

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL EXPANDIDA  
*IN VITRO* EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA E NORMÓXIA**

ANNELISE PEZZI

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL EXPANDIDA  
*IN VITRO* EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA E NORMÓXIA**

ANNELISE PEZZI

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia  
Mariano da Rocha Silla. Tese de  
doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas,  
UFRGS, para obtenção do título de  
doutor.

Porto Alegre

2016

*BANCA EXAMINADORA*

Dra. Bruna Amorin

Dra. Maria Aparecida Lima da Silva

Dra. Norma Anair Possa Marroni

Dra. Tânia Weber Furlanetto

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

...À Dra. Lúcia pela orientação em todos os momentos de execução deste trabalho, pelo conhecimento e experiência transmitidos, pelo incentivo e entusiasmo com que acreditou no meu trabalho;

...Aos colegas de laboratório: Bruna Zambonato, Álvaro Laureano e Maria Aparecida da Silva pela amizade, companheirismo e apoio;

...Às amigas do coração: Vanessa Valim e Bruna Amorin pelo constante incentivo pessoal e profissional;

...À família que me foi permitido escolher: Alice Dahmer e Felipe Klein;

...À equipe técnica do CTC que permite o seu perfeito funcionamento: Raul Rodrigues e Andriele Guterres;

... A Eduardo Chiela pela coorientação;

...À minha família e namorado pelo mais importante incentivo e apoio que se pode ter.

## RESUMO

**Introdução:** As células-tronco mesenquimais (CTMs) são consideradas células estromais multipotentes não hematopoiéticas com propriedades de autorrenovação e de diferenciação. Condições ótimas para cultura das CTMs tem sido alvo de investigação. A tensão de oxigênio utilizada no cultivo vem sendo estudada e parece exercer um papel importante no comportamento biológico de células mesenquimais. **Objetivos:** Caracterizar as CTMs em condições de hipóxia e normóxia comparando suas características morfológicas e funcionais. **Métodos:** Foram cultivadas células-tronco mesenquimais obtidas de 15 doadores saudáveis de medula óssea. As CTMs obtidas de cada doador foram separadas em duas condições de cultivo, normóxia (21% de O<sub>2</sub>) e hipóxia (três doadores em 1%, três doadores em 2%, cinco doadores em 3% e quatro doadores em 4% de O<sub>2</sub>) até segunda passagem. As CTM foram avaliadas quanto à proliferação, diferenciação, imunofenotipagem, tamanho e complexidade celular, estresse oxidativo, atividade mitocondrial e autofagia. **Resultados:** As condições de cultivo empregadas não pareceram afetar as características imunofenotípicas e plasticidade celular, no entanto as células submetidas à hipóxia apresentaram menor tamanho e maior complexidade celular, além de menor proliferação ( $p < 0.002$ ). Além disso, as células cultivadas em baixas tensões de O<sub>2</sub> apresentaram menor atividade mitocondrial ( $p < 0.03$ ) e uma menor tendência à autofagia embora o stress oxidativo não tenha diferido entre os grupos ( $p < 0.39$ ). **Conclusão:** A tensão de oxigênio parece ser um regulador chave na adaptação celular *in vitro* e efeitos metabólicos subjacentes a esta variável continuam a ser descritos. A heterogeneidade ou até mesmo escassez de resultados acerca do impacto da concentração de oxigênio utilizada na expansão de CTM sublinha a necessidade de novos estudos, a fim de aperfeiçoar as condições de cultivo e expansão e obter maior segurança e eficácia terapêutica.

**Palavras-chave:** Células-tronco Mesenquimais, Hipóxia, Estresse Oxidativo, Atividade Mitocondrial e Autofagia.

## ABSTRACT

**Introduction:** Mesenchymal stem cells (MSC) are considered multipotent stromal, non-hematopoietic cells with properties of self-renovation and differentiation. Optimal conditions for culture of MSC have been under investigation. The oxygen tension used for cultivation has been studied and appears to play an important role in biological behavior of mesenchymal stem cells. **Objectives:** Characterize MSC in hypoxia and normoxia conditions comparing their morphological and functional characteristics. **Methods:** bone marrow-derived mesenchymal stem cells obtained from 15 healthy donors and cultured. MSC obtained from each donor were separated into two cultivation conditions normoxia (21 % O<sub>2</sub>) and hypoxia (three donors at 1 %, three donors at 2 %, five donors at 3 %, and four donors at 4 % O<sub>2</sub>) up to passage two. MSC were evaluated for proliferation, differentiation, immunophenotyping, size and cell complexity, oxidative stress, mitochondrial activity, and autophagy. **Results:** Culture conditions applied didn't seem to affect immunophenotypic features and cellular plasticity. However, cells subjected to hypoxia showed smaller size and greater cellular complexity, besides lower proliferation (p<0.002). Furthermore, cells cultured in low O<sub>2</sub> tension had lower mitochondrial activity (p<0.03) and a reduced tendency to autophagy, although oxidative stress didn't vary among groups (p< 0.39). **Conclusion:** Oxygen tension seems to be a key regulator of cellular adaptation in vitro, and metabolic effects underlying this variable remain undescribed. Heterogeneity or even lack of results on the impact of oxygen concentration used for expanding MSC highlights the need for further research, in order to optimize conditions of cultivation and expansion and achieve greater safety and therapeutic efficacy.

**Keywords:** Mesenchymal Stem Cell, Hypoxia, Reactive oxygen species, mitochondrial activity, autophagy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estratégia de busca de referências bibliográficas .....	15
Figura 2	Morfologia da célula-tronco mesenquimal em microscopia de 400x.....	20
Figura 3	Interação parácrina das CTMs com o sistema imune inato e adaptativo.....	28
Figura 4	Representação da micro e macroautofagia .....	42

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Aplicações clínicas das células-tronco mesenquimais .....	29
Tabela 2	Concentração de oxigênio em diferentes órgãos e tecidos .....	31
Tabela 3	Efeito da hipóxia na proliferação.....	35



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
APC	Apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CBFa1	Fator de transcrição específico para osteoblastos
CFU-F	Unidades formadoras de colônias fibroblastóides
CTH	Células-tronco hematopoiética
CT	Célula-tronco
CTM	Célula-tronco mesenquimal
COX4	Citocromo c oxidase
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
GLUT	Transportador de glicose
GPx	Glutaciona peroxidase
HGF	Fator de crescimento hepatóide
HLA-I	Antígeno leucocitário humano classe I
HLA-II	Antígeno leucocitário humano classe II
HIF	Fator induzido por hipóxia
IBMX	Isobutil-metilxantina
IDO	Enzima indoleamina
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon-gama

ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
LP	Lisado plaquetário
M-CSF	Fator de crescimento estimulador de macrófago
MO	Medula óssea
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio reduzido
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa beta
NK	<i>Natural killer</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDH	Piruvato desidrogenase
PDHK 1	Piruvato desidrogenase cinase 1
PGE2	Prostaglandina 2
pH	Potencial hidrogeniônico
PPAR- $\gamma$	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TSG6	Proteína indutora do fator de necrose tumoral 6
53BP1	Proteína de ligação 1 p53

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 CÉLULAS-TRONCO.....	16
2.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	17
<b>2.2.1 Ontogenia e fontes de CTMs</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.2 Características morfológicas e imunofenotípicas</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.3 Isolamento e cultivo de CTMs de medula óssea</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.4 Diferenciação</b> .....	<b>23</b>
2.2.4.1 <i>Diferenciação adipogênica</i> .....	24
2.2.4.2 <i>Diferenciação osteogênica</i> .....	24
2.2.4.3 <i>Diferenciação condrogênica</i> .....	25
<b>2.2.5 Propriedades imunológicas</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.6 Aplicações clínicas</b> .....	<b>28</b>
2.3 CTM EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA.....	30
<b>2.3.1 Sobrevivência e HIF-1</b> .....	<b>32</b>
<b>2.3.2 Proliferação e ciclo celular de CTM em condições de hipóxia</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3.3 Diferenciação de CTM em condições de hipóxia</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3.4 Morfologia e imunofenótipo de CTM em condições de hipóxia</b> .....	<b>36</b>
<b>2.3.5 Hipóxia e estresse oxidativo</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3.6 Hipóxia e atividade mitocondrial</b> .....	<b>38</b>
<b>2.3.7 Hipóxia e autofagia</b> .....	<b>41</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>44</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	45
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>
<b>6. ARTIGO I</b> .....	<b>59</b>

7. ARTIGO II.....	68
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>88</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>89</b>
10. ANEXO 1.....	90

## 1. INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs), são células-tronco multipotentes, consideradas não hematopoiéticas, com propriedade de autorrenovação e diferenciação em tecidos de origem mesodérmica. Foram primeiramente descritas por Friedenstein e col. (1), na década de 70, como células morfológicamente semelhantes a fibroblastos com alta aderência a superfícies plásticas.

As CTMs podem ser isoladas a partir de diversos tecidos como: medula óssea (MO), tecido adiposo e polpa dentária. Algumas de suas propriedades singulares apontam as CTMs como ideias para terapia celular de várias patologias. O seu potente efeito imunomodulador as tornam uma abordagem promissora para tratar condições auto e alo imunes. A aplicação das CTMs na medicina regenerativa está embasada em sua capacidade de diferenciação e restauração da homeostase tecidual, destacando-se ainda pela capacidade migratória ao local de lesão e ação parácrina, além da baixa imunogenicidade (2-4).

Ainda que seja possível o isolamento de CTM a partir de várias fontes de tecido, sua concentração nestes é muito baixa(5, 6), tornando impossível alcançar uma dose adequada para sua utilização clínica – tipicamente 50-200 milhões de células - sem expansão *in vitro* (7).

Do isolamento até a utilização clínica, estas células são invariavelmente submetidas a condições ambientais diferentes. A questão de condições ótimas de cultura tem sido alvo de investigação por muitos anos. Atualmente a maioria dos procedimentos de expansão de CTM são realizados utilizando uma concentração de oxigênio semelhante à atmosférica (21% de O<sub>2</sub> – normóxia), cerca de 4-10 vezes superior a encontrada em seus nichos naturais (8, 9).

Nos últimos anos, o interesse no potencial das CTMs para uso clínico levou ao crescente estudo do impacto das condições de cultivo e expansão no comportamento e morfologia destas células, particularmente a tensão de oxigênio utilizada. A influência deste

fator na morfologia, fenótipo, capacidade proliferativa e funcional das CTMs tem sido estudado de forma crescente ainda que com resultados controversos (10-17).

Sendo assim, o cultivo celular em tensão de oxigênio que melhor representa a situação *in vivo*, poderia interferir em diferentes aspectos celulares, portanto, é de grande importância a caracterização e comparação de CTMs cultivadas em hipóxia e normóxia com relação a aspectos morfológicos, proliferativos, metabólicos e funcionais com o objetivo de otimizar condições de cultivo adequadas para o uso clínico a fim de obter maior segurança e eficácia terapêutica.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura está focada na caracterização *in vitro* de células-tronco mesenquimais em condições de cultivo de hipóxia e normóxia. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: Library of Medicine (PubMed), Scientific Electronic Library Online (SciELO) e LILACS. Foram realizadas buscas utilizando os termos “*Mesenchymal stem cell*”, “*hypoxia*”, “*reactive oxygen species*”, “*autophagy*” e “*mitochondria*” e suas combinações. Os resultados destas buscas estão apresentados na figura abaixo (figura 1). Para composição da revisão da literatura foram também consultados o banco de teses da CAPES, dissertações, capítulos de livros e o web site *clinicaltrials.gov*.

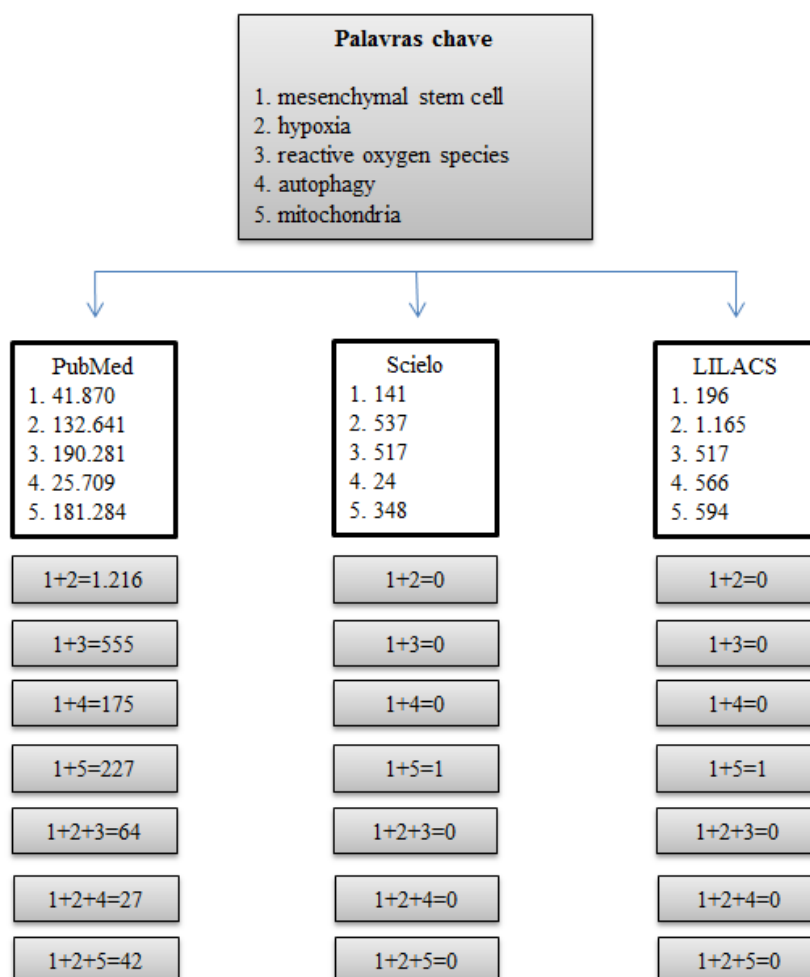


Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas. Fonte: Elaborado pela autora (2016).

## 2.1 CÉLULAS-TRONCO

Em definição funcional, as células-tronco (CT) são células indiferenciadas dotadas de capacidade de autorrenovação e diferenciação em progenitores específicos, bem como células efetoras completamente diferenciadas. Uma importante propriedade fundamental é a faculdade de divisão assimétrica, a qual origina uma célula que retém as características da célula-mãe e outra com possibilidade restrita de diferenciação (18).

