *J. Histochem. Cytochem*. 58 (2010) 721–730.

- doi:10.1369/jhc.2010.955609.
- [78] J. Mokřý, D. Čížková, S. Filip, J. Ehrmann, J. Österreicher, Z. Kolář, D. English, Nestin Expression by Newly Formed Human Blood Vessels, *Stem Cells Dev.* 13 (2004) 658–664. doi:10.1089/scd.2004.13.658.
 - [79] A. Jezierski, K. Rennie, B. Zurakowski, M. Ribocco-Lutkiewicz, J. Haukenfrers, A. Ajji, A. Gruslin, M. Sikorska, M. Bani-Yaghoub, Neuroprotective Effects of GDNF-expressing Human Amniotic Fluid Cells, *Stem Cell Rev. Reports.* 10 (2014) 251–268. doi:10.1007/s12015-013-9484-x.
 - [80] R. Zhang, Y. Lu, J. Li, J. Wang, C. Liu, F. Gao, D. Sun, 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.* 47 (2016) 9–19. doi:10.1007/s10735-015-9649-9.
 - [81] H. Shi, D. Patschan, G.P.H. Dietz, M. Ba, M. Plotkin, M.S. Goligorsky, M. Plotkin, G. Ms, Glial cell line-derived neurotrophic growth factor increases motility and survival of cultured mesenchymal stem cells and ameliorates acute kidney injury, *Am J Physiol Ren. Physiol.* 294 (2007) 229–235. doi:10.1152/ajprenal.00386.2007.
 - [82] D. Kadekar, S. Rangole, V. Kale, L. Limaye, Conditioned medium from placental mesenchymal stem cells reduces oxidative stress during the cryopreservation of Ex Vivo expanded umbilical cord blood cells, *PLoS One.* 11 (2016) 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0165466.

Capítulo 3

Trabalho Científico 2. Influência do Soro Fetal Bovino na diferenciação de células tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo e cordão umbilical canino.

(Artigo será submetido para revista Stem Cell Research & Therapy - <https://stemcellres.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript#preparing+main+manuscript+text>)

Resumo

Introdução: Estudos com Células Tronco Mesenquimais já evidenciaram o potencial terapêutico destas células, e apesar de esclarecido que o mecanismo imunomodulatório é fundamental para o sucesso terapêutico, entender comportamento no processo de diferenciação celular *in vitro* torna-se fundamental para futuras abordagens terapêuticas. Os objetivos deste trabalho foram investigar os efeitos de duas concentrações de soro fetal bovino (SFB) sobre a proliferação e a alteração na expressão gênica das CTMs de tecido adiposo (CTMs-TA) e gelatina de wharton (CTMs-GW) não induzidas e induzidas às linhagens osteogênica e adipogênica. Adicionalmente, o efeito da diferenciação (osteogênica e adipogênica) na expressão gênica das CTMs-TA e CTMs-GW.

Métodos: As CTMs-TA e GW criopreservadas foram reconstituídas e submetidas ao teste de proliferação celular (10 e 20% de SFB), diferenciação induzida (adipogênica e osteogênica) e não induzida (5º, 19º e 26º dias de cultivo, D₀, D₁₄ e D₂₁ respectivamente). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA e no teste de proliferação foi incluído as medidas repetidas no tempo.

Resultados: As CTMs-GW apresentaram maior proliferação com 20% de SFB ($p < 0,05$) e enquanto que as CTMs-TA não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Foi observado gotículas lipídicas nas CTMs-TA e CTMs-WJ com maior intensidade nas células cultivadas com 20% de SFB, mas a diferenciação espontânea para linhagem adipogênica não foi confirmada pela expressão genica de *PPARα* e *AdipoQ*. As diferentes concentrações de SFB não influenciaram na expressão gênica das CTMs-TA e CTMs-GW induzidas e não induzidas ($p > 0,05$). Não houve alteração da expressão de

genes específicos (*PPAR α* e *AdipoQ*) após a indução de diferenciação adipogênica nas CTMs-TA e CTM-GW ($p>0,05$), e a expressão do *PPAR γ* foi observado somente as CTMs-TA e não demonstrou diferença em sua expressão após a diferenciação.

Os genes relacionados à diferenciação osteogênica nas CTMs-TA o *RUNX2* foi mais expresso após a indução ($p<0,05$), enquanto que o *OSC* foi mantido ($p>0,05$), nas CTMs-GW o *OSC* apresentou aumento da expressão após a indução ($p<0,05$) e manutenção do *RUNX2* ($p>0,05$). Dos genes neuroprotetores, o *NES* apresentou-se menos expresso após a diferenciação adipogênica nas CTMS-GW ($p<0,05$) enquanto que o GDNF manteve-se altamente expresso em ambos momentos, após a diferenciação osteogênica foi observado maior expressão do *NES* nas CTMs-TA ($p<0,05$). A diferenciação adipogênica influenciou de forma significativa as expressão dos transcritos *TP53*, *CASP3* e *BCL2L1* nas CTMs-TA ($p<0,05$) e *TP53*, *CLU* e *BCL2L1* nas CTMs-GW ($p<0,05$), já a diferenciação osteogênica influenciou nas expressão de *BCL2L1* e *CLU* nas CTMS-TA e CTMs-GW ($p<0,05$).

Conclusões: Apesar de características morfológicas (gotículas lipídicas), as CTMs-TA e CTM-GW não apresentaram diferenciação espontânea para a linhagem adipogênica ou osteogênica com nenhuma das concentrações de SFB utilizadas. Contudo podemos sugerir que o processo de diferenciação induziu as CTMs a um estresse, porém elas responderam de forma compensatória à esse estímulo, evidenciando assim suas características terapêuticas.

Palavras chave: Expressão gênica, Gelatina de Wharton, criopreservação

INTRODUÇÃO

As características de alta taxa de proliferação, plasticidade, capacidade de diferenciação e efeito imunomodulatório, fazem com que a célula tronco mesenquimal seja considerada, pela medicina regenerativa, atrativa para terapia de doenças que são um desafio para a ciência [1–4].

Frente aos resultados promissores apresentados, a utilização de CTMs está cada vez mais presente nos centros de terapias alternativas, na área de medicina humana, principalmente para suporte em tratamentos hematológicos, cardíacos e transplante de órgãos. Já em veterinária as terapias são amplamente utilizadas para lesões medulares, renais, ósseas entre outras [5–13].

Os principais efeitos terapêuticos das CTMs estão relacionados a modulação e recrutamento de citosinas e quimosinas já existentes no indivíduo. Estas características já foram amplamente descritas, sendo associadas ao caráter multipotente e imunomodulador destas células [14–18]. Sendo assim, a compreensão de seu potencial de diferenciação e potencialmente a perda de propriedades terapêuticas envolvidas no processo é fundamental para prever e avaliar as consequências e a eficiência da aplicação de CTMs nos diferentes ambientes de lesão.

Desta forma, estudos indicam que além do meio de cultivo, a densidade, o tamanho e o contado celular durante o cultivo *in vitro*, podem influenciar na indução da diferenciação para as linhagens adipogênica e osteogênica [19]. O SFB é um suplemento comumente utilizado para o cultivo das CTMs composto por hormônios, vitaminas, transportadores de proteínas e fatores de crescimento essenciais para a sobrevivência das CTMs [20] e não existe um consenso na concentração a ser utilizada.

Sabe-se, ainda que alguns materiais e ou nano materiais utilizados no cultivo destas células podem promover a diferenciação espontânea de CTMs [21–24]. Dentre esses materiais o soro fetal, seja ele de origem autóloga ou não, favorece a expansão celular [20], porém pode influenciar na diferenciação espontânea para as linhagens osteogênica e adipogênica [24–27].

Além da imunohistoquímica tradicionalmente utilizada para confirmar a diferenciação celular [2,28–30], este processo pode ser demonstrado através da expressão de genes associados a proteínas marcadoras relacionados à adipócitos (*PPAR γ* , *PPAR α* e *AdipoQ*) e a osteócitos (*OSC* e *RUNX2*) [31–33]. Além disso, a utilização de meio sintéticos e potencialmente agressivos para as células pode levar as células à um processo de apoptose

Frente a estes dados, a finalidade do presente experimento foi investigar a influência do SFB na proliferação celular e diferenciação de células tronco

mesenquimais obtidas de tecido adiposo e gelatina de wharton nas linhagens adipogênica e osteogênica, bem como a expressão de genes relacionados à apoptose (*BCL2L1*, *CASP3*, *TP53* e *CLU*).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu.