Entende-se por diferenciação celular o processo de especialização gradual das células em termos estruturais e funcionais. À medida que as células se comprometem em uma determinada linhagem celular, há uma diminuição progressiva do seu potencial de diferenciação, ou seja, o comprometimento celular precede a diferenciação morfológica e funcional (19, 20).

As CT podem ser classificadas segundo a sua potencialidade em totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. As CT totipotentes são as únicas células capazes de gerar um organismo completo, ou seja, todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários. Os únicos exemplos de células-tronco totipotentes são o zigoto e as primeiras 10 a 16 células provenientes da mórula inicial a qual precede o estágio de blastocisto. Por sua vez, são classificadas como CT pluripotentes as células provenientes da massa interna do blastocisto, também chamadas de CT embrionárias, as quais retêm a capacidade de gerar células dos três folhetos embrionários - ectoderma, mesoderma e endoderma. Por fim, as células chamadas CT multipotentes podem diferenciar-se em um número limitado de células sendo também chamadas de células-tronco adultas (CTAs), as quais estão presentes em órgãos ou tecidos de um organismo adulto e são responsáveis pelo reparo de lesões e remodelação destes, mantendo a sua integridade. As células-tronco hematopoiéticas (CTHs), as células-tronco neurais do cérebro e as células-tronco mesenquimais são exemplos de células-tronco multipotentes (21-25).



Existem ainda células oligopotentes, capazes de gerar células ligeiramente mais restritas a uma linhagem específica em comparação com as CT multipotentes, e as unipotentes, as quais originam apenas um único tipo celular maduro (26). Estas duas últimas devem ser consideradas células progenitoras ao invés de CT.

As primeiras CTAs estudadas e, conseqüentemente, as mais bem caracterizadas são as CTHs provenientes da medula óssea. Estas células são capazes de diferenciar-se nos constituintes mieloides e linfoides sanguíneos e há muito vêm sendo utilizadas com sucesso em transplantes para pacientes com doenças hematológicas (27). Mais tarde foi isolado outro tipo de CTA, também constituinte da MO, porém com propriedades diferentes das hematopoiéticas: as células-tronco mesenquimais. Elas receberam essa denominação por derivarem do folheto embrionário intermediário, o mesoderma, o qual é responsável pela formação dos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (28).

## 2.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A CTM é considerada uma célula multipotente não hematopoiética com propriedade de autorrenovação e capacidade de diferenciação em outras células de origem mesodérmica: osteócitos, condrócitos e adipócitos (28, 29). As CTMs foram descritas primeiramente por Friedenstein e col.(1) na década de 70, que as descreveu como células morfológicamente semelhantes a fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície plástica. Estas células podem ser isoladas a partir de vários tecidos, entre os mais comumente utilizados estão medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical (30-38).

As CTMs, sobretudo aquelas oriundas da medula óssea humana, diferem muito quanto à nomenclatura utilizada. Inicialmente foram chamadas de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F, do inglês *colony-forming unit-fibroblasts*), devido à capacidade de adesão ao plástico dos frascos de cultivo e formação de colônias de células similares aos fibroblastos (20). Foram similarmente denominadas células-tronco ou progenitoras

mesenquimais, pois se diferenciavam em células não hematopoiéticas (21), e também, células estromais da MO, pois pareciam advir de estruturas de suporte e podiam ser utilizadas como *feeder layer* (camada de alimentação) para o crescimento de CTH *in vitro* (15).

Em 2005, a sociedade internacional para terapia celular (ISCT, do inglês *International Society for Cellular Therapy*) propôs uma nova nomenclatura para designar a população de células fibroblastóides que crescem aderentes ao plástico, isoladas dos mais diversos tecidos e com capacidade de diferenciação multipotencial *in vitro*: células mesenquimais estromais multipotentes. A ISCT propõe ainda, que o termo célula-tronco mesenquimal seja utilizado para aquelas que indubitavelmente preencham as características de células-tronco e ressalta que estas células compõem uma subpopulação das células aderentes ao plástico. A sigla CTM pode ser utilizada para estas situações, mas deve ser corretamente identificada (39).

### **2.2.1 Ontogenia e fontes de CTM**

O conhecimento a cerca da origem do desenvolvimento de CTMs ainda é bastante limitado. Acredita-se, no entanto, que as CTMs descendam de uma célula pluripotente do mesoderma e possuam um desenvolvimento embrionário paralelo às CTHs (40).

Notavelmente, um estudo recente mostrou que a primeira linhagem precursora de CTM durante o desenvolvimento embrionário é gerada, na verdade, a partir de células SOX-1 positivas do neuroepitélio ao invés do mesoderma, pelo menos em parte, através de uma fase intermédia da crista neural (41). Suportando esta teoria, foi recentemente demonstrado que as células derivadas da crista neural migram para a MO através da corrente sanguínea (42). Estas células estão ainda presentes na medula óssea de adultos e retêm a capacidade de diferenciação *in vitro* em neurônios, células gliais e miofibroblastos. A potencial ligação, se existir, entre estas células, identificadas por Takashima e col. (41) e as CTMs isoladas de acordo com o protocolo do Friedenstein e col. (1) continua a ser estabelecida.

A principal fonte de CTMs é a medula óssea. Estas células constituem, no entanto, apenas uma pequena fração do número total de células provenientes deste tecido. Pittenger e col. (43) demonstraram que apenas 0,02% -0,001% de células mononucleares isoladas por gradiente de densidade dão origem a colônias de células fibroblastóides aderentes ao plástico (44). No entanto, o número de CTMs isoladas a partir deste tecido pode variar ainda que obtidas a partir do mesmo doador em momentos diferentes (6).

Na medula óssea as CTMs estão localizadas na fração estromal e fornecem suporte para o crescimento e diferenciação de CTHs e, por conseguinte, para hematopoese (45). Ao evidenciar a correlação inversa entre a presença de CTMs no cordão umbilical e a idade gestacional, também observada para as CTHs, sugere-se que as células mesenquimais migrem precocemente, durante o desenvolvimento, dos seus sítios primários para outros tecidos fetais (46).

Como já descrito acima, além da MO, as células-tronco mesenquimais podem ser encontradas em outros órgãos e tecidos como: tecido adiposo, polpa dentária, cordão umbilical, membrana sinovial, fígado e pulmão fetal, placenta, endométrio, osso trabecular ou compacto, rim e cartilagem articular (31-34, 36-38, 47-49). A presença de CTMs no sangue periférico ainda é discutida. Fernandez e col. (50) reportaram a presença de CTM no sangue periférico mobilizado. Em contrapartida, outros estudos demonstraram que a CTM embora circulante no sangue periférico, é extremamente rara (51, 52).

A quantidade de CTMs no organismo, de maneira geral, tende a diminuir com a idade e na presença de algumas patologias. Um maior número de CTMs é encontrado em recém-nascidos e decresce ao longo da vida, chegando pela metade aos 80 anos (53). Acerca disso, Stenderup e col. (54), ao avaliarem dois grupos de doadores saudáveis, com idades que variavam entre 18 a 29 e 66 a 81 anos, encontraram uma capacidade de proliferação inferior no grupo mais velho comparado ao grupo mais jovem. Concluíram ainda, que as CTMs advindas

de doadores idosos, apesar de manterem a capacidade de diferenciação, apresentam uma aceleração no processo de senescência.

### **2.2.2 Características morfológicas e imunofenóticas**

Por definição, em cultivo, as CTMs são capazes de formar colônias a partir de uma única célula precursora (55). Estas colônias com quantidade maior ou igual a 50 células, quando contadas após 10 a 14 dias de cultivo das células mononucleares da MO, são chamadas de CFU-F (56, 57).

Morfológicamente, estas células apresentam aspecto fibroblastóide alongado, fusiforme e pontiagudo, citoplasma abundante com núcleo grande central em formato oval e eucromático. Observam-se, em microscopia, cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, vacúolos lipídicos, corpos lisossomais e grande quantidade ribossomos livres citoplasmáticos, além de filamentos de actina em suas extremidades (figura 2) (58). Quando senescentes, as CTMs são grandes, largas, achatadas, de lenta proliferação e expressam uma  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (59).

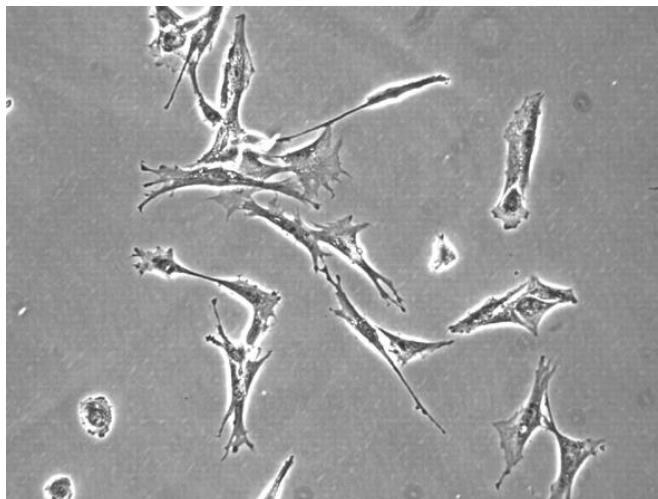


Figura 2: Morfologia da célula-tronco mesenquimal em microscopia de 400x. Fonte: adaptado de Salazar K. e col. (60).

Quanto à imunofenotipagem, as CTMs apresentam poucos marcadores específicos, sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de um perfil de marcadores específicos e não específicos (39).

Existe um consenso na literatura de que as CTMs não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoiéticas e endoteliais, como, por exemplo: CD3 (presente em linfócitos T), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo), CD34 (receptor de células endoteliais), e CD45 (presentes em todas as células hematopoiéticas). Sendo assim, a ausência dos antígenos CD3, CD14, CD34 e CD45 na superfície dessas células permite distingui-las das precursoras hematopoiéticas (39).

Embora já tenham sido identificados oito marcadores de superfície para identificação de CTMs, a ISCT concorda que a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90 com mais de 95% de positividade e no máximo 2% de positividade para CD45, CD34, CD3, CD14, CD19 e HLA-DR é suficiente para a identificação por imunofenotipagem dessas células (22, 39). Kolf e col. (61), em 2007, sugeriram que o anticorpo monoclonal Stro-1 seja o marcador de escolha para definir a presença de CTMs *in vivo*.

A variação da fonte de CTMs e os diferentes métodos de isolamento e cultivo celular podem levar a expressão variável de muitos dos marcadores citados. Por exemplo, CTMs de tecido adiposo humano costumam expressar CD49d, o que não ocorre com as CTMs de medula óssea, enquanto estas expressam CD106. A presença de CD106 nas CTMs de MO tem sido associada funcionalmente à hematopoese; assim, a falta de sua expressão nas CTMs de tecido adiposo é consistente com a localização destas células em tecido não hematopoiético (62).

### **2.2.3 Isolamento e cultivo de CTM de medula óssea**

O primeiro e mais utilizado método de isolamento de CTM originalmente descrito por Friedenstein e col. (1), baseia-se na capacidade destas células em aderir à superfície plástica. Resumidamente, o aspirado de MO é processado utilizando-se gradiente de densidade como, por exemplo, o reagente Ficoll. As células são coletadas e plaqueadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), enriquecido com soro fetal bovino (SFB) ou lisado plaquetário (LP) e antibiótico. Após 24h -72h, todo o meio de cultivo é substituído com o objetivo de remover as células não aderentes. As células restantes são mantidas em incubadora umidificada, a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub> e 21% de O<sub>2</sub>, e ao atingir confluência em torno de 80%, o que ocorre por volta do 14° dia, as células são desaderidas da superfície do frasco de cultivo por digestão enzimática e plaqueadas em novo frasco com concentração definida para que seja possível sua expansão. Este processo recebe o nome de passagem (57). Essas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de várias passagens sucessivas para obter grandes quantidades de CTMs altamente enriquecidas, com ausência de outros tipos celulares (63).

Alguns experimentos demonstram que as CTMs humanas retêm morfologia, fenótipo e características genômicas estáveis durante a expansão (64) enquanto outros sugerem lesões genômicas que apareceriam em culturas após várias passagens. Grigorian e col. (65) observaram que em uma de duzentas culturas de CTMs examinadas, obtida de doadores saudáveis e cultivada em condições padrão, apresentou alterações morfológicas, proliferativas e cariotípicas no decorrer das passagens. As células dessa cultura anormal mantiveram características imunofenotípicas de células-tronco mesenquimais, porém algumas delas tiveram numerosas aberrações cromossômicas numéricas e estruturais. Quanto ao surgimento de características tumorigênicas, estas foram observadas em culturas de CTMs humanas após um grande número de passagens *in vitro* (>50) (65, 66).

A cinética de expansão no cultivo de CTMs pode ser dividida em três fases: 1) inicial, com duração de 3 a 4 dias, ocorre logo após o plaqueamento e o crescimento celular é muito lento; 2) logarítmica, durante as primeiras passagens, apresenta um crescimento acelerado; 3) *plateau*: inicia-se quando a célula atinge a senescência e perde a capacidade de expansão (67, 68). Quanto às horas necessárias para a duplicação celular durante a fase de crescimento logarítmico, Conget e Minguell (69) encontraram um valor de 33 horas, enquanto que Stute e col. (70) de 24 horas.

O cultivo de CTMs na presença de reagentes de origem animal, como o soro fetal bovino, também limita a utilização destas células em ensaios clínicos (71). Diversos autores demonstraram a possibilidade de substituição do soro fetal bovino pelo lisado plaquetário humano no cultivo de CTMs (72-76). Estudos *in vitro* demonstraram que o LP é tão efetivo quanto o SFB para a expansão de CTM (76, 77), e, em estudo realizado por nosso grupo, obteve-se uma expansão 3,75 vezes maior de CTMs cultivadas com LP em comparação com SFB (78). Este procedimento previne a contaminação das células cultivadas com antígenos bovinos e a xenoimunização, mantendo a capacidade de proliferação e diferenciação, e assim, permitindo a utilização destas células em terapia celular para o tratamento de diversas doenças. Dessa forma, o LP é mais seguro do ponto de vista biológico, e no mínimo tão eficiente quanto o SFB para a expansão celular.

#### **2.2.4 Diferenciação**

Além do perfil de expressão de marcadores imunofenotípicos descritos anteriormente, são necessários outros dois critérios mínimos necessários para definição de uma CTM: aderência ao plástico e capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (79).

Existem evidências, ainda controversas, de que as CTMs podem, além de diferenciar-se em células de linhagem mesodérmica, também dar origem às células dos sítios endodérmicos e

neuroectodérmico pelo processo de transdiferenciação. Dentre as diferenciações *in vitro*, sob condições de cultivo apropriadas, estão as derivações em: tenócitos, células musculares, cardiomiócitos, células endoteliais, hepatócitos e neurônios (61, 80, 81).

#### 2.2.4.1 Diferenciação adipogênica

Os principais agentes utilizados para estimulação *in vitro* da diferenciação adipogênica são geralmente aqueles que aumentam os níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*), tais como o isobutilmetilxantina (IBMX, do inglês *isobutyl-methylxanthine*), um composto semelhante à teofilina terapêutica da asma. Outros compostos utilizados são ligantes para os receptores hormonais, tais como o receptor de glicocorticóide e receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama (PPAR- $\gamma$ , do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). Após cerca de 9 dias de cultivo, as CTMs diferenciadas resultantes exibem características bioquímicas e morfológicas características de adipócitos maduros, incluindo a expressão de genes marcadores, a secreção de adipocinas e resposta lipolítica a agonistas adrenérgicos (82, 83).

#### 2.2.4.2 Diferenciação osteogênica

A exposição contínua das CTMs a ligantes para o receptor de glicocorticóide (dexametasona) e ao receptor da vitamina D em conjunto com ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerofosfato resultam na mineralização da matriz extracelular em um período de 3 semanas. Neste momento é possível a visualização de deposição de fosfato de cálcio utilizando o corante vermelho de alizarina e expressão do fator de transcrição específico para osteoblastos (CBFa1, do inglês *core-binding factor alpha 1*) (43).

Estudos sugerem ainda que os processos de diferenciação adipogênica e osteogênica são inversamente proporcionais, ou seja, alguns agentes como ligantes para PPAR- $\gamma$  parecem inibir a osteogênese enquanto promovem a adipogênese (84).



#### 2.2.4.3 Diferenciação condrogênica

Os principais agentes estimulantes para diferenciação condrogênica *in vitro* são o ascorbato (forma ionizada do ácido ascórbico), a dexametasona e o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ , do inglês *transforming growth factor beta*). Em contraste com outras linhagens, a condrogênese ocorre mais eficazmente quando as células são cultivadas em estruturas tridimensionais como agarose ou alginato ao invés do frasco ou placa de cultivo bidimensional aderente. Este estímulo constante leva a ativação de vias de sinalização intracelulares, como proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen activated protein kinases*), o que induz diversos fatores de transcrição como SOX9, SOX5 e SOX6 levando à produção de proteínas de matriz celular, incluindo colágeno tipo II e a molécula agrecan, as quais são requeridas para a formação de cartilagem (85, 86).

#### 2.2.5 Propriedades imunológicas

Além do seu fácil isolamento, cultivo e potencial de diferenciação, as propriedades imunomoduladoras absolutamente singulares das CTMs representam a principal característica que faz deste subconjunto de células-tronco foco de atenção terapêutica como um recurso atraente para a restauração da homeostase imune e reparo tecidual (4).

Além dos efeitos imunossupressores, as CTMs expressam pequenas quantidades de antígeno leucocitário humano classe I (HLA-I) e níveis negligenciáveis de antígeno leucocitário humano classe II (HLA-II) (87) e/ou não expressão de HLA-II em sua superfície (88). Logo, na ausência ou na baixa expressão destes antígenos, o processo de seleção clonal positiva e negativa não ocorre, impedindo que o organismo que recebeu essas células as reconheça como não próprias e realize a rejeição das mesmas (89).

Mediante um contato direto com o tecido (alogênico ou autólogo) ou mediante a interação parácrina, as CTMs desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis que atuarão

sobre as células do sistema imunológico como linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *antigen presenting cells*) (90, 91). Dentre esses fatores, estão as prostaglandinas (PGE2) interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), TGF $\beta$ , fator de crescimento hepatóide (HGF, do inglês *hepatocyte growth factor*) e a enzima indoleamina (IDO) (91).

Em consequência da liberação de TGF- $\beta$  e HGF, ocorre supressão de proliferação dos linfócitos T e B (92), enquanto que a liberação de PGE2 inibe, especificamente, a produção dos linfócitos T citotóxicos e as demais citocinas pró-inflamatórias. A enzima IDO induz a apoptose dos linfócitos T por transformar o triptofano, que é um aminoácido essencial para a ativação dessas células, em produtos tóxicos no seu citoplasma (93). De forma análoga aos mecanismos anteriormente descritos, *in vitro*, a IDO, PGE2 e TGF- $\beta$  induzem a perda do potencial citotóxico das células *natural killer* (NK), por suprimirem a produção de IL-2, IL-15 e interferon-gama (INF- $\gamma$ ) (94). Em relação às APCs, evidenciou-se que as CTMs interferem na diferenciação, maturação e ativação dessas células por meio da produção de IL-6 e de fator de crescimento estimulador de macrófago (M-CSF, do inglês *macrophage colony-stimulating factor*). Além disso, a liberação de PGE2 pelas CTMs inibe a produção e secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor*) e de INF- $\gamma$  e estimula a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 3) (91, 93).

Corcione e col. (90), ao avaliar o efeito das CTMs sobre as células B, demonstraram que, por meio de secreção de fatores solúveis inibitórios após sinalização parácrina, as CTMs inibem, *in vitro*, a proliferação, a quimiotaxia e a diferenciação das células B em células secretoras de anticorpos. Ademais, diversos estudos *in vitro e in vivo* documentaram a capacidade de polarização das células T para um fenótipo de célula T regulatória, sendo este um importante mecanismo das CTMs no exercício da imunorregulação (95, 96).

No contexto da imunidade inata, a CTM parece interferir na diferenciação e maturação de células dendríticas induzindo estas a adquirir um fenótipo tolerogênico. Além disso, foi

recentemente relatado tanto *in vitro* como *in vivo* que as CTMs podem modificar a homeostase e inflamação tecidual, polarizando macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório (M2) ou pró-inflamatório (M1), dependendo do meio de citocinas (97-99).

Sabe-se, no entanto, que as CTMs não são constitutivamente inibitórias, necessitando de ativação prévia de um ambiente inflamatório no hospedeiro, a fim de mediar o seu efeito imunomodulador. Baseado nesta teoria, a presença de IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  poderia influenciar o efeito imunossupressor destas e produzir efeitos diferentes em sua função (100). Enquanto na presença de um ambiente inflamatório, as CTMs tornam-se ativadas e adotam um fenótipo imunossupressor secretando elevados níveis de fatores solúveis que inibem a proliferação de células T; na ausência de um ambiente inflamatório, as CTMs podem adotar um fenótipo pró-inflamatório e aumentar as respostas de células T pela secreção de quimiocinas que recrutam linfócitos para locais de inflamação (101).

Está claro que CTMs exógenas migram para os tecidos danificados e integram o seu microambiente independentemente de sua meia vida (102). No entanto, os mecanismos moleculares precisos subjacentes ao *homing* das CTMs ainda não são totalmente compreendidos e envolvem diversas moléculas como: quimiocinas, moléculas de adesão e metaloproteinases de matriz (2, 4, 103).

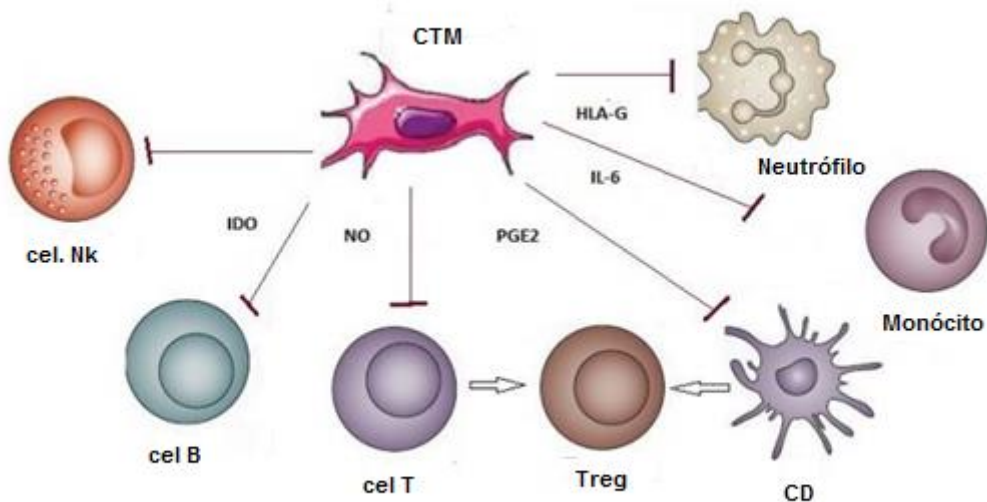


Figura 3: Interação parácrina das CTMs com o sistema imune inato e adaptativo. Fonte: adaptado de Owen e col. (104).

### 2.2.6 Aplicações clínicas

Algumas de suas propriedades singulares apontam as CTMs como ideais para terapia celular de diversas patologias. Destaca-se, em primeiro lugar, o seu potente efeito imunomodulador, descrito anteriormente, tornando-a uma abordagem promissora para tratar condições auto e alo imunes, tais como doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), doenças inflamatórias do intestino, esclerose múltipla, doenças reumáticas e diabetes tipo I (105-109).

Já a aplicação das CTMs em medicina regenerativa justifica-se em sua capacidade de diferenciação em células de outros tecidos e indução da reparação tecidual através de efeito anti-apoptótico e estimulação angiogênica. Possuem ainda capacidade migratória para o local de lesão e ação parácrina por secreção de fatores solúveis além de baixa imunogenicidade (110-112).

Além das propriedades mencionadas, sua fácil obtenção e expansão *in vitro* refletem em atuais >500 ensaios clínicos registrados para testar sua ação como agente terapêutico em condições descritas na tabela 1(113).

Tabela 1: Aplicações clínicas das células-tronco mesenquimais.

Condição clínica	Resultado	Referências
Infarto do miocárdio	Aumento de perfusão tecidual	(114)
Osteogênese imperfeita	Formação óssea significativa	(115)
Extenso defeito ósseo	Aumento de reparo ósseo	(116)
Leucodistrofia metacromática e síndrome de Hurler	Melhora significativa na velocidade de condução nervosa	(117)
Anemia aplástica idiopática	Melhora da população estromal e microambiente	(118)
Doença maligna hematológica	Sem eventos adversos	(119)
Erros inatos do metabolismo	Melhora significativa na velocidade de condução nervosa	(120)
Leucemia mieloide aguda	Pega do TCTH sem DECH	(121)
Cirrose hepática	Melhora da função hepática	(122)
DECH	Melhora significativa dos sintomas	(105)
Doença inflamatória intestinal	Melhora significativa dos sintomas	(106)
Osteoartrite	Melhora da qualidade da cartilagem e alívio da dor sem internação ou cirurgia	(123)
Acidente vascular cerebral isquêmico	Seguro e viável para promover a recuperação da função neurológica	(124)
Esclerose lateral amiotrófica	Seguro e exequível	(125)
Esclerose múltipla	Melhora na escala expandida do estado de incapacidade	(107)
Lúpus eritematoso	Remissão clínica	(126)

Até o presente momento, o resultado mais significativo de uso clínico de CTMs tem sido para o tratamento de DECH aguda resistente a corticosteroides, reportado pela primeira vez em 2004 (105).

Devido à sua capacidade infiltrativa em tumores sólidos e metástases, novas estratégias terapêuticas têm sido consideradas utilizando CTMs como veículos celulares para a produção de agentes locais em tumores. Vários modelos pré-clínicos têm avaliado o impacto de CTMs modificadas para produzir pró-drogas ativando enzimas ou citocinas com atividade antineoplásica no tumor primário ou metastático (127, 128).

### 2.3 AS CTMs EM CONDIÇÕES DE HIPÓXIA

Ainda que seja possível o isolamento de CTMs a partir de várias fontes de tecido, sua concentração nestes é muito baixa (5, 6), tornando impossível alcançar uma dose adequada a sua utilização clínica – tipicamente 50-200 milhões de células - sem expansão *in vitro* (7).

Do seu isolamento até a utilização clínica, estas células são invariavelmente submetidas a condições ambientais diferentes. A questão de condições ótimas de cultura tem sido alvo de investigação por muitos anos. Atualmente, a maioria dos procedimentos de expansão de CTM é realizada utilizando uma concentração de oxigênio ambiente, em que as células são expostas a 21% de O<sub>2</sub> cerca de 4-10 vezes superior à encontrada em seus nichos naturais (8, 9).

Em tecidos humanos adultos, a concentração de O<sub>2</sub> é muito variável (Tabela 2), dependendo da vascularização e do tipo de microambiente entre o respectivo órgão, varia de até 14% no sangue periférico a valores mais baixos como 1% em alguns tecidos. A tensão de oxigênio na medula óssea é descrita entre 4% e 7% ou talvez, tão baixa quanto 1-2%. Em qualquer um dos casos, a tensão de oxigênio é consideravelmente menor *in vivo*, do que a tensão de oxigênio atmosférico de culturas de células padrão (21%) (129).

Tabela 2: Concentração de oxigênio em diferentes órgãos e tecidos.

Tecido/órgão	Concentração de oxigênio	Referências
Parênquima pulmonar	4 a 14%	(130, 131)
Circulação	4 a 14%	(132)
Fígado	4 a 14%	(130, 133)
Rins	4 a 14%	(134)
Coração	4 a 14%	(135)
Cérebro	0,5 a 8%	(136)
Retina ocular	1 a 6%	(137)
Medula óssea	1 a 6%	(9, 138)
Tecido adiposo	2 a 8%	(139)

Hipoteticamente, uma maior concentração de O<sub>2</sub> poderia causar estresse celular. Alguns estudos apresentaram evidências sobre a influência negativa da concentração de O<sub>2</sub> ambiente em CTMs, incluindo a senescência precoce, maior tempo de duplicação e danos no DNA (13, 140). Os dados acerca da influencia dos níveis de O<sub>2</sub> utilizados no cultivo levantaram uma série de preocupações sobre sua utilização terapêutica e biossegurança.