Obtenção das amostras

As amostras da matriz extra vascular do cordão umbilical, também chamando de Gelatina de Wharton, foram obtidas de cadelas submetidas a cesarianas (aproximadamente 60 dias gestacionais), e as de Tecido Adiposo foram obtidas de cadelas, fêmeas, saudáveis, submetidas a castrações eletivas. Ambos procedimentos foram realizados no centro cirúrgico do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP - Botucatu, onde os animais foram devidamente anestesiados, e sua coleta foi aprovada pelo Comitê de ética no uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, sob o nº de protocolo: 94/2015 - CEUA, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

As amostras de cordão umbilical e tecido adiposo foram mantidas em banco celular, em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C no Laboratório de Terapia Celular e Reprodução Avançada (Lança), no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Unesp/Botucatu. Foram utilizadas 5 amostras de cada fonte, em um delineamento inteiramente casualizado.

Isolamento, Cultivo e Criopreservação

Matriz Extra vascular do cordão umbilical ou Gelatina de Wharton

Foram utilizadas células de gelatina de Wharton (n=4) previamente coletadas e criopreservadas seguindo o descrito por Arruda et al. (artigo aceito para publicação), mantidas em nitrogênio líquido (-196°C).

Tecido Adiposo

Os fragmentos de tecido adiposo (n=5) foram coletadas em castrações eletivas de fêmeas caninas, acondicionadas em solução tampão acrescida de antibiótico, e imediatamente processadas. As amostras lavadas em *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS - Thermo Fischer Scientific), foram fracionados (digestão mecânica) com auxílio de uma pinça e um bisturi, e colocados em solução a 0,04% de collagenase Tipo 1 (Sigma) a temperatura de 37,5°C em banho termostático por aproximadamente 40 minutos.

A suspensão celular foi filtrada (filtro 70 µm - BD) e submetida à Força Centrífuga Relativa (FCR) 500 g por 10 minutos, formando um *pellet*, então a mesma foi ressuspendida em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12* (DMEM/F12 – Thermo Ficher Scientific) com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB - Thermo Ficher Scientific), suplementado com antibióticos (1% de solução de Penicilina e Estreptomicina - Thermo Ficher Scientific) e antimicótico (1,2% de solução de Anfotericina - Thermo Ficher Scientific) e centrifugado novamente a FCR 500 g por 10 minutos para a retirada completa da solução de collagenase. O precipitado celular ressuspendido em 5 mL do meio já citado, foi colocado em frascos de 25cm² (T25) e cultivado em estufa úmida com 5% de CO₂ em temperatura de 37,5°C. O primeiro meio de cultivo foi trocado após 48 horas, seguido de duas trocas semanais.

Criopreservação

Após a tripsinização, em segunda passagem, as células foram colocadas em criotubos contendo aproximadamente uma concentração de 5x10⁵ células/criotubo, com 1,5 mL de meio crioprotetor composto por 90% de SFB (Thermo Ficher Scientific) e 10% de Dimetil sulfóxido (Me₂SO - Sigma). Os criotubos foram acondicionados no Nalgene™, e mantido por 24 horas no Ultra Freezer -80°C (Thermo Scientific – Forma 8800 Series), resfriando gradualmente as células a aproximadamente - 1°C por minuto.

Em seguida os criotubos foram colocados o nitrogênio líquido (-196°C), dessa forma mantido até o momento das análises.

As amostras foram reconstituídas, utilizando o protocolo descrito por Chaytor et al. [34], onde as células foram rapidamente descongeladas em banho-maria (37°C) sob leve agitação, até permanecer uma pequena pedra de gelo, neste momento as foram transferidas para tubos de centrifugas previamente preparados com 3mL de meio basal a 37°C , e mantidos nessa temperatura por 3 minutos, na sequencia foram adicionado 9mL de meio basal, completando 12 mL (meio basal + células descongeladas) e então a células foram submetidos a FCR de 580 g/ 10 minutos em seguida realizado o teste de viabilidade. Para o teste de viabilidade foi utilizando o *Trypan Blue* (Thermo Ficher Scientific) e então as CTMs foram plaqueadas para a realização do ensaio de diferenciação espontânea e induzida.

Teste de proliferação celular

As células de tecido adiposo e gelatina de Wharton foram cultivadas em placas de 24 poços, para cada amostra foram feitas 10 réplicas, com densidade de 2×10^3 células/cm², 5 réplicas foram mantidas com tratamento 1 (DMEM/F12 + 10% de SFB - Thermo Ficher Scientific) e as demais com o tratamento 2 (DMEM/F12 + 20% de SFB - Thermo Ficher Scientific). A cada 48 horas as células foram tripsinizadas e contadas com auxílio da câmara de Neubauer e o corante *Trypan Blue* (Thermo Ficher Scientific). Este procedimento foi realizado às 48h, 96h, 144h, 194h e 240h, com todas as amostras de CTMs-GW e TA.

Diferenciação não induzida e induzida

Para esta etapa do experimento, todos os meios foram compostos por DMEM/F12 (Thermo Ficher Scientific), antibiótico (Pen/Strep - Thermo Ficher Scientific) e antimicótico (Anfotericina B – Thermo Ficher Scientific), com uma variação nas concentrações de soro fetal bovino, denominados de: Tratamento 1 (T1) = DMEM/F12 + 10% de SFB e Tratamento 2 (T2) = DMEM/F12 + 20% de SFB.

As amostras foram separadas em grupos: D₀, D_{14esp}, D_{14ind}, D_{21esp} e D_{21ind}. Para cada amostra foram utilizadas 5 placas de 24 poços (uma para cada grupo), onde as células foram plaqueadas com concentração celular de 3×10^3 /poço (8 poços cada placa, ou seja, 4 poços para T1 e 4 para T2).

No quinto dia de cultivo, as placas do D₀ (Figura 1) foram fixadas e coradas com *Oil Red* (Sigma) (dois poços T1 e dois poços T2) e *Alizarin Red* (Sigma) (dois poços T1 e dois T2), as demais mantidas em cultivo, onde as D_{14ind} e D_{21ind} o meio basal foi substituído por meio indutor adipogênico (*StemPro Adipogenesis Differentiation Kit* – Thermo Fisher Scientific) e osteogênico (*StemPro Osteogenesis Differentiation Kit* – Thermo Fisher Scientific) respectivamente, já as D_{14esp} e D_{21esp} o meio foi trocado mantendo os meios T1 e T2, as trocas de meios eram feitas a cada três dias.

As demais placas foram mantidas em cultivo até 19º e 26º dias de cultivo quando as placas foram coradas com *Alizarin Red* e *Oil Red*, dessa forma foi confirmada ou não a diferenciação espontânea, nas linhagens adipogênica e osteogênica nos três grupos já descritos (D₀, D_{14esp} e D_{21esp}).

A diferenciação induzida ocorreu da mesma forma, porém não foi realizado a fixação no quinto dia (D₀), somente nos 19º e 26º dias D_{14ind} e D_{21ind}, respectivamente, e neste experimento funcionou com um controle positivo de diferenciação.

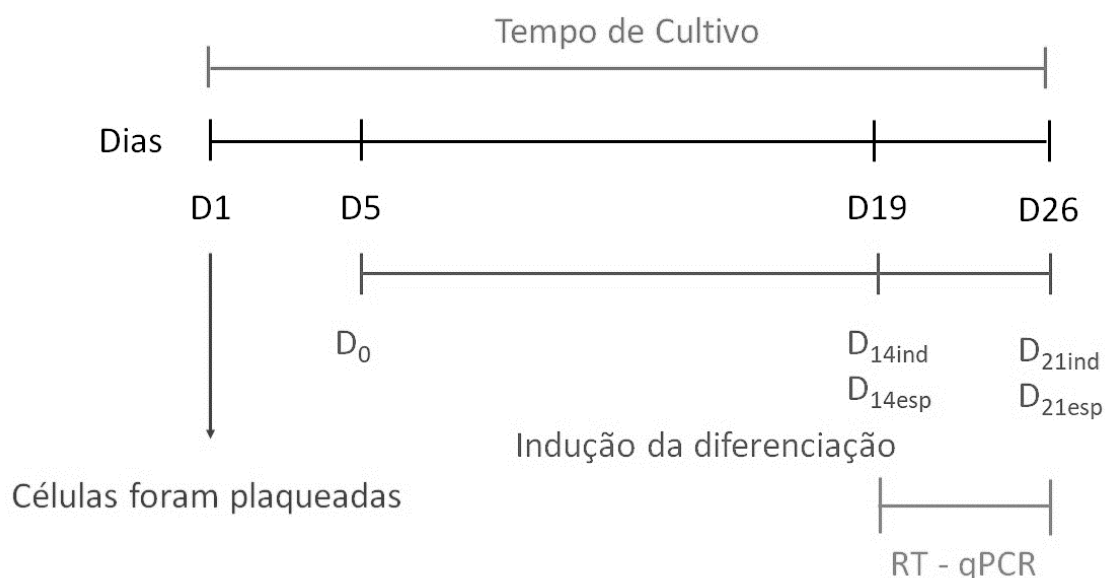


FIGURA 1. Ilustração esquemática do tempo de cultivo, indicando o momento em que cada análise foi realizada. Linha preta = tempo total que as células permaneceram em cultivo; D1- dia em que as células foram plaqueadas; D5 = D₀ – início da indução à diferenciação (adipogênica, osteogênica), neste momento 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.

Análise Quantitativa PCR em Tempo Real (RT- qPCR)

O procedimento de PCR em tempo real foi realizado no Laboratório Fitofarmatec – Departamento de Farmacologia - IBB-UNESP-Botucatu/SP, com a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira.

Foram utilizadas 4 repetições de CTMs-WJ e 5 repetições de CTMs-TA, As CTMs foram cultivadas com 10% e 20% de soro até o quinto dia de cultivo, a partir deste momento os grupos D14ind e D21ind tiveram seus meios (T1 e T2) substituídos por meio de indução adipogênica (D14ind) e osteogênica (D21ind), e nos demais grupos (D14esp e D21esp) foram mantidos os meios contendo 10% e 20% de SFB.

No 19º dia de cultivo os grupos D14ind (adipogênico) e D14esp 10% de SFB e D14esp 20%SFB foram submetidos à extração de RNA, e o mesmo aconteceu no 26º dia com os grupos D21ind (osteogênica), D21esp com 10% de soro e D21esp com 20% de soro.

Primers e Sondas (ensaios)

Os ensaios utilizados foram TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) todos específicos para cão descritos abaixo (Tabela 2).

Extração do RNA total das células-tronco mesenquimais

A extração do RNA total, foi realizado com o TRIzol Reagente (Life Technologies - EUA) seguindo as recomendações do fabricante e ao fim dissolvido em 30µL de água livre de RNA.

A concentração de RNA foi determinada pelo NanoDrop (NanoDrop™, Thermo Fisher Scientific, USA). O grau de pureza das amostras foi dado através da A260/A280, considerando o RNA puro, ou seja, livre de contaminantes, quando a razão compreendida entre 1.8 e 2,2, sequencia foram mantidos em Freezer -80°C até a próxima etapa.

As amostras (400ng) foram tratadas com DNase (Deoxyribonuclease I - Life Technologies) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. A transcrição do RNA em cDNA foi realizada utilizando o Kit de transcrição reversa *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems® Thermo Fisher Scientific) a ordem e as etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante dos reagentes, obtendo um volume final de 20 µL.

TABELA 1. Ensaios, específicos para a espécie canina, utilizados para o RT-qPCR

Genes	Identificação
Sox 2 (SRY-Box2)	cf022701282_g1
Oct4 (Proteína de ligação octomero 4)	cf02676214_g1
Runx2 (Fator de transcrição relacionado ao Runt-2)	cf02694691_m1
OSC (Osteocalcina)	cf02623891_g1
PPARα (Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas– α)	Cf02682567_m1
PPARγ (Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas– γ)	cf02682567_m1
AdipoQ (Adiponectina)	cf02624380_m1
NES (Nestina)	cf02706322_g1
GFAP (Proteína ácida fibrilar glial)	cf02655694_m1
GDNF (Fator neurotrófico derivado da glia)	cf02691052_s1
CASP3 (Caspase 3)	cf02622232_m1
BCL2L1 (Proteína da família BCL-2)	cf02727667_m1
CLU (Clusterina)	cf02628076_m1
TP53 (Proteína tumoral 53)	cf02623149_m1
C-kit (Receptor proto-oncogene Kit)	cf02623035_m1
VIM (Vimentina)	cf02668854_mH
B2M (Beta2-Microglobulina)	cf0265079_m1
RPL13 (Proteína ribossomal L13)	cf02666375_g1
GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)	cf04419463_gH

PCR em tempo real Biomark HD 96.96 (Versão Beta)

O método RT-qPCR Biomark é multiplex em sistema micro fluídico da 50 Fluidigm, no qual é analisado um painel de genes, dentre ele, nossos genes de interesse, avaliando até 96 amostras de uma única vez, neste experimento foram utilizadas 16 amostras. As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real (*TaqMan™ Gene Expression Assay*, Applied Biosystems) para a espécie canina.

Antes do ciclo térmico do qPCR, cada amostra foi submetida à uma sequência específica de pré-amplificação da seguinte forma: 1,25 μ L de mistura de ensaios

(*TaqMan assay* – preparado uma mistura de todos os ensaios com tampão de DNA numa concentração final de 0,2x), 2,5µL *TaqMan PreAmp Master Mix* (Applied Biosystems, USA), e 1,25µL de cDNA. As reações foram ativadas a 95°C por 10 minutos seguido por 10 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e amplificação a 60°C por 4 minutos. Estes produtos pré-amplificados foram diluídos 7 vezes antes da análise de RT-qPCR.

Cada amostra preparada para o termociclador do qPCR era composta por 2,25µL de cDNA pré-amplificado diluído 2,5µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (2X, Applied Biosystems, USA) e 0,25µL de 20X *GE Sample Loading Reagent* (Fluidigm, USA). A solução de ensaio (genes) consistia em 20X *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, USA) e 2,5µL de 2X *Assay Loading Reagent* (Fluidigm, USA).

Um 96.96 *Dinamic Array™ Integrated Fluidic Circuits Chip* (Fluidigm, USA) foi utilizado para colocar as amostras e os genes, de um lado foi adicionado 5µL da solução com amostra e do outro 5µL de solução com os ensaios, e então o ciclo térmico do qPCR foi realizado no sistema *Biomark HD* (Fluidigm, USA) utilizando o protocolo do *TaqMan GE 96x96*, que consiste do Thermal Mix (50°C por 2 minutos, 70°C por 20 minutos e 25°C por 10 minutos), seguido por um estágio de início quente (50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, e então por 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) e finalizando com extensão (60°C por 60 segundos).

Os ensaios *TaqMan* utilizados neste estudo foram selecionados considerando a análise de transcrição dependentes do DNA relacionados principalmente nas características de células tronco mesenquimais, embrionárias e diferenciação celular. Foram obtidos através do programa do *Biomark (Biomark Real Time PCR Analyzed*, Fluidigm, USA) valores de Cq das amostras e respectivos genes analisados.

Os genes referência foram selecionados a partir de uma análise de estabilidade dos genes (Cq comparativo através do teste de normalidade das amostras onde: $p > 0,05$ era realizado teste ANOVA para comparação de médias identificando os genes referência, quando $p < 0,05$ foi realizado uma transformação dos dados em “log” e então submetidos ao teste de normalidade, para a amostras com distribuição normal foi feito os teste ANOVA com os dados em log, para amostras com distribuição não considerada normal (não paramétrica) foi realizado o teste de Wilcoxon com os dados originais).

Desta forma, identificou-se uma homogeneidade dos dados, e através do NormFinder os genes de referência foram selecionados: CTMs-TA = B2M (β 2-Microglobulina – Gene ID: 100855741), RPL13 (Proteína Ribossomal L13 – Gene ID: 479612); CTMs-GW = B2M (β 2-Microglobulina – Gene ID: 100855741), RPL13 (Proteína Ribossomal L13 – Gene ID: 479612) GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – Gene ID: 403755).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise estatística foi utilizado o programa Statistical Analysis System (Versão 9.4 2012), sendo primeiramente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias por teste de Welch. Estes dados foram submetidos à análise de variância, pelo PROC MIXED, que contemplará como causas de variação de efeito fixo os tratamentos (10% e 20% SFB).

Com exceção do teste de proliferação que foi utilizado medidas repetidas no tempo onde as causas de variações de efeito fixo são: efeito do SFB, tempo e a interação dos mesmos, quando apresentado interação foi utilizado o teste de PIDFF, para efeito de tempo foi utilizado análise de regressão polinomial e efeito de soro fetal bovino análise de variância pelo PROC MIXED.

RESULTADOS

Teste de proliferação celular

Através da curva de crescimento das células obtidas de CTMs-TA (Figura 2), foi possível observar a influência do tempo na expansão celular ($p < 0,0001$). Apesar da diferença numérica, o tratamento não influenciou ($p = 0,592$) na proliferação celular. Houve um crescimento exponencial evidente até as 144h ($p = 0,5316$) nas células tratadas com 10% e 20% de SFB, após esse tempo, as células tratadas com 20% SFB apresentaram expansão até as 240h o que não ocorreu com as células tratadas com 10% de SFB que demonstraram queda na expansão após 192 horas. A análise dos dados mostrou que existe uma tendência de superioridade na utilização de 20% de SFB quanto

a eficiência na expansão das CTMs-TA ($p=0,090$), contudo seria necessário a continuação do cultivo por um maior período para confirmação (Figura 2).

Considerando a fonte CTMs-GW, o tempo ($p=0,0003$) e o tratamento influenciaram na proliferação celular ($p<0,0001$), onde as células tratadas com 20% de SFB apresentaram maior concentração celular. O crescimento exponencial foi observado até as 144h com as duas concentrações séricas, porém as células tratadas com 10% de SFB a expansão foi menor. Esta característica pode ser observada a partir das 144 horas ($p=0,0006$), o mesmo aconteceu com 192h ($p=0,0008$) e 240h ($p=0,005$) (Figura 3).