O cultivo celular em tensão de oxigênio que melhor representa a situação *in vivo*, pode afetar a CTM de diversas maneiras. Cooper e col.(141), e Zwartouw e Westwood (142) descreveram ainda, em 1958, que algumas células proliferam mais rapidamente em tensões de oxigênio inferiores a 21%. Lennon e col. (143) também descreveram que diferentes tipos celulares aumentam o grau de proliferação quando cultivadas em baixas tensões de oxigênio.

Sabe-se que a baixa tensão de oxigênio (hipóxia) está envolvida na manutenção das células-tronco em um estado quiescente, mantendo sua plasticidade (11). Existe uma hipótese de que a sobrevivência e a capacidade de proliferação das CTMs podem ser melhoradas através da manutenção das células em baixas tensões de oxigênio (144).

Nos últimos anos, o interesse no potencial das CTMs para aplicação em medicina regenerativa e a disponibilidade de métodos mais convenientes para alterar a tensão de oxigênio na cultura, levaram ao crescente interesse no estudo dos efeitos da baixa tensão de oxigênio no comportamento e função destas células (129).

Cabe salientar que sutis diferenças nas condições de cultivo, tais como suplementação de fatores de crescimento no meio e fonte de obtenção destas células podem contribuir com heterogeneidade dos resultados publicados na literatura e, embora o efeito das condições de cultivo de hipóxia sobre a proliferação e potencial de diferenciação de CTMs tenha sido avaliado por pesquisadores, o efeito da hipóxia sobre o estresse oxidativo, atividade mitocondrial e autofagia não foi revisto em profundidade. Assim, com base em resultados de pesquisas recentes, é discutido o efeito de diferentes concentrações de O<sub>2</sub> na biologia das CTMs (145).

Em tempo, apesar da variedade de protocolos experimentais, os dados acumulados são em sua maioria provenientes de experimentos que empregam exposição aguda de CTMs ao ambiente hipóxico, ou seja, as células são cultivadas em oxigênio ambiente (21% de O<sub>2</sub>), e em um dado momento, expostas a hipóxia por um curto prazo (até 72 h) (13, 14, 17, 146-150). Poucos estudos analisam CTMs cultivadas de forma permanente em um nível baixo de oxigênio (10).

### **2.3.1 Sobrevivência e HIF-1**

É geralmente reconhecido que a hipóxia ativa muitas vias de estresse e de sobrevivência celular. No caso das CTMs, os dados sobre a sua resposta a condições de hipóxia *in vitro* são bastante controversos, demonstrando tanto efeitos prejudiciais e benéficos (10, 12-17).

Sabe-se que alterações na concentração de oxigênio representam um estímulo fisiológico celular, o que desencadeia certos mecanismos intracelulares, podendo estes ser



apoptóticos ou para a adaptação celular às novas condições ambientais. De maneira geral, a resposta adaptativa chave para condições de hipóxia parece estar no fator induzido por hipóxia (HIF-1) (151).

HIF-1 é um heterodímero composto de uma subunidade HIF-1 $\beta$ , constitutivamente expressa e uma subunidade HIF-1 $\alpha$ . A expressão deste último é altamente regulada e é determinada pelas taxas relativas de a sua síntese e degradação. A síntese de HIF-1 $\alpha$  é regulada através de mecanismos independentes da presença de oxigênio, enquanto que a sua degradação é dependente de oxigênio. Especificamente, na presença de O<sub>2</sub>, cadeias de HIF-1 $\alpha$  são ubiquitinadas e, por consequência, degradadas pelo proteossoma. Em condições de baixa tensão de oxigênio, esta hidroxilação é suprimida, o que gera uma estabilização de HIF-1 $\alpha$  e o seu acúmulo no núcleo, onde se forma um complexo com o HIF-1 $\beta$ , constitutivamente expresso. Além disso, o HIF-1 altera a função mitocondrial suprimindo a sua respiração. Isso sugere que o HIF-1 parece desempenhar um papel chave entre a glicólise e a fosforilação oxidativa. Vários mecanismos podem estar envolvidos em tal regulação. O destino do piruvato, o produto final da glicólise, depende da atividade de duas enzimas: piruvato desidrogenase (PDH) e lactato desidrogenase (LDH). PDH converte piruvato em acetil-CoA, o qual entra no ciclo de Krebs onde sofre transformação gradual. A atividade da PDH é controlada por piruvato desidrogenase cinase 1 (PDK1), a enzima que fosforila e inativa a PDH (147, 152).

Estudos demonstram que HIF-1 regula positivamente PDK1 inativando, assim, PDH. Sob estas circunstâncias, ao invés de fornecer equivalentes reduzidos para a mitocôndria, o piruvato sofre conversão a lactato, oxidando Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo reduzido (NADH) citosólico o que facilita a glicólise. Da mesma forma, HIF-1 estimula a expressão da LDH-A, cujo produto converte piruvato em lactato. Tomados em conjunto, estes fatores suprimem o fornecimento de acetilcoenzima A (acetil-CoA) para o ciclo de Krebs e respiração mitocondrial (149).

De acordo com dados recentes, a indução de HIF-1 em resposta à hipóxia ocorre quase imediatamente, sendo o nível máximo de HIF-1 observado após 60 min. de exposição, e sua meia vida após reoxigenação não excedendo 2 min. Isto significa que o seu acúmulo no núcleo da célula em hipóxia representa um mecanismo crucial de sobrevivência celular (150, 153).

Ao contrário de outros tipos de células como cardiomiócitos (que não conseguem sobreviver em hipóxia por mais de 4 horas), as CTMs podem suportar anóxia ( $O_2 < 1\%$ ) durante pelo menos 48h. Além de sua baixa exigência de adenosina trifosfato (ATP), as CTMs são capazes de sintetizar esta molécula facilmente a partir da glicólise. Neste cenário, o acúmulo de lactato devido ao aumento da glicólise e queda subsequente do potencial hidrogeniônico (pH) pode se tornar um fator de inibição metabólica a longo prazo (129).

### **2.3.2 Proliferação e ciclo celular de CTM em condições de hipóxia**

Como já mencionado, a tensão de oxigênio utilizada no cultivo parece exercer influência direta na proliferação celular, no entanto os resultados são controversos (Tabela 3).

Fehrer e col. (13) demonstraram que CTMs de MO cultivadas na concentração de 3% de  $O_2$  apresentaram proliferação significativamente aumentada, com um *population doubling* significativamente maior em comparação com células cultivadas em normóxia. Da mesma forma estes resultados foram observados por outros pesquisadores (147,158).

Em contrapartida, um estudo feito por Holzwarth e col. (16), analisando a proliferação em condições de 21%, 5%, 3% e 1% de oxigênio, concluiu que a hipóxia reduz a proliferação de CTMs num período de incubação de 7 dias. Na condição de 21% de oxigênio, a qual é “hiperóxica” em comparação com o ambiente fisiológico de CTM, a proliferação foi vigorosa. A taxa de proliferação e atividade metabólica diminuiu dependendo da concentração de oxigênio testada. Para corroborar com esses resultados, foi analisado o ciclo celular das CTMs em 21% e 1% de oxigênio (após 7 dias de cultura). Somente 1,37% das células entraram na fase

G2/M nas culturas em hipóxia em comparação com 2,50% em normóxia. Essa redução de células na fase G2/M encontrada pelos autores confirma o efeito inibitório da proliferação nas concentrações reduzidas de oxigênio (144).

Hung e col. (154) também obtiveram uma menor taxa de proliferação em CTM mantidas em 1% de oxigênio. Enquanto que Rosova e col. (155) não observaram diferença na proliferação entre CTMs cultivadas em condições de 1-3% de O<sub>2</sub> e em 21% de O<sub>2</sub>.

Tabela 3: Efeito da hipóxia na proliferação.

% O <sub>2</sub>	Tipo celular	Suplementação	Tempo	Proliferação	Referência
1%	Humano	17% SFB	10 dias	Diminuição	(154)
1-3%	Humano	15% SFB	16h	Não houve diferença	(155)
2%	Humano	10% SFB	6 semanas	Aumento 30x	(15)
2%	Humano	10% SFB	30 dias	Diminuição	(14)
5%	Rato	10% SFB	2 semanas	Aumento em 40%	(143)
8%	Camundongo	10% SFB	7-8 dias	Aumento de 2.8x	(156)

### 2.3.3 Diferenciação de CTM em condições de hipóxia

O potencial de multilinhagens das CTMs é uma das razões da sua investigação na medicina regenerativa. O potencial de diferenciação em várias linhagens pode ser aumentado ou diminuído em cultura sob condições de hipóxia. Estudos que abordam esta questão obtiveram resultados conflitantes: em diversos estudos *in vitro*, baixas concentrações de oxigênio pareceram estimular processos de diferenciação adipogênica, osteogênica ou condrogênica (143, 156, 157). Por outro lado, outros grupos relatam efeitos supressores na plasticidade da CTM em tensão de oxigênio reduzido (158, 159).

Holzwarth e col.(16) verificaram que a diminuição de O<sub>2</sub> prejudicou a diferenciação adipogênica e osteogênica, porém, quando a elevação de O<sub>2</sub> de 1% foi para 3% houve recuperação da diferenciação osteogênica. Já D'Ippolito (11) e Hunge col.(154) observaram

redução da capacidade osteogênica de células cultivadas em condições de hipóxia ou após hipóxia.

Poucos artigos avaliaram os efeitos da hipóxia sobre a diferenciação das CTMs em células condrogênicas apesar da óbvia ligação com a situação *in vivo* (condrócitos residem em um ambiente hipóxico). Embora também controverso, aparentemente a expansão e/ou diferenciação de CTM em hipóxia aumenta a expressão dos genes condrogênicos e outros marcadores ou não tem nenhum efeito (129).

Quanto à diferenciação adipogênica, parece que a hipóxia é benéfica para a diferenciação ao longo desta linhagem. Alguns dos artigos relatam um aumento (14, 160) ou nenhum efeito da hipóxia na adipogênese (15, 161). Apenas um artigo descreve uma queda significativa na atividade adipogênica quando CTMs foram cultivadas continuamente em 1% pO<sub>2</sub> por até 21 dias (154).

#### **2.3.4 Morfologia e imunofenótipo de CTM em condições de hipóxia**

Alguns estudos descrevem sua morfologia correlacionando-a com a “qualidade” das CTMs. Observou-se que células menores possuiriam maior capacidade de autorrenovação e diferenciação. (162)

Em relação à morfologia da célula, Grayson e col. (15), constataram em células em hipóxia, diferenças na morfologia celular e nuclear, bem como a formação de matriz extracelular reforçada. Holzwarth e col.(144) analisaram a morfologia da CTM por microscopia tanto em células em condições de hipóxia como em normóxia em 1 e 3 semanas de cultivo e verificaram que a morfologia em condições de hipóxia é dependente dos doadores.

Quanto à caracterização imunofenotípica, as CTMs cultivadas em hipóxia parecem manter a expressão dos marcadores CD105, CD73 e CD90 bem como a não expressão de CD45, CD34, CD3, CD14, CD19 e HLA-DR (16, 146).

### 2.3.5 Estresse Oxidativo e hipóxia

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) são moléculas intermediárias do metabolismo oxidativo, caracterizadas por sua natureza altamente instável devido a elétrons desemparelhados incluindo o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (163).

Devido ao delicado equilíbrio entre a necessidade de  $O_2$  para o metabolismo energético e o dano oxidativo induzido pela exposição excessiva de  $O_2$ , trocas nos níveis de oxigênio representam um desafio para cada tipo celular, pois os mecanismos relacionados ao impacto de  $O_2$  nas propriedades celulares são múltiplos. Dependendo do conteúdo celular, o  $O_2$  participa diretamente nas reações metabólicas ou modifica o desempenho de outros fatores que são relevantes para manter características de uma célula-tronco (164, 165).

ROS são intermediárias essenciais no metabolismo oxidativo e, quando são geradas em excesso, podem causar dano celular devido a peroxidação de lipídeos e alterações estruturais nas proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (166-169). Além disso, seus metabólitos secundários parecem estar envolvidos na senescência, já que células senescentes apresentam níveis superiores de ROS em comparação com células normais. Contrariamente, um baixo nível de ROS é necessário a fim de manter a proliferação celular, a capacidade de autorrenovação, regulação da diferenciação e sinalização intracelular (140).

O excesso de ROS é gerado por uma variedade de estresse celulares, incluindo isquemia, exposição à radiação ionizante e/ ou inflamação. Sendo assim as ROS podem contribuir para desencadear uma inflamação ou dano tecidual. Devido ao dano causado, uma maior resistência a ROS é necessária para que as CTMs mantenham sua funcionalidade, uma vez que na terapia celular, elas possuem a capacidade de migração em tecidos inflamados (170).

Além da disponibilidade de oxigênio variar entre tecidos e dentro do mesmo tecido dependendo da disponibilidade dos capilares circundantes, alterações na distribuição de O<sub>2</sub> são características de várias condições patológicas, como isquemia, inflamação, diabetes e câncer. Como é observado no microambiente hipóxico da MO, nicho das CTMs, essas alterações também são características em condições fisiológicas (129, 164).

Um estudo realizado por Berniakovich (164) demonstrou que 3% de O<sub>2</sub> afeta a diferenciação de CTMs obtidas de camundongos pela intervenção de ROS (164). Porém, são poucos os estudos avaliando ROS em cultivo de CTMs, sendo que estes são de extrema importância para o auxílio na obtenção de CTM de alta qualidade para uso na terapia celular. Borodkina e col.(171) trataram CTMs humanas com peróxido de hidrogênio e observaram que o estresse oxidativo induzia a fosforilação da proteína de ligação 1 p53 (53BP1 do inglês *p53-binding protein 1*) causando uma resposta de dano no DNA. Como resultado, as células permaneciam irreversivelmente no estágio G0/G1.