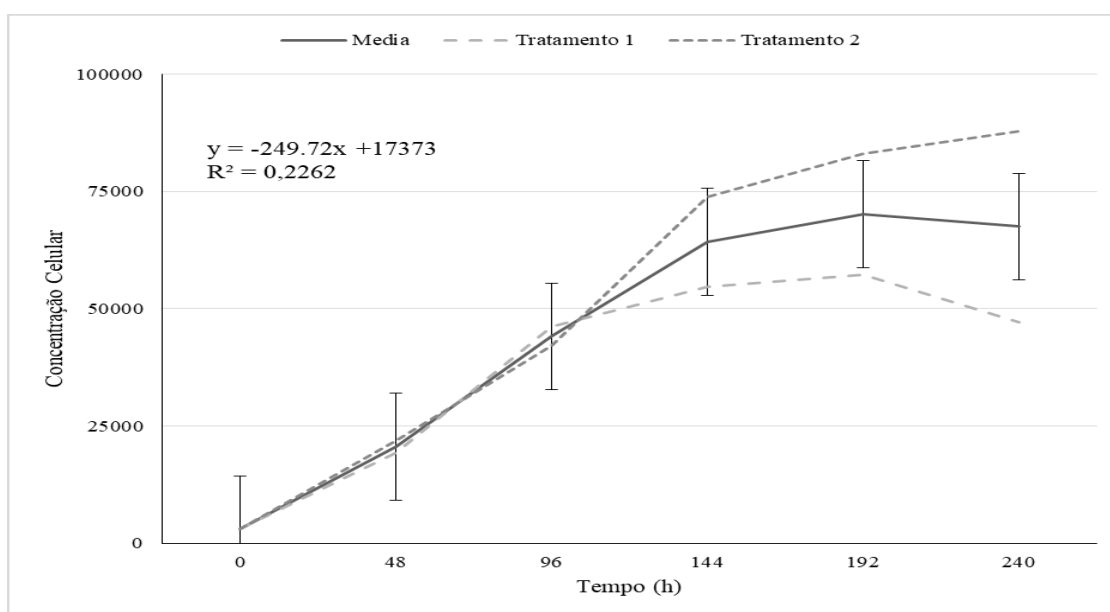


FIGURA 2. Teste de proliferação celular das CTMs-TA cultivadas com diferentes concentrações de soro fetal bovino em relação ao tempo de cultivo. Tratamento= 10% de SFB; Tratamento 2= 20% d SFB; Y=total do número de células; x=tempo; R^2 = Coeficiente de correlação.

Análise das diferenciações

Diferenciação induzida

As diferenciações adipogênica e osteogênica foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante utilizando meios indutores. Aos 14º dias (19º de cultivo) após a indução adipogênica as CTMs-TA, cultivadas com 10 (Figura 4. A) e 20% de SFB (Figura 4. B) apresentaram gotículas de gordura no citoplasma. Para a diferenciação osteogênica, a deposição de cálcio foi observada após 21 dias da indução osteogênica através da coloração com *Alizarin Red* com 10% de soro (Figura 4. C) e 20% de soro (Figura 4. D). O mesmo pôde ser observado nas CTMs-GW na diferenciação adipogênica com 10% (Figura 5. A) e 20% de SFB (Figura 5. B) onde, as células apresentaram gotícula de gordura no citoplasma células, corado pelo *Oil Red*.

Após a indução osteogênica das CTMs-GW também foi possível observar os depósitos de cálcio na células cultivadas com 10% e 20% de SFB (Figura 5. C e D respectivamente).

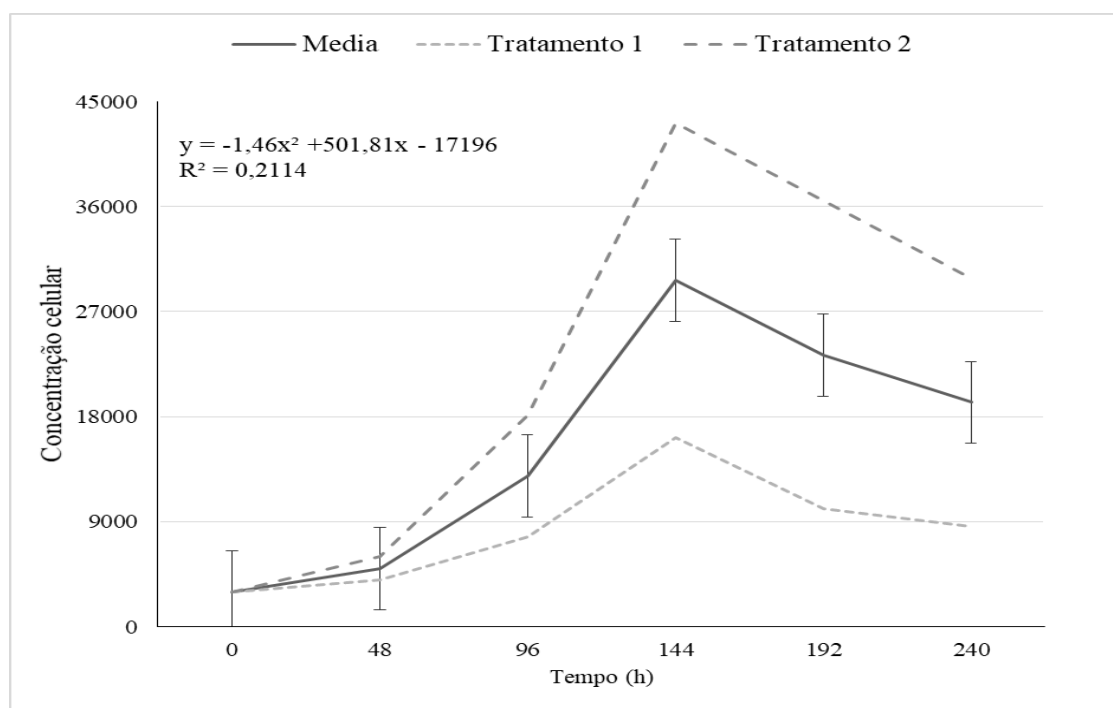


FIGURA 3. Teste de proliferação celular das CTMs-GW cultivadas com diferentes concentrações de soro fetal bovino em relação ao tempo de cultivo. Tratamento 1= 10% de SFB; Tratamento 2= 20% d SFB; Y=total do número de células; x=tempo; R²= Coeficiente de correlação.

Diferenciação Não Induzida (D_0 , D_{14esp} e D_{21esp})

No grupo D_0 , as células foram fixadas e coradas após cinco dias de cultivo (Figura 6), e nestas condições não houve marcação para diferenciação em linhagem osteogênica em nenhuma das amostras de CTMs-TA ou de CTMs-GW cultivadas com 10% ou 20% de SFB (Figura 6. A, B, C e D respectivamente).

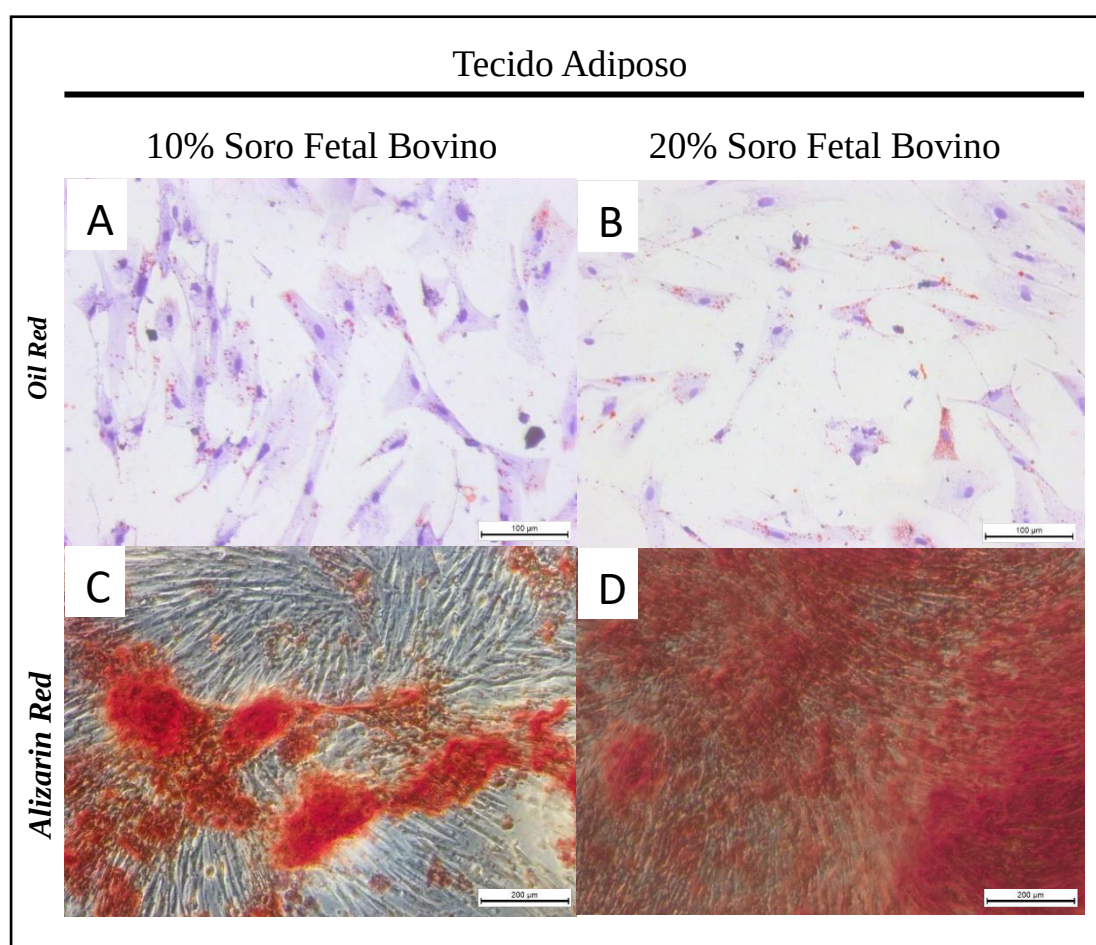


FIGURA 4. Microscopia de luz - Células tronco mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo cultivadas com 10 % (A e C) e 20% (B e D) de SFB, submetidas ao processo de diferenciação nas linhagens adipogênica (A e B) e osteogênica (C e D). Escala: 100µm (A e B) e 200µ (C e D).

Quando foi feita a coloração com *Oil Red* para avaliação da diferenciação em linhagem adipogênica, todas as amostras (Figura 6. E, F, G e H) apresentaram gotículas de gordura no citoplasma celular. Contudo, estas apareceram em menor intensidade nas CTMs-TA cultivadas com 10% de SFB (Figura 6. E).

As CTMs-TA e GW do grupo D_{14esp} cultivadas com 10% de SFB (Figura 7. A e C) e 20% de SFB (Figura 7. B e D), não apresentaram diferenciação espontânea para a linhagem

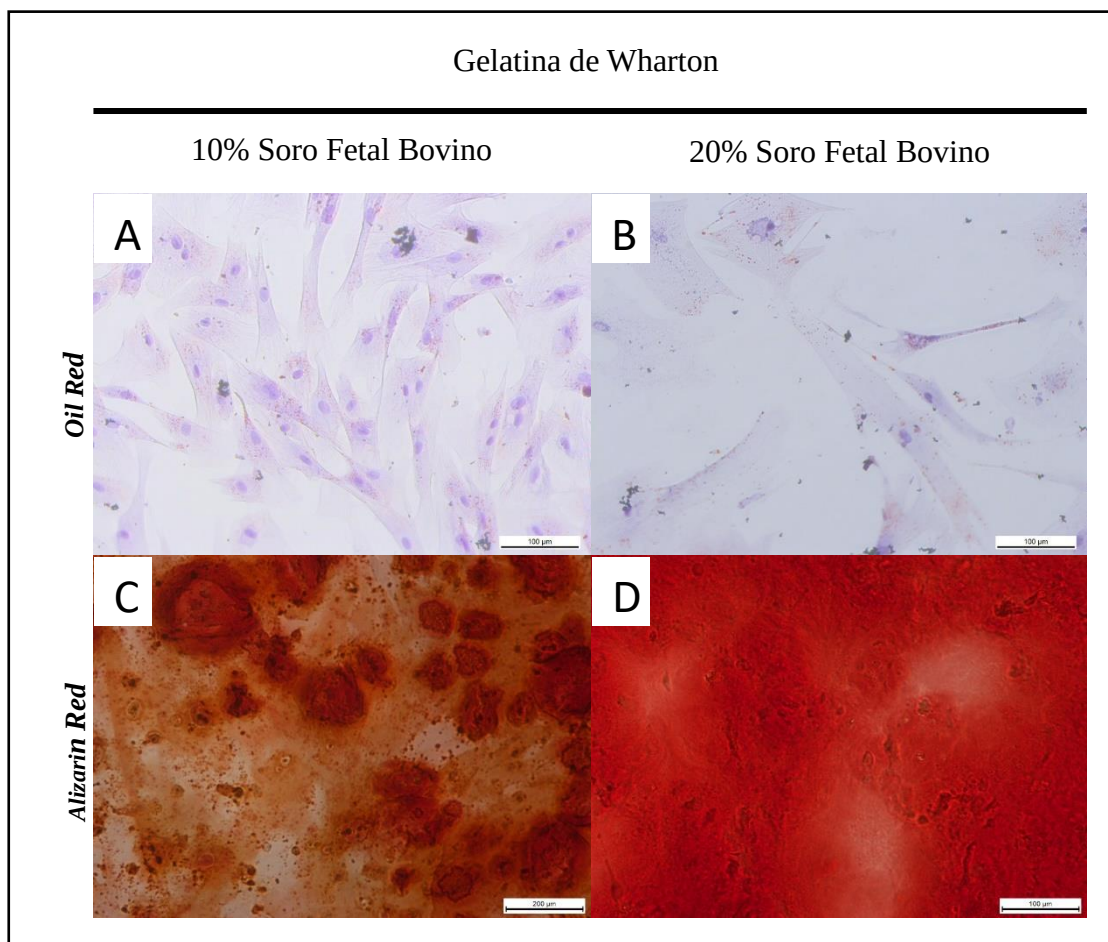


FIGURA 5. Microscopia de luz - Células tronco mesenquimais derivadas de Gelatina de Wharton cultivadas com 10 % (A e C) e 20% (B e D) de SFB, submetidas ao processo de diferenciação nas linhagens adipogênica (A e B) e osteogênica (C e D). Escala: 100μm (A e B) e 200μ (C e D).

No entanto, quando a diferenciação espontânea para linhagem adipogênica foi avaliada, constatou-se um aumento na quantidade das gotículas coradas em vermelho tanto nas CTMs-GW com (10% - Figura 7. G) e 20% de SFB - Figura 7. H) como nas CTMs-TA (10% e 20% SFB - Figura 7. E e F, respectivamente).

No Grupo D_{21esp} também não houve marcação para a linhagem osteogênica em nenhuma das fontes (CTMs-TA e CTMs-GW) seja com 10% de SFB (Figura 8. A e C) ou 20% de SFB (Figura 8. B e D). Da mesma forma, assim como os demais grupos de diferenciação espontânea para a linhagem adipogênica, foi possível observar gotículas lipídicas coradas em vermelho nas duas fontes e concentrações de soro estudadas (Figura 8. E, F, G e H).

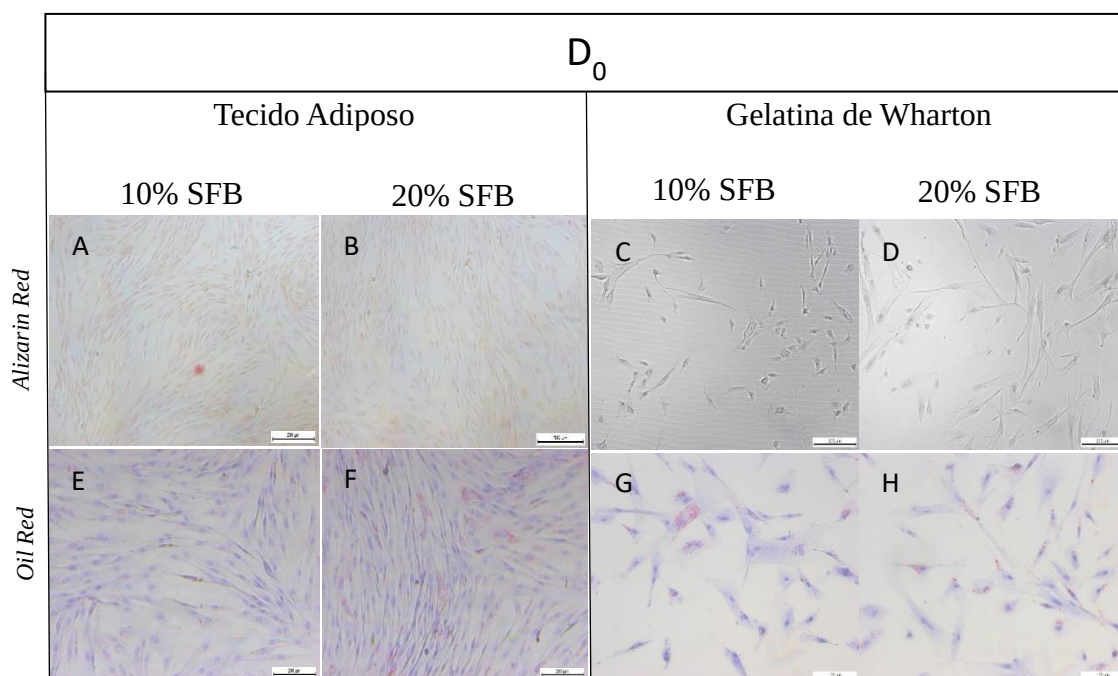


FIGURA 6. Microscopia de luz – Células tronco mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo (A, B, E e F), e Gelatina de Wharton (C, D, G e H), cultivadas com 10% e 20% de SFB, coradas com cinco dias de cultivo (Grupo D₀) para a linhagem osteogênica – Alizarin Red (A, B, C e D), com ausência de qualquer marcação,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

Resultados da expressão gênica (RT-qPCR)

Células do Tecido Adiposo

A análise da expressão genica das CTMs-TA não demonstrou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações de soro utilizadas (10% e 20% de SFB - Tabela 3).