Descobertas recentes apontam para a supressão da respiração mitocondrial através de HIF-1 em condições de hipóxia. O HIF-1 aumenta a expressão de transportadores de glicose (GLUT do inglês *glucose transporter*), enzimas glicolíticas, e lactato desidrogenase-a (LDH-a) para facilitar a respiração anaeróbica. Promove ainda a expressão da PDHK que impede a formação de acetil-CoA inibindo a atividade enzimática da piruvato desidrogenase. Isto resulta na redução do consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial, e, como consequência, a produção de ROS é reduzida. Além disso, o HIF-1 em condição hipóxica induz a produção de citocromo c o qual mantém a integridade celular através da minimização ROS (148, 172, 173).

### **2.3.6 Hipóxia e atividade mitocondrial**

As mitocôndrias são responsáveis pela maior parte de produção de ATP intracelular através da fosforilação oxidativa. A produção de energia ocorre através da fosforilação

oxidativa, que se baseia no transporte e na utilização de determinados substratos por vários complexos enzimáticos. Os dois principais substratos oxidados para o fornecimento de energia são o piruvato (produto da glicólise) e os ácidos graxos livres. Os sistemas enzimáticos que os oxidam são: complexo enzimático piruvato desidrogenase e beta-oxidativo respectivamente, sendo o último ainda dependente de várias etapas intermediárias. A oxidação desses produtos fornece acetil-CoA para o ciclo de Krebs, provendo elétrons livres de alta energia que são carregados à cadeia respiratória. Os elétrons passam, então, por esta cadeia ordenada de moléculas e proteínas até seu aceptor final, o oxigênio. Nesse processo, os elétrons vão perdendo progressivamente energia, que por sua vez é captada e armazenada na forma de ATP. Quatro complexos enzimáticos são conjuntamente chamados de cadeia respiratória: Complexo I (NADH-coenzima Q oxirredutase), Complexo II (succinato-ubiquinona oxirredutase), Complexo III (ubiquinona-citocromo-c oxirredutase), Complexo IV (citocromo-c oxidase-COX), dois transportadores de elétrons móveis, a coenzima Q10 (ubiquinona) e o citocromo-c. Um quinto complexo enzimático completa, então, a fosforilação oxidativa: o Complexo V (ATP sintetase) (174, 175).

A síntese de ATP faz parte da respiração mitocondrial, a qual também produz uma certa quantidade ROS como subprodutos. Durante este processo, os elétrons podem escapar para fora do Complexo I e Complexo III para reagir com  $O_2$  gerando o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que pode ser convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (SOD) e decompostos em  $O_2$  e  $H_2O$  pela catalase (CAT) ou a glutatona peroxidase (GPx) (176). O excesso de ROS pode causar danos no DNA, peroxidação de lípidos e a modificação oxidativa de proteínas que são prejudiciais para a função celular. Por esta razão, os níveis intracelulares de ROS devem ser efetivamente controlados pelo sistema de defesa antioxidante, que inclui as enzimas SOD, CAT e GPx, as quais são expressas em níveis significativos pelas CTMs, o que confere a estas células a capacidade de lidar com formação de ROS e evitar danos. O

desequilíbrio entre prevalência de ROS e defesa oxidante é chamado de estresse oxidativo (177, 178).

Em estudo que avaliou os efeitos da hipóxia na função mitocondrial de células-tronco mesenquimais de MO, observou-se uma diminuição significativa na expressão da enzima do complexo respiratório mitocondrial incluindo a subunidade ND6 do Complexo I, subunidade UQCRC1 do Complexo III, e subunidade IV do citocromo c oxidase (COX4) (17). Além disso, a qualidade da população mitocondrial é mantida pelo processo de autofagia e mitofagia para remover as mitocôndrias danificadas.

A análise das atividades metabólicas das CTMs sob longos períodos de hipóxia revelou um aumento no consumo de glicose e glutamina e a produção de lactato, como consequência da interrupção do metabolismo celular de fosforilação oxidativa a glicólise anaeróbia (12). O desvio metabólico para a glicólise é acompanhado pela redução do potencial transmembrana mitocondrial. A importância de várias vias metabólicas na geração de ATP para a função e sobrevivência celular ainda é pouco compreendida (179).

Vários mecanismos de defesa foram desenvolvidos para proteger as células contra o estresse oxidativo, incluindo o aumento da atividade antioxidante, a remoção de proteínas específicas pelo sistema ubiquitina-proteassoma, e remoção de organelas e proteínas danificadas por autofagia (180).

A regulação positiva da respiração mitocondrial durante a diferenciação das CTMs poderia levar a um aumento dos níveis de ROS, provocando dano oxidativo dentro da mitocôndria. Assim, a ativação de autofagia para a eliminação das mitocôndrias defeituosas na fase inicial da diferenciação de células-tronco pode ser importante para o controle de qualidade mitocondrial (181, 182).



### 2.3.7 Hipóxia e Autofagia

Nas últimas décadas, tanto a apoptose quanto a autofagia foram reconhecidas como importantes mecanismos tanto em estado fisiológico como patológico. Parece haver uma intersecção entre a apoptose e o complexo autofágico, por vezes contraditórias, o que é crítico para o destino global das células. O processo autofágico é capaz de fornecer metabolitos precursores de energia e aliviar o estresse celular, através da remoção de proteínas e organelas danificadas em condições limitantes. Paradoxalmente, a autofagia persistente e prolongada como uma resposta ao estresse pode levar à morte celular. Assim, a autofagia pode proteger as células ou promover a morte celular, dependendo do contexto celular e do meio ambiente. Apesar das diferenças marcantes entre a apoptose e autofagia, a regulação destes processos está intimamente ligada (183-185).

A palavra "autofagia" é derivada do grego e significa comer ("*phagy*") a si mesmo ("auto"). Autofagia é um processo pelo qual os constituintes citoplasmáticos e organelas são direcionados para a degradação por enzimas lisossomais. O processo autofágico inicia com o sequestro do material alvo por uma vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo, seguido da fusão do autofagossomo com o lisossomo para formar o autofagolisossomo, onde ocorre a completa digestão do material autofagocitado por hidrolases ácidas. Existem dois principais modos de autofagia em células eucarióticas: macroautofagia e microautofagia. Estes dois modos diferem no que diz respeito à via pela qual o material citoplasmático entra em contato com o lisossoma, mas têm em comum os passos finais de degradação lisossômica com uma eventual reciclagem do material degradado. A microautofagia envolve a imersão de citoplasma diretamente na superfície do lisossomo, por invaginação, protusão, e/ou a formação de septos da membrana do mesmo. Em contraste, macroautofagia envolve a formação de vesículas de dupla membrana citosólicas que sequestram porções do citoplasma (Figura 4) (186).

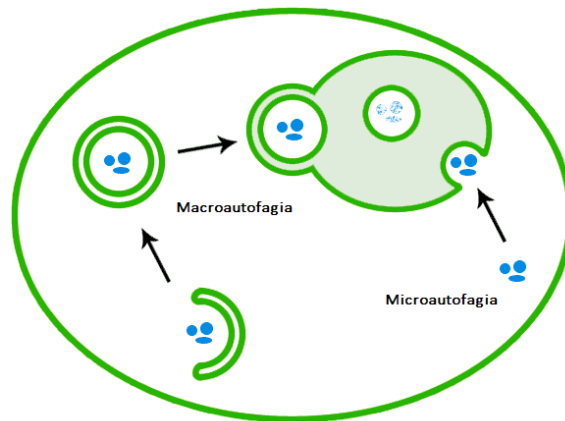


Figura 4: Representação da micro e macroautofagia. Fonte: Adaptado de Cuervo e col. (187)

O processo autofágico, em contraste com a apoptose e a necrose, é ativado em situações de estresse, como privação de nutrientes, hipóxia, dano mitocondrial e infecção; é, portanto um mecanismo de sobrevivência. A autofagia parece ser uma via de crucial de regulação do desenvolvimento, diferenciação, sobrevivência e homeostase, onde a célula é capaz de coordenar a disponibilidade de moléculas vitais como aminoácidos e glicose de forma que, se eles não são suficientes para manter a taxa de síntese de proteínas ou para proporcionar a quantidade de ATP necessária à sustentação das reações metabólicas, as células podem, através da autofagia, rapidamente degradar e reutilizar os seus componentes (43, 186).

Nos organismos de mamíferos, a autofagia parece estar envolvida em muitos processos fisiológicos, incluindo, controle proliferativo, mecanismos antienvhecimento e imunidade inata, ao passo que a desregulação do processo autofágico poderia desempenhar um papel significativo em algumas doenças como neoplasia, cardiomiopatia, doenças musculares e doenças neurodegenerativas (184, 186).

Relatos anteriores indicam que a hipóxia induz autofagia dependente de HIF-1 $\alpha$  tanto em células normais como neoplásicas, promovendo a sua sobrevivência. Isto sugere que o HIF-1 $\alpha$  desempenha um papel importante na manutenção e regulação da autofagia (188).

Estudos indicam que e os níveis de ROS aumentam quando a célula recebe tratamento para impedir o processo autofágico, como por exemplo, cloroquina. A autofagia é capaz de conter o dano oxidativo antes que ele atinja níveis citotóxicos, mantendo a homeostase energética (189, 190). Modelos murinos geneticamente modificados têm fornecido fortes evidências para a importância da autofagia no controle de ROS. Em síntese, a autofagia induzida por hipóxia é capaz de degradar metabólitos nocivos e organelas danificadas e pode evitar excessiva geração de ROS protegendo as células de lesão (191, 192).

### 3. JUSTIFICATIVA

A questão de condições ótimas para cultura de CTMs tem sido alvo constante investigação nos últimos anos, particularmente à tensão de oxigênio ideal para o cultivo e expansão.

Como mencionado anteriormente, a tensão de oxigênio fisiológica varia de até 12% no sangue periférico para valores mais baixos como por exemplo 1% na região da zona profunda da cartilagem. Em qualquer um dos casos, a tensão de oxigênio é consideravelmente menor *in vivo* do que a tensão de oxigênio atmosférico utilizada em culturas de células padrão (21%).

A influência do aporte de oxigênio utilizado no cultivo na morfologia, metabolismo, e capacidade funcional das CTMs ainda que crescentemente estudada, apresenta resultados bastantes controversos. Contudo, dados acerca do impacto das condições de cultivo em hipóxia e normóxia na morfologia, estresse oxidativo, atividade mitocondrial e autofagia em CTMs são escassos. Nosso estudo ainda apresenta o diferencial da utilização de lisado plaquetário, em substituição ao soro fetal bovino, como suplemento no cultivo celular devido a maior segurança clínica.

Sendo assim, o cultivo celular em tensão de oxigênio que melhor representa a situação *in vivo*, pode ter efeito sob diversos aspectos nas CTMs. Portanto é de grande importância a caracterização e comparação de CTM cultivadas em condições de hipóxia e normóxia com relação a aspectos morfológicos, metabólicos e funcionais com o objetivo de otimizar e padronizar condições de cultivo adequadas para o uso clínico. E desta maneira a garantir a preservação de suas propriedades mesmo após a manipulação *in vitro*, alcançando assim maior segurança e eficácia terapêutica no uso clínico de CTMs.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Revisar e caracterizar a célula-tronco mesenquimal cultivada em condições de hipóxia prolongada (1%, 2%, 3% e 4% de O<sub>2</sub>) e comparar com células cultivadas em condições de normóxia (21% de O<sub>2</sub>).

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Comparar a capacidade de proliferação das CTMs em relação às condições de hipóxia e normóxia;
- 2) Comparar a capacidade de diferenciação das CTMs em osteócitos, adipócitos, condrócitos em hipóxia e normóxia.
- 3) Comparar a morfologia e imunofenotipagem das CTMs cultivadas em hipóxia e normóxia.
- 4) Comparar atividade mitocondrial das CTMs em hipóxia e normóxia.
- 5) Comparar o estresse oxidativo das CTMs em hipóxia e normóxia.
- 6) Comparar a autofagia das CTMs em hipóxia e normóxia.

## 5. REFERÊNCIAS

1. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-74.
2. Ying Wang XC, Wei Cao & Yufang Shi. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*. 2014;15:1009–16.
3. Bernardo ME, Fibbe WE. Safety and efficacy of mesenchymal stromal cell therapy in autoimmune disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1266:107-17.
4. Bernardo ME, Pagliara D, Locatelli F. Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine? *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(2):164-71.
5. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6(1):7-14.
6. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999;72(4):570-85.
7. Faustini M, Bucco M, Chlapanidas T, Lucconi G, Marazzi M, Tosca MC, et al. Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(6):1515-21.
8. Antoniou ES, Sund S, Homsy EN, Challenger LF, Rameshwar P. A theoretical simulation of hematopoietic stem cells during oxygen fluctuations: prediction of bone marrow responses during hemorrhagic shock. *Shock*. 2004;22(5):415-22.
9. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J*. 2001;81(2):675-84.
10. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol*. 2011;12:12.
11. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone*. 2006;39(3):513-22.
12. Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*. 2010;223(1):27-35.
13. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*. 2007;6(6):745-57.
14. Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol*. 2006;207(2):331-9.

15. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(3):948-53.
16. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.* 2010;11:11.
17. Hsu SH, Chen CT, Wei YH. Inhibitory effects of hypoxia on metabolic switch and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2013;31(12):2779-88.
18. van der Kooy D, Weiss S. Why stem cells? *Science.* 2000;287(5457):1439-41.
19. Geneser F. *Histologia.* Koogan G, editor. Rio de Janeiro 2003.
20. Gilbert, S.F. *Developmental biology* Developmental biology. Associates S, editor. Sunderland (MA) Sunderland (MA) 2010. 711711 p.
21. De La Garza A, Sinha A, Bowman TV. Concise Review: Hematopoietic Stem Cell Origins: Lessons From Embryogenesis for Improving Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2016.
22. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev.* 2004;13(4):436-48.
23. Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells.* 2005;23(6):719-26.
24. Yu J, Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev.* 2008;22(15):1987-97.
25. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.
26. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004;116(5):639-48.
27. Matsumoto Y, Suda T. [Regulation of hematopoietic stem cells in niche signaling]. *Nihon Rinsho.* 2012;70 Suppl 2:133-8.
28. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-4.
29. Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2005;5(12):1571-84.
30. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-95.
31. Zhang H, Miao Z, He Z, Yang Y, Wang Y, Feng M. The existence of epithelial-to-mesenchymal cells with the ability to support hematopoiesis in human fetal liver. *Cell Biol Int.* 2005;29(3):213-9.
32. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 2005;23(8):1105-12.