Foi observada uma expressão muito baixa dos genes relacionados à diferenciação adipogênica (*AdipoQ*, *PPARα* e *PPARγ*) no grupo D₁₄, e após a indução da diferenciação adipogênica houve uma diminuição não significativa ($p>0,05$).

Dos genes relacionados à diferenciação osteogênica (D₂₁) o *RUNX2* foi expresso de forma mais acentuada no grupo induzido (D_{21ind}) ($p<0,05$), e o *OSC* manteve sua expressão mesmo após a indução osteogênica ($p>0,05$).

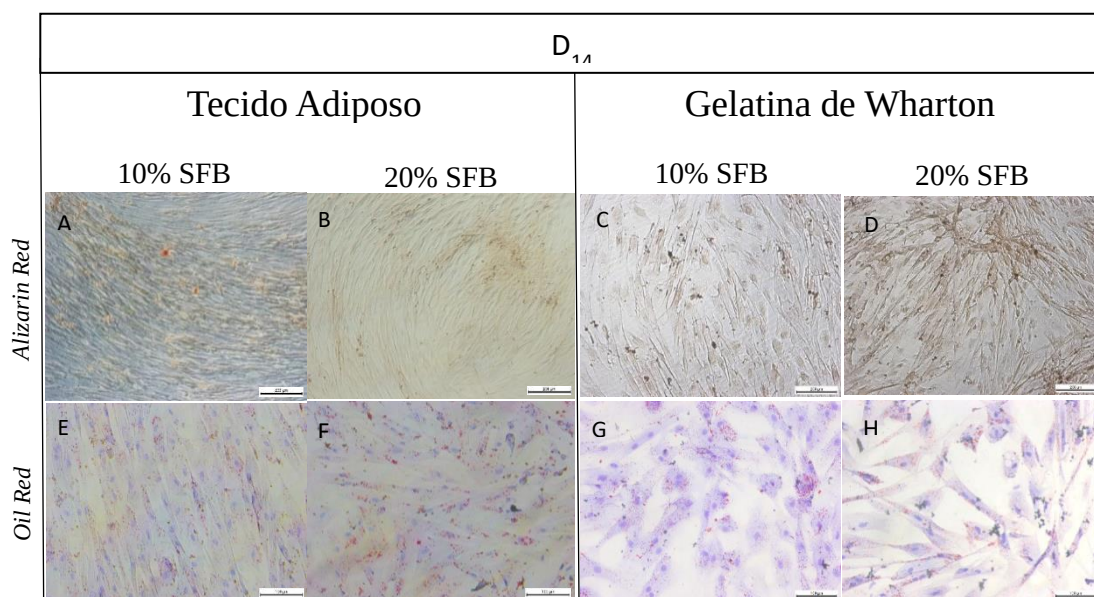


FIGURA 7. Microscopia de luz – Células tronco mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo (A, B, E e F), e Gelatina de Wharton (C, D, G e H), cultivadas com 10% e 20% de SFB, coradas com 19 dias de cultivo (Grupo D₁₄) para a linhagem osteogênica – Alizarin Red (A, B, C e D), com ausência de qualquer marcação, 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 100µm (E, F, G e H).

O *GFAP* não foi expresso em nenhuma das amostras (Tabela 2). Já o gene *NES*, foi expresso em todos os grupos, não sendo alterado pela concentração de SFB utilizada ($p>0,05$). Porém após a indução a diferenciação adipogênica (D_{14ind}) foi possível observar um aumento considerável de sua expressão ($p<0,05$).

O *GDNF*, que é considerado um fator neurotrófico que pode estar expresso em tecidos de origem mesenquimal, e neste trabalho foi observada sua expressão em todos os grupos, o SFB e a diferenciação (adipogênica ou osteogênica) não alteraram sua expressão ($p>0,05$).

Dos genes relacionados à plenipotência (*Oct-4* e *SOX2*) o *SOX2* foi expresso de forma discreta em todos os grupos, mas o grupo D₂₁ apresentou maior expressão quando as CTMs foram induzidas para diferenciação osteogênica ($p<0,05$).

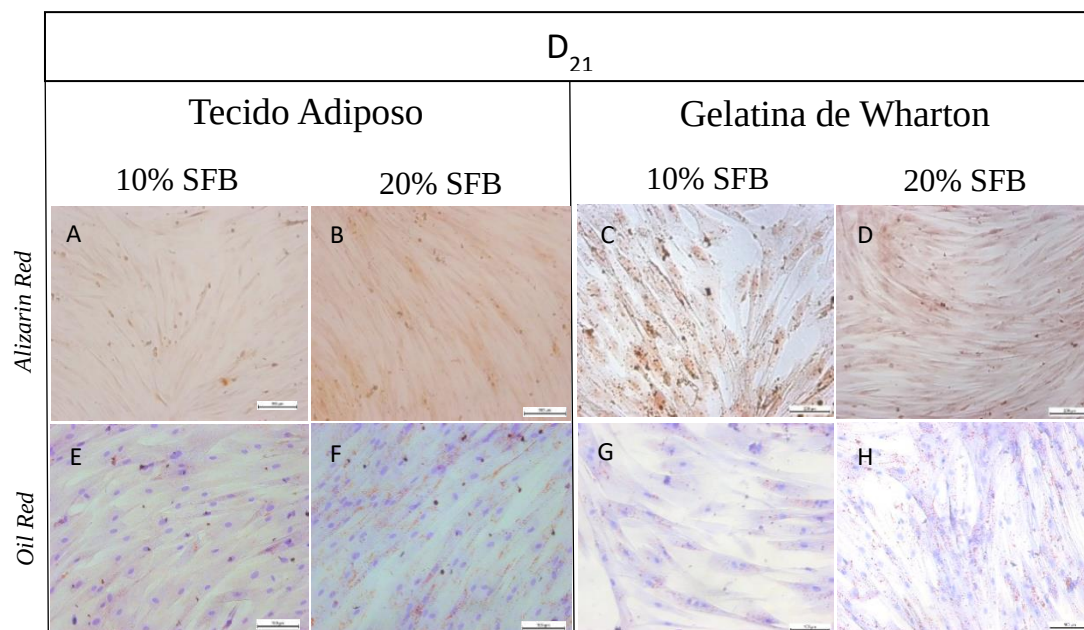


FIGURA 8. Microscopia de luz – Células tronco mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo (A, B, E e F), e Gelatina de Wharton (C, D, G e H), cultivadas com 10% e 20% de SFB, coradas com 26 dias de cultivo (Grupo D₂₁) para a linhagem osteogênica – Alizarin Red (A, B, C e D), com ausência de qualquer marcação, 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 100u (E, F, G e H).

Os genes *CASP3*, *CLU*, *TP53* e *BCL2L1* foram expressos em todos os grupos e a concentração de soro não alterou sua expressão ($p>0,05$). O *CASP3* e o *BCL2L1* tiveram suas expressões aumentadas após a indução a diferenciação adipogênica ($p<0,05$) e osteogênica ($p<0,05$). Já o *CLU* manteve sua expressão após a indução à linhagem adipogênica ($p>0,05$), mas diminuiu sua expressão após a diferenciação osteogênica ($p<0,05$). O *TP53* não teve sua expressão alterada por nenhuma das diferenciações ($p>0,05$).

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.