33. Zheng C, Yang S, Guo Z, Liao W, Zhang L, Yang R, et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells from fetal lung expressing pluripotent markers and differentiating into cell types of three germ layers. *Cell Transplant*. 2009;18(10):1093-109.
34. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells*. 2004;22(5):649-58.
35. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006;91(8):1017-26.
36. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
37. Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete I, Gimeno-Longas MJ, Muiños-López E, Díaz-Prado S, de Toro FJ, et al. Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes. *J Rheumatol*. 2011;38(2):339-49.
38. Schwab KE, Hutchinson P, Gargett CE. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum Reprod*. 2008;23(4):934-43.
39. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
40. Mendes SC, Robin C, Dzierzak E. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*. 2005;132(5):1127-36.
41. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. 2007;129(7):1377-88.
42. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, et al. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):392-403.
43. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
44. Alvarez-Viejo M, Menendez-Menendez Y, Blanco-Gelaz MA, Ferrero-Gutierrez A, Fernandez-Rodriguez MA, Gala J, et al. Quantifying mesenchymal stem cells in the mononuclear cell fraction of bone marrow samples obtained for cell therapy. *Transplant Proc*. 2013;45(1):434-9.
45. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther*. 2008;15(2):109-16.
46. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(6):507-20.
47. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
48. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1928-42.



49. Almeida-Porada G, El Shabrawy D, Porada C, Zanjani ED. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Exp Hematol*. 2002;30(12):1454-62.
50. Fernández M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant*. 1997;20(4):265-71.
51. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000;2(6):477-88.
52. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001;153(5):1133-40.
53. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*. 2014;12:8.
54. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003;33(6):919-26.
55. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28(8):875-84.
56. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:457-78.
57. Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2004;6(4):372-9.
58. Tagami M, Ichinose S, Yamagata K, Fujino H, Shoji S, Hiraoka M, et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. *Cell Tissue Res*. 2003;312(1):31-40.
59. Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol*. 2005;40(12):926-30.
60. Salazar KD, Lankford SM, Brody AR. Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297(5):L1002-11.
61. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):204.
62. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2009;106(6):984-91.
63. Harichandan A, Buhring HJ. Prospective isolation of human MSC. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(1):25-36.
64. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-

therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol.* 2007;211(1):121-30.

65. Grigorian AS, Kruglyakov PV, Taminkina UA, Efimova OA, Pendina AA, Voskresenskaya AV, et al. Alterations of cytological and karyological profile of human mesenchymal stem cells during in vitro culturing. *Bull Exp Biol Med.* 2010;150(1):125-30.

66. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005;65(8):3035-9.

67. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997;64(2):278-94.

68. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3213-8.

69. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999;181(1):67-73.

70. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol.* 2004;32(12):1212-25.

71. Tekkate C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int.* 2011;2011:504723.

72. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol.* 2005;205(2):228-36.

73. Horn P, Bokermann G, Cholewa D, Bork S, Walenda T, Koch C, et al. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2010;12(7):888-98.

74. Lucchini G, Introna M, Dander E, Rovelli A, Balduzzi A, Bonanomi S, et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(9):1293-301.

75. Salvadè A, Della Mina P, Gaddi D, Gatto F, Villa A, Bigoni M, et al. Characterization of platelet lysate cultured mesenchymal stromal cells and their potential use in tissue-engineered osteogenic devices for the treatment of bone defects. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(2):201-14.

76. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion.* 2007;47(8):1436-46.

77. von Bonin M, Stolzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Holig K, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43(3):245-51.

78. Valim V AB, Pezzi A, Lima da Silva MA, Silla L. Optimization of the cultivation of donor mesenchymal stromal cells for clinical use in hematopoietic stem cell transplantation. *CellBio*. 2014;25-33
79. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
80. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
81. Mareschi K, Novara M, Rustichelli D, Ferrero I, Guido D, Carbone E, et al. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K<sup>+</sup> channel types. *Exp Hematol*. 2006;34(11):1563-72.
82. Halvorsen YD, Bond A, Sen A, Franklin DM, Lea-Currie YR, Sujkowski D, et al. Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism*. 2001;50(4):407-13.
83. Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YD, et al. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem*. 2001;81(2):312-9.
84. Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, et al. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by *PPARgamma2*. *J Cell Biochem*. 1999;74(3):357-71.
85. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum*. 2006;54(4):1222-32.
86. Shao XX, Hutmacher DW, Ho ST, Goh JC, Lee EH. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials*. 2006;27(7):1071-80.
87. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2003;5(6):485-9.
88. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217(2):318-24.
89. Wan CD, Cheng R, Wang HB, Liu T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008;7(1):29-33.
90. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-72.
91. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499-506.

92. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43.
93. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
94. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24(1):74-85.
95. Luz-Crawford P, Kurte M, Bravo-Alegría J, Contreras R, Nova-Lamperti E, Tejedor G, et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):65.
96. Burr SP, Dazzi F, Garden OA. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunol Cell Biol*. 2013;91(1):12-8.
97. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009;113(26):6576-83.
98. Deng Y, Yi S, Wang G, Cheng J, Zhang Y, Chen W, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct dendritic cells to acquire tolerogenic phenotypes through the IL-6-mediated upregulation of SOCS1. *Stem Cells Dev*. 2014;23(17):2080-92.
99. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008;111(3):1327-33.
100. Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia*. 2011;25(9):1408-14.
101. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):392-402.
102. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int*. 2013;2013:130763.
103. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol*. 2012;3:297.
104. Owen A, Newsome PN. Mesenchymal stromal cell therapy in liver disease: opportunities and lessons to be learnt? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309(10):G791-800.
105. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439-41.
106. Liang J, Zhang H, Wang D, Feng X, Wang H, Hua B, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease. *Gut*. 2012;61(3):468-9.

107. Mohyeddin Bonab M, Yazdanbakhsh S, Lotfi J, Alimoghaddom K, Talebian F, Hooshmand F, et al. Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study. *Iran J Immunol.* 2007;4(1):50-7.
108. El-Badawy A, El-Badri N. Clinical Efficacy of Stem Cell Therapy for Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(4):e0151938.
109. Álvaro-Gracia JM, Jover JA, García-Vicuña R, Carreño L, Alonso A, Marsal S, et al. Intravenous administration of expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611): results of a multicentre, dose escalation, randomised, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial. *Ann Rheum Dis.* 2016; 37(1):562.
110. Wagers AJ. The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell.* 2012;10(4):362-9.
111. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol.* 2008;180(4):2581-7.
112. Aldahmash A, Zaher W, Al-Nbaheen M, Kassem M. Human stromal (mesenchymal) stem cells: basic biology and current clinical use for tissue regeneration. *Ann Saudi Med.* 2012;32(1):68-77.
113. Nacional Health Institute. Clinical Trials. 2000. Available: [www.clinicaltrials.org](http://www.clinicaltrials.org) Accessed Sep 2016,
114. Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(1):204-9.
115. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8932-7.
116. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* 2001;344(5):385-6.
117. Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant.* 2002;30(4):215-22.
118. Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, et al. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia.* 2003;17(2):474-6.
119. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(5):389-98.
120. Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-

expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000;18(2):307-16.

121. Lee ST, Jang JH, Cheong JW, Kim JS, Maemg HY, Hahn JS, et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol*. 2002;118(4):1128-31.

122. Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21(10):1199-205.

123. Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation*. 2013;95(12):1535-41.

124. Jiang Y, Zhu W, Zhu J, Wu L, Xu G, Liu X. Feasibility of delivering mesenchymal stem cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patients with stroke in the territory of the middle cerebral artery. *Cell Transplant*. 2013;22(12):2291-8.

125. Oh KW, Moon C, Kim HY, Oh SI, Park J, Lee JH, et al. Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(6):590-7.

126. Sun L, Wang D, Liang J, Zhang H, Feng X, Wang H, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010;62(8):2467-75.

127. Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, Gumin J, Vecil GG, Marini FC, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res*. 2009;69(23):8932-40.

128. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells*. 2011;29(1):11-9.

129. Das R, Jahr H, van Osch GJ, Farrell E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(2):159-68.

130. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol*. 2009;219(2):271-5.

131. Wild JM, Fichele S, Woodhouse N, Paley MN, Kasuboski L, van Beek EJ. 3D volume-localized pO<sub>2</sub> measurement in the human lung with <sup>3</sup>He MRI. *Magn Reson Med*. 2005;53(5):1055-64.

132. McKinley BA, Butler BD. Comparison of skeletal muscle PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, and pH with gastric tonometric P(CO<sub>2</sub>) and pH in hemorrhagic shock. *Crit Care Med*. 1999;27(9):1869-77.

133. Jungermann K, Kietzmann T. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int*. 1997;51(2):402-12.

134. Welch WJ, Baumgärtl H, Lübbers D, Wilcox CS. Nephron pO<sub>2</sub> and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. *Kidney Int.* 2001;59(1):230-7.
135. Roy S, Khanna S, Wallace WA, Lappalainen J, Rink C, Cardounel AJ, et al. Characterization of perceived hyperoxia in isolated primary cardiac fibroblasts and in the reoxygenated heart. *J Biol Chem.* 2003;278(47):47129-35.
136. Sharp FR, Bernaudin M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(6):437-48.
137. Yu DY, Cringle SJ. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp Eye Res.* 2005;80(6):745-51.
138. Eliasson P, Jönsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol.* 2010;222(1):17-22.
139. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, et al. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes.* 2009;58(3):718-25.
140. Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ.* 2012;19(5):743-55.
141. Cooper PD, Burt AM, Wilson JN. Critical effect of oxygen tension on rate of growth of animal cells in continuous suspended culture. *Nature.* 1958;182(4648):1508-9.
142. Zwartouw HT, Westwood JC. Factors affecting growth and glycolysis in tissue culture. *Br J Exp Pathol.* 1958;39(5):529-39.
143. Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol.* 2001;187(3):345-55.
144. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.* 2010;11:11.
145. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2010;7(2):150-61.
146. Dionigi B, Ahmed A, Pennington EC, Zurakowski D, Fauza DO. A comparative analysis of human mesenchymal stem cell response to hypoxia in vitro: Implications to translational strategies. *J Pediatr Surg.* 2014;49(6):915-8.
147. Hung SP, Ho JH, Shih YR, Lo T, Lee OK. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2011.
148. Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal.* 2010;8:18.
149. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996;271(51):32529-37.

150. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* 2002;16(10):1151-62.
151. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(9):4304-8.
152. Kanichai M, Ferguson D, Prendergast PJ, Campbell VA. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . *J Cell Physiol.* 2008;216(3):708-15.
153. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 2001;15(7):1312-4.
154. Hung SC, Pochampally RR, Hsu SC, Sanchez C, Chen SC, Spees J, et al. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS One.* 2007;2(5):e416.
155. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(8):2173-82.
156. Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, et al. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(1):12-21.
157. Fink T, Abildtrup L, Fogd K, Abdallah BM, Kassem M, Ebbesen P, et al. Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *Stem Cells.* 2004;22(7):1346-55.
158. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 2007;6(6):745-57.
159. Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone.* 2007;40(4):1078-87.
160. Mylotte LA, Duffy AM, Murphy M, O'Brien T, Samali A, Barry F, et al. Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells.* 2008;26(5):1325-36.
161. Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, Villaron E, Barbado V, Tabera S, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol.* 2008;36(8):1014-21.
162. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells.* 2002;20(6):530-41.
163. Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291(3):R491-511.



164. Berniakovich I, Giorgio M. Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14(1):2119-34.
165. Berniakovich I, Trinei M, Stendardo M, Migliaccio E, Minucci S, Bernardi P, et al. p66Shc-generated oxidative signal promotes fat accumulation. *J Biol Chem.* 2008;283(49):34283-93.
166. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
167. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:191-208.
168. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem.* 1994;269(42):26066-75.
169. Richter C, Suter M, Walter PB. Mitochondrial free radical damage and DNA repair. *Biofactors.* 1998;7(3):207-8.
170. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):383-96.
171. Borodkina A, Shatrova A, Abushik P, Nikolsky N, Burova E. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging (Albany NY).* 2014;6(6):481-95.
172. Brahim-Horn MC, Pouysségur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3582-91.
173. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda).* 2009;24:97-106.
174. Zhang Y, Marsboom G, Toth PT, Rehman J. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2013;8(10):e77077.
175. Senior AE, Nadanaciva S, Weber J. The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1553(3):188-211.
176. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1-13.
177. Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(12):639-45.
178. Valle-Prieto A, Conget PA. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev.* 2010;19(12):1885-93.
179. Buravkova LB, Rylova YV, Andreeva ER, Kulikov AV, Pogodina MV, Zhivotovsky B, et al. Low ATP level is sufficient to maintain the uncommitted state of multipotent mesenchymal stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(10):4418-25.
180. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* 2013;20(1):31-42.

181. Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(49):19500-5.
182. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep*. 2010;11(1):45-51.
183. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*. 2009;16(7):966-75.
184. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004;6(4):463-77.
185. Thorburn A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*. 2008;13(1):1-9.
186. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010;40(2):280-93.
187. Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol*. 2004;14(2):70-7.
188. Dang S, Xu H, Xu C, Cai W, Li Q, Cheng Y, et al. Autophagy regulates the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autophagy*. 2014;10(7):1301-15.
189. Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(3):709-18.
190. Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(1-2):152-62.
191. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(5):H2023-31.
192. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005;120(4):483-95.

## **6. ARTIGO I**

### **CHARACTERISTICS OF MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIA**

(Artigo de revisão publicado na revista *CellBio*).

# Characteristics of Mesenchymal Stem Cells under Hypoxia

Bruna Amorin<sup>1,2</sup>, Ana Paula Alegretti<sup>1,2</sup>, Vanessa de Souza Valim<sup>1,2</sup>, Annelise Martins Pezzi da Silva<sup>1,2</sup>,  
Maria Aparecida Lima da Silva<sup>1,2</sup>, Felipe Sehn<sup>1</sup>, Lucia Silla<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Cell Technology Center, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre-Porto Alegre,  
Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Porto Alegre,  
Rio Grande do Sul, Brazil  
Email: lsilla@hcpa.ufrgs.br

Received February 1, 2013; revised March 1, 2013; accepted March 10, 2013

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are considered non-hematopoietic multipotent stem cells with self-renewal properties and the ability to differentiate into a variety of mesenchymal tissues. Optimal conditions for the culture of these cells have been the subject of investigation for several years. In particular, ideal oxygen tension levels have not been established in the literature. In physiological environments, oxygen tension may vary from 12% in peripheral blood to 1% in the deep zone of cartilage regions. In any case, oxygen tension is considerably lower *in vivo* when compared with the normal atmosphere of standard cell culture conditions (21%). The objective of this study was to review the literature available on MSC characteristics (cell cycle, survival, proliferation, differentiation, morphology, immunophenotype, cytogenetics) when cultured under hypoxic conditions. Our focus on optimal culture conditions is justified by the key role currently played by these cells in regenerative medicine.

**Keywords:** Mesenchymal Stem Cells; Culture; Hypoxia

## 1. Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs), also referred to mesenchymal stromal cells [1], are considered non-hematopoietic multipotent stem cells with self-renewal properties and the ability to differentiate into mesoderm tissues [2]. MSCs were first described by Friedenstein *et al.* in the 1970s, as cells morphologically similar to fibroblasts and with a high ability to adhere to plastic surfaces [3]. Several subsequent studies have reported the multipotent nature of these cells, *i.e.*, their ability to differentiate into embryonic mesoderm-derived cells, namely, osteocytes, chondroblasts, and adipocytes [4-6].

The first studies designed to assess the effects of different oxygen (O<sub>2</sub>) tension levels in MSC culture date back to 1958, when Cooper *et al.* and Zwartouw & Westwood observed that some cells proliferated more rapidly under low O<sub>2</sub> tension levels when compared with normal atmospheric levels [7,8].

In recent years, studies have evidenced that MSC are recruited to areas of tissue damage, such as fractures, myocardial infarction, and ischemic brain lesions, where they become involved in both the regulation of inflammatory response and tissue repair [9,10], and hypoxia appears to be an important regulator of MSC recruitment, migration, and differentiation [11,12]. In an animal model, Rochefort *et al.* have shown that MSCs, but not

hematopoietic progenitor cells, were mobilized from the bone marrow into peripheral blood through hypoxia [13]. Additionally, low O<sub>2</sub> tension levels have been implicated in the maintenance of stem-cell quiescence and plasticity in general [14,15].

Based on the above, studies on optimal *in vitro* culture conditions have focused on ideal O<sub>2</sub> tension levels [16]. In particular, it has been hypothesized that the survival and proliferation of MSCs can be improved by maintaining cells at low O<sub>2</sub> tension levels although it remains unclear whether different *in vitro* concentrations of O<sub>2</sub> over long periods of time change typical features of MSC [14]. Within this scenario, a relevant fact is that cultures under standard conditions (21% O<sub>2</sub>) are exposed to a significantly higher amount of O<sub>2</sub> when compared with physiological *in vivo* conditions [17]. In fact, approximately 1% - 1.5% of the genome appears to be regulated by hypoxia [18].

Recently, with the growing interest in the potential application of MSCs in regenerative medicine, the possibility to obtain a higher rate of proliferation, and the availability of more appropriate methods to change O<sub>2</sub> tension levels in culture, has motivated the publication of several studies on the effects of low O<sub>2</sub> tension levels on MSC behavior and function [16,17,19,21]. It is important to emphasize that subtle differences in culture con-

ditions, e.g., medium supplementation with different growth factors, probably account for the heterogeneity of results found in the literature. The present study discusses several described effects of hypoxia on MSC.

## 2. Bone Marrow Stromal Cells and MSC Niches

Stromal cells, together with extracellular matrix and soluble regulatory factors, once regarded as secondary components [22], are currently believed to be essential to maintain hematopoiesis [23]. In addition to MSC, stromal cells, both *in vitro* and *in vivo*, are formed by a heterogeneous population of cells including macrophages, fibroblasts, adipocytes, osteoblasts, and endothelial cells. These cells are considered to be the main components of the niche and seem to play a critical role in the regulation of the hematopoietic stem cells [24,25].

The term niche was introduced in 1980 to describe the spatial structure that lodges stem cells [26]. The hematopoietic stem cell niche is located in the bone marrow, and currently there are models that advocate two superimposed populations: the endosteal niche-close to the bone surface, where quiescent hematopoietic stem cells are located and maintained; and the perivascular niche-associated with sinusoidal endothelial cells, where hematopoietic stem cells primarily divide and self-renew. MSCs are present in these two niches, and they participate in hematopoiesis and ontogeny [23].

## 3. MSC Survival in a Hypoxic Environment

*In vivo* O<sub>2</sub> tension levels have been described to range between 4% and 7% in the bone marrow, sometimes reaching as low as 1% - 2% [27-30]. Therefore, MSCs and all other stroma cells have to be able to live in a hypoxic microenvironment [31].

MSCs, as all cells, have the ability to effectively change metabolic pathways from aerobic to anaerobic, an essential aspect for the survival of these cells under hypoxic conditions [16]. An experimental study performed with rats on the changes in MSCs under serum-deprivation and hypoxia conditions, concluded that serum deprivation was the main reason leading to ischemia-induced apoptosis of MSCs. However, it also showed that prolonged exposure to hypoxia led to mitochondrial dysfunction and Caspase-3 activation, a key factor in apoptosis [32]. Although it has been shown that MSCs are able to withstand hypoxia (e.g., O<sub>2</sub> < 1%) for at least 48 hours (37), the accumulation of lactate resulting from glycolysis could become an inhibitory factor in the long term [16-33].

When bone marrow-derived MSCs are cultured under hypoxic conditions, intracellular signaling pathways associated with cell survival are stimulated such as hy-

poxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) that when stabilized migrates into the cell nucleus and combines with hypoxia-inducible factor-1 beta (HIF-1 $\beta$ ). Subsequently, these dimeric structures bind to the promoter region of hypoxia-responsive genes, including glucose-6-phosphate transporter (G6PT), which controls gluconeogenesis. The increased level of glucose resulting from gluconeogenesis appears to contribute to MSC survival under hypoxic or serum-deprivation conditions (37-39). Additionally, an increased survival rate under hypoxia, when compared to normoxia, can be attributed not only to the overexpression of HIF-1, but also to an increase in erythropoietin receptors, and anti-apoptotic factors Bcl-2 and Bcl-XL, followed by decreased Caspase-3 levels (70,71). Moreover, interleukin IL-6 and vascular endothelial growth factor (VEGF)-two proangiogenic factors are also stimulated during hypoxia, further contributing to cell survival (70). These beneficial effects are regulated by a complex array of signaling pathways, including Akt and ERK pathways (26,72,73).

Hypoxia and the HIF-1 $\alpha$  stabilization cause phosphorylation of the Akt signaling pathway which is degraded under normoxia. When Akt is activated, the expression of pro-apoptotic factor Bax reduces, and the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 increases. Such overexpression may interact with the Bax accumulated in the mitochondrion, triggering apoptosis or further stabilization of HIF-1 $\alpha$  causing, as mentioned above, its translocation into the cell nucleus and the activation of hypoxia-responsive genes such as G6PT and angiogenesis-related factors such as VEGF and IL-6 (18).

In addition to O<sub>2</sub> tension levels, the optimal culture time of MSCs under hypoxic conditions also remains to be determined. Wang *et al.* used short time hypoxic preconditioning in MSCs and observed favorable effects on cell viability and angiogenic properties after 10 minutes of culture; stronger effects were observed after longer culture times [34].

## 4. MSC Proliferation and Cell Cycle under Hypoxic Conditions

Despite the fact that physiological levels of O<sub>2</sub> tension, even in healthy tissues, are significantly below 21%, cells are most frequently cultured at this O<sub>2</sub> tension level. Culture under normal physiological O<sub>2</sub> tension levels might affect the proliferation rates of several types of cells [16]. Lenon *et al.* showed that the culture of MSCs derived from the bone marrow of mice at 5% O<sub>2</sub> resulted in approximately 40% more cells at first passage when compared with cells cultivated at 21% O<sub>2</sub> [28]. Similar findings were reported for human MSCs by Grayson *et al.*, that showed an increased cell proliferation rate under low O<sub>2</sub> conditions (2%) for 7 passages, resulting in a 30 times higher number of cells when compared with

cultures under normoxia [35]. Hung *et al.* [20] also observed a higher proliferation capacity of MSCs after 7 days of culture under hypoxia (1% O<sub>2</sub>). In the same study, an *in vitro* migration assay was performed and showed that hypoxia enhanced the migration capacity of MSCs [36]. In spite of a short exposure time (24 hours) at 1.5% O<sub>2</sub>, Matin-Rendon *et al.* also observed increased MSC proliferation [37]. Accordingly, D'Ippolito *et al.*, showed that a low O<sub>2</sub> tension level decreased the time necessary for the cell population to double when cultured at 3% O<sub>2</sub> [14], and Ren *et al.* showed an increase in the number of cells in the G2/S/M phase during hypoxia [38].

Conversely, a study by Holzwarth *et al.* analyzing MSCs proliferation at 21%, 5%, 3%, and 1% O<sub>2</sub> observed reduced rates of proliferation after 7 days of culture under hypoxia. In their study, cultures at 21% O<sub>2</sub>, considered to be hyperoxic in comparison with the physiological environment in which MSCs reside, showed robust proliferation rates. Assessing MSC cell cycle after 7 days of culture only 1.37% of the cells entered the G2/M phase in hypoxic cell cultures (1% O<sub>2</sub>) compared with 2.50% at an O<sub>2</sub> concentration of 21%. The authors concluded that the reduced number of cells in the G2/M phase confirms the inhibitory effect on cell proliferation under reduced O<sub>2</sub> concentrations [17]. An inhibitory effect on MSC proliferation rate cultured under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) in a medium containing 17% of fetal bovine serum (FBS) has also been reported [39].

## 5. MSC Plasticity under Hypoxic Conditions

The multilineage potential of MSCs is one of the reasons underlying their use in regenerative medicine [40]. According to several studies, MSC differentiation into other lineages can either increase or decrease under hypoxia [17,20,41]. Some *in vitro* studies have shown that cultures with low O<sub>2</sub> concentrations stimulated differentiation processes, inducing cells to differentiate into adipogenic, osteogenic, or chondrogenic cells [28,38,42]. Conversely, some others have reported suppressive effects of low O<sub>2</sub> tension levels on the plasticity of MSCs [43,44].

### 5.1. Osteogenic Differentiation

HIF-1 $\alpha$  and VEGF are MSCs key elements in bone development and regeneration. VEGF is a transcriptional target of HIF-1 $\alpha$  and has an important role in angiogenesis to which osteogenesis-bone development and regeneration, is strongly associated [45].

A study conducted by Huang *et al.* investigated the effects of hypoxia (5% O<sub>2</sub>) in relation to the biological capacity of MSCs obtained from rabbits. That study found that hypoxia significantly increased the proliferation of MSCs, and the expression of messenger RNA

(mRNA) for core binding factor alpha-1 (Cbfa-1) increased 1 hour after hypoxia. These results indicate that hypoxia increases differentiation rates in osteogenic lineages and suggest that Cbfa-1 may be positively influenced by HIF1- $\alpha$  [41]. Some studies point to an improved osteogenic differentiation capacity of MSCs, however with conflicting results. Lennon *et al.* cultivated cells for several passages under hypoxia (5% O<sub>2</sub>) and also at 21% O<sub>2</sub>. Subsequently, the osteogenic differentiation capacity of these cells was assessed, suggesting that 5% O<sub>2</sub> was associated with a better differentiation response [28]. Valorani *et al.* also observed that, under hypoxic conditions (2% O<sub>2</sub>), MSCs obtained from human adipose tissue showed an increase in their potential to differentiate into osteocytes [46]. Another study showed that different rates of O<sub>2</sub> (in hypoxia) were associated with different results: cells cultured at 1% O<sub>2</sub> showed a negative effect on osteogenic differentiation, whereas an increase in O<sub>2</sub> tension to 3% caused recovery of osteogenic differentiation [17]. In contrast, D'Ippolito *et al.* [14], Hung *et al.* [39], Muller *et al.* [47], Salim *et al.* [48], and Matin-Rendon *et al.* [37] observed either a reduced capacity or no effect on the differentiation capacity of MSCs into osteoblasts under hypoxic conditions or after exposure to hypoxia.

### 5.2. Chondrogenic Differentiation

Although Scherer *et al.* have shown that 5% O<sub>2</sub> promoted chondrogenic differentiation in the presence of a chondrogenic medium [49] and chondrocytes are known to develop in an extremely hypoxic environment [16] there are few articles assessing hypoxia effects on MSCs chondrogenic differentiation. There are, however, some indirect evidences that hypoxia might play a key role in *in vivo* MSCs chondrogenic differentiation since Sox9, an important transcription factor involved in chondrogenesis, was observed to be upregulated and to involve HIF-1 $\alpha$  and p38MAPK/Akt pathways under hypoxic conditions, similarly to the MSC survival mechanisms in a hypoxic environment mentioned above [50,51].

### 5.3. Adipogenic Differentiation

Although several studies have suggested that hypoxia can increase the MSCs differentiation in adipocytes [38,42, 46,52,53] there are some that suggested hypoxia has no effect [35-54] or even suppress adipogenic MSCs differentiation [39]. Again, several different O<sub>2</sub> tension and culture conditions have been utilized in these studies.

## 6. MSC Morphology under Hypoxic Conditions

Some studies have described the morphology of MSCs

and correlated it with the “quality” of these cells, reporting that smaller cells have higher self-renewal capacity and an enhanced differentiation potential. Grayson *et al.* observed some differences in cells cultured under hypoxia in terms of their cellular and nuclear morphology, as well as in the formation of reinforced extracellular matrix when compared with MSCs in normoxia [35]. Holzwarth *et al.* microscopically analyzed the morphology of MSCs cultured under both hypoxic and in normoxic conditions after 1 and 3 weeks of culture. The authors observed that cell morphology under hypoxia was donor-dependent-some samples did not show differences between the two O<sub>2</sub> tension conditions, and others died after exposure to hypoxia [17].