Grupos	Genes	Tratamentos				MÉDIA	EPM [#]	Probabilidade*		
		Não induzidas		Induzidas						
		(D _{esp})		(D _{ind})				Esp/Ind	SFB	INT ^{##}
		10% SFB	20% SFB	10% SFB	20% SFB					
D ₁₄	<i>AdipoQ</i>	0,00017	0,00015	0,00006	0,00008	0,00011	0,00004	0,493	0,313	0,929
	<i>PPARα</i>	0,00010	0,00010	0,00007	0,00011	0,00010	0,00004	0,797	0,834	0,259
	<i>PPARγ</i>	0,00002	0,000003	0,000005	0,000003	0,00001	0,00001	0,953	0,406	0,837
	<i>GDNF</i>	0,02115	0,02399	0,05724	0,05690	0,03877	0,00755	0,0079*	0,937	0,734
	<i>NES</i>	0,02835	0,03442	0,02140	0,02769	0,02797	0,00524	0,370	0,417	0,988
	<i>GFAP</i>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	**	**	**
	<i>OCT-4</i>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	**	**	**
	<i>SOX2</i>	0,00007	0,00017	0,00008	0,00002	0,00008	0,00005	0,457	0,777	0,453
	<i>CASP3</i>	0,00479	0,00394	0,00940	0,01225	0,00759	0,00193	0,0308*	0,719	0,506
	<i>CLU</i>	0,07284	0,05746	0,06248	0,05004	0,06071	0,00842	0,466	0,260	0,903
	<i>TP53</i>	0,05371	0,04792	0,06330	0,07025	0,05880	0,00575	0,067	0,944	0,445
	<i>C-KIT</i>	0,00004	0,00010	0,00005	0,00000	0,00005	0,00004	0,485	0,625	.
	<i>BCL2L1</i>	0,02729	0,02572	0,10170	0,09449	0,06231	0,00549	<0,0001*	0,578	0,719
<i>VIM</i>	3,44950	3,25370	2,58850	2,97680	3,06715	0,34840	0,265	0,848	0,562	
D ₂₁	<i>RUNX2</i>	0,02508	0,02409	0,04716	0,03664	0,03324	0,00459	0,0168*	0,388	0,473
	<i>OSC</i>	0,01247	0,00681	0,01067	0,01289	0,01058	0,00142	0,303	0,405	0,068
	<i>GDNF</i>	0,01596	0,00620	0,01994	0,02264	0,01619	0,00638	0,305	0,443	0,485
	<i>NES</i>	0,02362	0,01800	0,04355	0,03232	0,02937	0,00883	0,770	0,096	0,693
	<i>GFAP</i>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	**	**	**
	<i>OCT-4</i>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	**	**	**
	<i>SOX2</i>	0,00002	0,00002	0,00008	0,00012	0,00006	0,00002	0,016*	0,509	0,597
	<i>CASP3</i>	0,00366	0,00395	0,01757	0,01346	0,00966	0,00208	0,0002*	0,553	0,389
	<i>CLU</i>	0,07942	0,06694	0,06219	0,03737	0,06148	0,01297	0,022*	0,324	0,741
	<i>TP53</i>	0,03480	0,04178	0,04340	0,03722	0,03930	0,00558	0,801	0,960	0,417
	<i>C-KIT</i>	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	**	**	**
	<i>BCL2L1</i>	0,03503	0,02827	0,10040	0,08228	0,06151	0,00696	<0,0001*	0,224	0,571
	<i>VIM</i>	2,29100	2,82780	1,62910	1,08740	1,95885	0,27560	0,007*	0,995	0,186

[#]Erro Padrão da Média, ^{##}Interação entre as concentrações de SFB, diferenciação e espontânea, *Efeito significativo para a análise de variância quando $p < 0,05$, **Não foram calculados (genes não expressos).

O *C-Kit* não foi expresso no grupo D₂₁, mas apresentou uma discreta expressão nas CTMs do grupo D₁₄. As concentrações de SFB e a indução adipogênica, não

influenciaram a sua expressão ($p>0,05$). A *VIM* foi expressa de forma bastante expressiva em todos os grupos, e as diferentes proporções de SFB não alteraram significativamente sua expressão ($p>0,05$). A indução a diferenciação osteogênica diminuiu a expressão da *VIM* ($p<0,05$), o mesmo ocorrendo com a diferenciação adipogênica mas não de forma significativa ($p>0,05$).

Não foi observada interação dos tratamentos (10% e 20% SFB x Diferenciação adipogênica e 10% e 20% SFB x Diferenciação osteogênica) na expressão gênica de nenhum dos grupos ($p>0,05$).

Células Tronco Mesenquimais da Gelatina de Wharton

Os resultados obtidos com as CTMs-GW (Tabela 3) indicam que as diferentes concentrações de SFB, somente afetaram a expressão do *CASP3*, no grupo D₁₄, o qual foi mais expresso nas células, cultivadas com 20% de SFB.

Não foi observado a expressão do gene relacionado à linhagem pluripotente *Oct-4* e o *SOX2* apresentou expressão sem diferença significativa nos grupos analisados.

Considerando o efeito da diferenciação (espontânea ou induzida) das CTMs-GW observamos que no grupo D₁₄ os genes relacionados à linhagem adipogênica não expressaram o *PPAR γ* , mas expressaram, sem diferença significativa o *AdipoQ* e *PPAR α* .

Dos genes relacionados à diferenciação osteogênica, o *RUNX2* não apresentou diferença significativa na sua expressão quando as amostras foram induzidas (grupo D_{21ind}). Diferentemente o *OSC* apresentou maior expressão nas CTMs que foram submetidas a diferenciação induzida ($p<0,05$).

O *GFAP*, gene da linhagem neurogênica, não foi expresso em nenhum dos grupos. Já o *GDNF* foi expresso em todos os grupos. O *NES* também foi expresso em todos os grupos, porém apresentou maior expressão nas células que não sofreram indução à diferenciação adipogênica ($p<0,05$).

Dos genes relacionados à apoptose o *CLU* apresentou maior expressão nas células não induzidas a diferenciação (D_{14esp} e D_{21esp} - $p<0,05$). O mesmo aconteceu com o *TP53* no grupo D_{14esp} ($p<0,05$). O *CASP3* não apresentou diferença em sua expressão após a indução a diferenciação ($p>0,05$) e o *BCL2L1* teve expressão

significativamente maior ($p < 0,05$) nas células induzida a diferenciação, tanto à linhagem adipogênica (D_{14ind}) como osteogênica (D_{21ind}).

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.

		Tratamentos								
		Não Induzidas (D _{esp})		Induzidas (D _{ind})		Probabilidade*				
Grupos	Gene	10% SFB	20% SFB	10% SFB	20% SFB	MÉDIA	EPM [#]	Esp/Ind	SFB	INT ^{##}
D ₁₄	<i>AdipoQ</i>	0,000134	0,000049	0,001745	0,001437	0,0008	0,00052	0,060	0,762	0,982
	<i>PPARα</i>	0,0001	0,0001	0,0000	0,0002	0,0001	0,00005	0,196	0,213	0,143
	<i>PPARγ</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	**	**	**
	<i>GDNF</i>	0,9953	0,9944	0,9953	0,9934	0,9946	0,00053	0,522	0,090	0,491
	<i>NES</i>	0,0052	0,0071	0,0001	0,0007	0,0033	0,00119	0,006*	0,474	0,684
	<i>GFAP</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	**	**	**
	<i>OCT-4</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	**	**	**
	<i>SOX2</i>	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00001	0,0271*	0,479	0,479
	<i>CASP3</i>	0,0023	0,0042	0,0032	0,0047	0,0036	0,00064	0,463	0,101	0,827
	<i>CLU</i>	0,0922	0,0813	0,0161	0,0226	0,0530	0,01021	0,0007*	0,883	0,559
	<i>TP53</i>	0,0236	0,0208	0,0126	0,0140	0,0178	0,00198	0,009*	0,818	0,459
	<i>C-KIT</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	**	**	**
	<i>BCL2L1</i>	0,0175	0,0179	0,0734	0,0656	0,0436	0,00894	0,0018	0,774	0,754
	<i>VIM</i>	2,2954	2,6964	1,0531	1,5884	1,9084	0,18630	0,001	0,103	0,804
D ₂₁	<i>RUNX2</i>	0,0358	0,0115	0,0086	0,0081	0,0160	0,00537	0,069	0,130	0,145
	<i>OSC</i>	0,0054	0,0067	0,0132	0,0616	0,0217	0,01504	0,007*	0,591	0,783
	<i>GDNF</i>	0,0082	0,0070	0,0044	0,0152	0,0087	0,00343	0,650	0,346	0,243
	<i>NES</i>	0,0032	0,0044	0,0087	0,0024	0,0047	0,00364	0,689	0,727	0,927
	<i>GFAP</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	**	**	**
	<i>OCT-4</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	**	**	**
	<i>SOX2</i>	0,0000	0,0000	0,0001	0,0005	0,0002	0,00019	0,1095	0,745	0,544
	<i>CASP3</i>	0,0034	0,0036	0,0040	0,0056	0,0042	0,00096	0,363	0,535	0,637
	<i>CLU</i>	0,0864	0,0863	0,0734	0,0289	0,0720	0,01857	0,166	0,403	0,404
	<i>TP53</i>	0,0165	0,0153	0,0173	0,0147	0,0159	0,00364	0,989	0,724	0,892
	<i>C-KIT</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000	**	**	**
	<i>BCL2L1</i>	0,0359	0,0290	0,1210	0,0912	0,0693	0,01630	0,009*	0,442	0,630
	<i>VIM</i>	2,0186	1,7076	1,0294	0,7367	1,3731	0,36060	0,081	0,566	0,986

[#]Erro Padrão da Média, ^{##}Interação entre as concentrações de SFB, diferenciação e espontânea, *Efeito significativo para a análise de variância quando $p < 0,05$, **Não foram calculados (genes não expressos).

O *C-KIT* não foi expresso em nenhum dos grupos analisados, e o *VIM*, como esperado, apresentou alta expressão em todos os grupos, porém foi possível observar que sua expressão foi maior nas CTMs não induzidas do grupo D₁₄ (D_{14esp}) e D₂₁. Após a indução da diferenciação ocorreu uma redução de sua expressão de forma significativa no grupo D_{14ind} ($p < 0,05$), mas não significativa no grupo D₂₁ ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

As CTMs originadas do tecido adiposo e Gelatina de Wharton são amplamente estudadas e já foram determinadas suas características para o isolamento e cultivo. Além disso a facilidade de coleta, multipotencialidade e imunoantigenicidade das CTMS-TA e GW as tornam candidatas para a aplicação clínica.

Neste sentido, torna-se necessário estudos que indiquem quais as melhores condições de cultivo e armazenamento para a manutenção das CTMs até o momento de sua utilização.

O soro fetal bovino é um composto importante nos meios de cultivo celular. O SFB ajuda na adesão das células ao substrato e possui fatores de crescimento e outras moléculas importantes, sendo utilizados em todas as etapas do processamento, manutenção e criopreservação celular. Apesar da existência de resultados positivos com sua substituição, a eficiência do cultivo com SFB é mais alta e portanto, ainda hoje é o aditivo mais utilizado [35–38].

Entretanto não existe um consenso sobre a concentração ideal de SFB a ser utilizada para o cultivo de CTMs [39–43]. Pensando nisso, neste experimento realizou-se o teste de proliferação celular em meios contendo 10% e 20% de SFB, observando-se que o uso de 20% de SFB resultou em maior proliferação das CTMs estudadas.

Apesar de o SFB estimular a proliferação celular, estudos indicam que altas concentrações deste composto pode induzir a diferenciação espontânea das células para as linhagens osteogênica e adipogênica [26,44]. No presente estudo, a indução da diferenciação adipogênica não foi afetada pela concentração de SFB utilizada em nenhuma das amostras estudadas. Por outro lado, nas amostras que não sofreram

tratamento para indução de diferenciação adipogênica foi observada coloração com *Oil Red* de gotículas citoplasmáticas semelhantes a lipídeo.

A presença de gotículas lipídicas nas células não induzidas para adipogênese foi observada tanto em células do tecido adiposo como em células da GW, e apareceu com maior intensidade nos grupos tratados com 20% de SFB. Acredita-se que os ácidos graxos presentes no SFB podem influenciar no depósito de lipídios e consequentemente na diferenciação adipogênica, aumentando assim a reserva lipídica já existente nas membranas celulares [26,45]. Contudo para afirmar que ocorreu diferenciação espontânea é necessário a utilização de métodos mais específicos como a análise da secreção de fatores específicos de pré-adipócitos e adipócitos [46,47]. No presente experimento, a presença das gotículas lipídicas foi evidente em todos os grupos. A expressão dos transcritos *PPAR α* e *AdipoQ* nas fontes estudadas indica que as células estão em processo de diferenciação. Entretanto, a baixa expressão do *PPAR γ* nas CTMs-TA e ausência nas CTMs-GW demonstram um processo de diferenciação ainda inicial e imaturo, confirmando a baixa potencialidade das CTMS-GW em se diferenciar na linhagem adipogênica previamente descrita [48–50].

A utilização das duas concentrações de SFB, no cultivo celular, não influenciou a diferenciação osteogênica, tanto espontânea como induzida. Nas amostras de tecido adiposo observou-se uma maior expressão do transcrito *RUNX2* no grupo em que as células sofreram indução para diferenciação osteogênica, enquanto o *OSC* teve sua expressão mantida, indicando um processo inicial de diferenciação. Uma situação semelhante foi observada por Uranio et al. [40] em células obtidas de tecidos fetais. Entretanto, no presente experimento nas CTMs-GW, a expressão de *RUNX2* foi baixa independente do processo indução. Diferentemente, a expressão do *OSC* foi significativamente maior nas células induzidas à diferenciação osteogênica. A expressão do *OSC* é um indicativo importante para confirmação da diferenciação de CTMs em osteoblastos [51]. Nas amostras que não passaram pelo processo de indução a diferenciação, nenhum dos fatores sofreu elevação de sua expressão, confirmando que não ocorreu diferenciação osteogênica espontânea.

A ausência da expressão dos transcritos *OCT-4* e *Sox2* nas CTMs-GW e do *Oct-4* nas CTMs -TA, bem como a expressão do *VIM*, confirmam a linhagem mesenquimal das CTMs utilizadas neste experimento. Curiosamente houve uma expressão discreta do

SOX2, gene característico da massa celular interna de embriões, nas CTMs-TA. Esta expressão aumentou de forma significativa após a indução osteogênica.

O *NES* atualmente é considerado um marcador importante de CTMs, e sua expressão positiva amplia as possibilidades terapêuticas, para doenças do sistema nervoso central [52]. No nosso trabalho, ele foi expresso tanto nas CTMs-TA como GW, e essa expressão foi ainda maior nas células induzidas à linhagem osteogênica. Características semelhantes foram demonstrados por Ono et al. [53], que demonstraram que percussores mesenquimais Nes⁺ são essenciais para a diferenciação na linhagem osteoblástica.

O *GDNF* é um membro da família do Fator de Crescimento Transformador (TGF) e descrito como neuroprotetor [54] podendo estar expresso em tecidos adultos de origem mesenquimal [55]. Zhang et al. [56] sugeriram que produto deste gene pode estimular CTMs para a diferenciação à linhagem epitelial. No presente trabalho a expressão do *GDNF* foi observada em todas as amostras de TA e GW, concordando com o observado por Yan et al. [57]. Curiosamente as CTMs-TA induzidas à diferenciação adipogênica apresentaram maior expressão de *GDNF*. É possível que esta característica esteja relacionada com a função protetora do *GDNF* [58,59] contra o processo de diferenciação, que pode ser considerado um fator estressante para a célula.

A apoptose é um tipo de morte celular programada, que ocorre fisiologicamente ou por estímulos como infecção viral, estresse celular e danos ao DNA. Neste trabalho utilizamos a hipótese de que o meio indutor e o processo de diferenciação podem agir como um fator de estresse celular e, portanto, ocasionar a apoptose. Nesse sentido, no nosso trabalho, foi possível observar a expressão do *TP53* em todas amostras analisadas e com maior intensidade nas CTMs-TA induzidas à linhagem adipogênica. Isso pode acontecer, pois já foi descrito que o *TP53* regula alterações do metabolismo energético causadas pelo estresse [60].

O mesmo foi observado, quando avaliamos o fator pró-apoptótico *CASP3* que apresentou um aumento significativo apenas nas CTMs-TA induzidas à diferenciação adipogênica e nas CTMs-WJ cultivadas com 20% de SFB, indicando a ocorrência de morte celular em maior intensidade, uma vez que este fator é o efetor da apoptose [61–63].

Adicionalmente o *CLU*, foi expresso em todas as amostras analisadas das duas fontes, porém houve uma diminuição significativa na expressão após a indução osteogênica. Resultado semelhante foi encontrado por Abdallah et al. [64] que sugeriram que a alta concentração de Clusterina no meio pode reduzir a diferenciação osteogênica. Além disso, Yang & Qin [65] sugeriram que a baixa expressão de *CLU* pode induzir a parada do ciclo celular através da via P53.

Por outro lado, foi possível observar alta expressão do *BCL2L1* em todas as amostras, bem como aumento significativo nas células induzidas. Esse aumento de expressão indica uma regulação protetora para as células e mesmo que as vias e caminhos para o aumento da expressão ainda não sejam totalmente elucidados, essa sinalização evidencia um potencial terapêutico para essas células [66,67].

Concluimos que a concentração de SFB utilizada influencia apenas a proliferação das CTMs-GW. A modificação morfológica observada, que poderia sugerir diferenciação espontânea para adipócitos, não foi confirmada através da expressão gênica. Por outro lado, há indícios de que a indução às duas linhagens de diferenciação provocam alterações na expressão gênica das CTMs-TA e GW, indicando que as células responderam aos estímulos produzindo fatores relacionados ao estresse e a proteção a morte celular, sendo esta característica fortemente observada na indução adipogênica. E finalmente, a associação da expressão de genes considerados protetores como *NES*, *GDNF* e *BCL2L1* nas CTMs, não induzidas à diferenciação, ampliam as perspectivas para sua utilização terapêutica.

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, Pitzenberger 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.