## 7. Immunophenotypic Characteristics of MSCs under Hypoxic Conditions

MSC immunophenotype is characterized by the expression of CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, and MHC class I molecules, and the absence of markers such as CD45 and CD34 or MHC class II molecules [1,55]. According to one study by Holzwarth *et al.*, there were no significant differences in the expression of cell surface markers after 14 days of culture at 1% when compared to 20% of O<sub>2</sub> [17].

## 8. Cytogenetic Characteristics of MSCs under Hypoxic Conditions

Senescence is a typical phenomenon of the *in vitro* cells cultures thought to interrupt cell proliferation, and attributed to several factors, including progressive telomere shortening secondary to loss of telomerase activity [56]. In normal O<sub>2</sub> tension, time in culture has been linked to an increase number of mutations and to malignant transformation in murine mesenchymal cells [57] and in human MSC cultures, after more than 50 *in vitro* passages [58,59]. Holzwarth *et al.* did not see cytogenetic alterations in cultures of MSCs either under hypoxic or normoxic conditions during six weeks of culture [17].

## 9. Gene Expression in MSCs Cultured under Hypoxia

As mentioned above, several studies have described genes that may be under-or over-expressed in MSCs during hypoxia. These genes are involved in different functions, such as DNA repair, cell cycle, chromosome segregation, apoptosis, glycolysis, angiogenesis, proliferation, and adhesion [33,35,60,64]. A study conducted by Onishi *et al.* reported over-expression of several genes in rat MSCs cultivated under hypoxia vs. normoxia. That study also revealed that most genes analyzed were up-regulated after 24 hours even in cells cultured at 10% O<sub>2</sub>

(moderate hypoxia) [64].

The **Table 1** describes some of the genes identified in different studies involving human MSCs in relation to their expression during hypoxia.

## 10. Immunomodulatory Effects and Homing under Hypoxia

In addition to the easy isolation and culture of MSCs, their differentiation potential and the associated production of growth factors and cytokines, these cells have also become the focus of attention due to their immunomodulatory properties [65,66]. In this context, hypoxia

**Table 1. Expression of genes in human MSCs cultured under hypoxic conditions.**

Gene	Function
<b>Upregulated</b>	
HIF <sup>a</sup>	Hypoxia-related transcription factor
CXCR4 <sup>bc</sup>	Migration
CX3CR1 <sup>b</sup>	Migration
CRM2	Ribonucleotide reductase
XRCC2 <sup>d</sup>	DNA repair
KIF24	Chromatid assembly
POLQ <sup>d</sup>	DNA polymerase
E2F8 <sup>d</sup>	Cell cycle progression
FANCD2 <sup>d</sup>	DNA repair
SCO 2	Sister chromatid cohesion
AURKB <sup>d</sup>	Chromosome segregation
CENPN	Centromere binding
MKI67 <sup>d</sup>	Cell proliferation
<b>Downregulated</b>	
TFC1 <sup>d</sup>	Hepatic transcription factor
LEP <sup>d</sup>	Metabolism, apoptosis, angiogenesis
ANGPT2 <sup>d</sup>	Antagonist on vascular remodeling
ZP1 <sup>d</sup>	Sperm binding in the pellucid zone
VWF <sup>d</sup>	Platelet binding to endothelium
GIMAP4	Development of T cells
CD93 <sup>d</sup>	Intercellular adhesion, clearance of apoptotic cells
PLVAP <sup>d</sup>	Cell adhesion
ESAM <sup>d</sup>	Endothelial cell adhesion
PCDH17	Cell-cell connections within the brain

References: <sup>a</sup>Holzwarth *et al.* [17]; <sup>b</sup>Hung *et al.* [39]; <sup>c</sup>Liu F., <sup>d</sup>Basciano [60].

seems to regulate the levels of soluble factors (such as VEGF, fibroblast growth factor-2 [FGF2], hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor 1 [IGF-1]), as well as the levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), based on nuclear factor kappa  $\beta$ -dependent mechanisms [67]. These findings suggest an influence of hypoxia on the immunoregulatory properties of MSCs.

Wu *et al.* used human MSCs and observed that most genes were regulated after 24 hours of hypoxia. However, in less than 4 hours of hypoxia, an increased secretion of VEGF and membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) was observed, as well as reduced levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) [68]. Muir *et al.* also confirmed an increased expression of VEGF under hypoxic conditions [69]. Potier *et al.* cultivated human MSCs with FBS in hypoxia and observed a decreased expression of TGF- $\beta$ 3, as well as increased expression of FGF2 and VEGF after 48 hours. In that study, IL-6, IL-8, and MCP1 levels were not affected [44]. Conversely, in a study by Hung *et al.*, who cultivated MSCs in a FBS-free medium, the expression of IL-6, macrophage chemotactic protein (MCP1) and VEGF was found to be upregulated under hypoxia [39].

In addition to influencing the secretion of soluble factors, hypoxia also regulates chemokine receptors CX3CR1 and CXCR4 [39-70], and hepatocyte growth factor receptor cMet [21]. These receptors increase MSCs' migration and homing potential to cell-damaged areas [16]. Rosova *et al.* found a possible role of hepatocyte growth factor and its receptor cMet, whose expression is upregulated during hypoxia [21]. One study conducted by Hung *et al.* showed that hypoxia increased the migration capacity of MSCs [20], whereas Wang *et al.* showed an improved migration potential of MSCs in brain lesion. In the latter study, the CXCR4 receptor was shown to be involved in ability of these cells to migrate to damaged tissue under hypoxic conditions [70].

Hypoxia has been shown to influence the secretion of trophic factors and membrane markers associated with MSC migration and homing and, in animal models, MSCs cultured under hypoxia appears to have improved immune regulatory performance suggesting a possible role of hypoxia in cellular therapy strategies [71,72]. Migration may involve several cytokines, chemokines, and integrins. Among chemokines, the stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCR4 receptor) is expressed in a wide variety of tissues. In this context, SDF-1 is a potent progenitor cell mobilization agent present in the bone marrow niche, and its receptor CXCR4 is essential in the migration and homing of stem cells [73]. Therefore, the interaction between this axis and CXCR4 expression on the surface of MSCs cultured under hypoxia has an important role in the migration of transplanted cells [37].

## 11. Final Considerations

The recent interest in the potential application of MSCs in regenerative medicine and the availability of more appropriate methods for cell cultures were followed by the conduction and publication of several studies assessing the effects of low O<sub>2</sub> levels on the behavior and function of MSCs. This condition of cell culture appears to enhance MSCs migration and immune regulatory performance in damaged tissues with relevant consequences for cellular therapy. However, optimal conditions for the culture of MSCs have not yet been clearly defined and it is extremely important to accurately determine whether cells cultured under hypoxia are affected in terms of their differentiation, proliferation, and morphology, among other aspects, including the secretion of trophic factors and membrane markers associated with MSCs migration and homing. Although the most of studies suggest a beneficial effect of hypoxia on MSCs, some authors have also reported opposite and negative effects. In this context, further research is essential so that a consensus can be reached, especially because of the great interest in standardizing the culture of MSCs for use in cell therapy, a promising tool for the treatment of different malignant conditions that are untreatable today.

## 12. Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support provided by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA).

## REFERENCES

- [1] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz, "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement," [doi:10.1080/14653240600855905](https://doi.org/10.1080/14653240600855905)
- [2] S. P. Bruder, K. H. Kraus, V. M. Goldberg and S. Kadiyala, "The Effect of Implants Loaded with Autologous Mesenchymal Stem Cells on the Healing of Canine Segmental Bone Defects," *The Journal of Bone Joint Surgery*, Vol. 80, No. 7, 1998, pp. 985-996.
- [3] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan and K. S. Lalykina, "The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells," *Cell and Tissue Kinetics*, Vol. 3, No. 4, 1970, pp. 393-403.
- [4] D. J. Prockop, "Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues," *Science*, Vol. 276, No. 5309, 1997, pp. 71-74. [doi:10.1126/science.276.5309.71](https://doi.org/10.1126/science.276.5309.71)
- [5] A. I. Caplan, "All MSCs Are Pericytes?" *Cell Stem Cell*, Vol. 3, No. 3, 2008, pp. 229-230. [doi:10.1016/j.stem.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.008)



- [6] 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 and D. R. Marshak, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells," *Science*, Vol. 284, No. 5411, 1999, pp. 143-147. [doi:10.1126/science.284.5411.143](https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143)
- [7] P. D. Cooper, A. M. Burt and J. N. Wilson, "Critical Effect of Oxygen Tension on Rate of Growth of Animal Cells in Continuous Suspended Culture," *Nature*, Vol. 182, No. 4648, 1958, pp. 1508-1509. [doi:10.1038/1821508b0](https://doi.org/10.1038/1821508b0)
- [8] H. T. Zwartouw and J. C. Westwood, "Factors Affecting Growth and Glycolysis in Tissue Culture," *British Journal of Experimental Pathology*, Vol. 39, No. 5, 1958, pp. 529-539.
- [9] S. Aggarwal and M. F. Pittenger, "Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses," *Blood*, Vol. 105, No. 4, 2005, pp. 1815-1822. [doi:10.1182/blood-2004-04-1559](https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559)
- [10] C. T. van Velthoven, A. Kavelaars, F. van Bel and C. J. Heijnen, "Mesenchymal Stem Cell Treatment after Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury Improves Behavioral Outcome and Induces Neuronal and Oligodendrocyte Regeneration," *Brain Behavior Immunity*, Vol. 24, No. 3, 2010, pp. 387-393. [doi:10.1016/j.bbi.2009.10.017](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.10.017)
- [11] L. F. Raheja, D. C. Genetos and C. E. Yellowley, "The Effect of Oxygen Tension on the Long-Term Osteogenic Differentiation and MMP/TIMP Expression of Human Mesenchymal Stem Cells," *Cells Tissues Organs*, Vol. 191, No. 3, 2010, pp. 175-184. [doi:10.1159/000235679](https://doi.org/10.1159/000235679)
- [12] L. F. Raheja, D. C. Genetos, A. Wong and C. E. Yellowley, "Hypoxic Regulation of Mesenchymal Stem Cell Migration: The Role of RhoA and HIF-1Alpha," *Cell Biology International*, Vol. 35, No. 10, 2011, pp. 981-989. [doi:10.1042/CBI20100733](https://doi.org/10.1042/CBI20100733)
- [13] G. Y. Rochefort, B. Delorme, A. Lopez, O. Herault, P. Bonnet, P. Charbord, V. Eder and J. Domenech, "Multipotent Mesenchymal Stem Cells Are Mobilized into Peripheral Blood by Hypoxia," *Stem Cells*, Vol. 24, No. 10, 2006, pp. 2202-2208. [doi:10.1634/stemcells.2006-0164](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0164)
- [14] G. D'Ippolito, S. Diabira, G. A. Howard, B. A. Roos and P. C. Schiller, "Low Oxygen Tension Inhibits Osteogenic Differentiation and Enhances Stemness of Human MI-AMI Cells," *Bone*, Vol. 39, No. 3, 2006, pp. 513-522. [doi:10.1016/j.bone.2006.02.061](https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.061)
- [15] L. Liu, Q. Yu, J. Lin, X. Lai, W. Cao, K. Du, Y. Wang, K. Wu, Y. Hu, L. Zhang, H. Xiao, Y. Duan and H. Huang, "Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Is Essential for Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cell Mobilization into the Peripheral Blood," *Stem Cells Development*, Vol. 20, No. 11, 2011, pp. 1961-1971. [doi:10.1089/scd.2010.0453](https://doi.org/10.1089/scd.2010.0453)
- [16] R. Das, H. Jahr, G. J. van Osch and E. Farrell, "The Role of Hypoxia in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Considerations for Regenerative Medicine Approaches," *Tissue Engineering Part B Reviews*, Vol. 16, No. 2, 2010, pp. 159-168. [doi:10.1089/ten.teb.2009.0296](https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0296)
- [17] C. Holzwarth, M. Vaegler, F. Gieseke, S. M. Pfister, R. Handgretinger, G. Kerst and I. Muller, "Low Physiologic Oxygen Tensions Reduce Proliferation and Differentiation of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells," *BMC Cell Biology*, Vol. 11, 2010, p. 11. [doi:10.1186/1471-2121-11-11](https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-11)
- [18] R. P. Hill, D. T. Marie-Egyptienne and D. W. Hedley, "Cancer Stem Cells, Hypoxia and Metastasis," *Seminars in Radiation Oncology*, Vol. 19, No. 2, 2009, pp. 106-111.
- [19] A. Efimenko, E. Starostina, N. Kalinina and A. Stolzing, "Angiogenic Properties of Aged Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells after Hypoxic Conditioning," *Journal of Translational Medicine*, Vol. 9, 2011, p. 10. [doi:10.1186/1479-5876-9-10](https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-10)
- [20] S. P. Hung, J. H. Ho, Y. R. Shih, T. Lo and O. K. Lee, "Hypoxia Promotes Proliferation and Osteogenic Differentiation Potentials of Human Mesenchymal Stem Cells," *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 30, No. 2, 2012, pp. 260-266. [doi:10.1002/jor.21517](https://doi.org/10.1002/jor.21517)
- [21] I. Rosova, M. Dao, B. Capoccia, D. Link and J. A. Nolte, "Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells," *Stem Cells*, Vol. 26, No. 8, 2008, pp. 2173-2182. [doi:10.1634/stemcells.2007-1104](https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1104)
- [22] N. B. Nardi and S. Meirelles Lda, "Mesenchymal Stem-Cells: Isolation, *in Vitro* Expansion and Characterization," *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 174, 2006, pp. 249-282. [doi:10.1007/3-540-31265-X\\_11](https://doi.org/10.1007/3-540-31265-X_11)
- [23] K. Le Blanc and D. Mougiakakos, "Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and the Innate Immune System," *Nature Reviews Immunology*, Vol. 12, No. 5, 2012, pp. 383-396. [doi:10.1038/nri3209](https://doi.org/10.1038/nri3209)
- [24] C. Lo Celso, J. W. Wu and C. P. Lin, "In Vivo Imaging of Hematopoietic Stem Cells and Their Microenvironment," *Journal of Biophotonics*, Vol. 2, No. 11, 2009, pp. 619-631. [doi:10.1002/jbio.200910072](https://doi.org/10.1002/jbio.200910072)
- [25] Y. Shen and S. K. Nilsson, "Bone, Microenvironment and Hematopoiesis," *Current Opinion in Hematology*, Vol. 19, No. 4, 2012, pp. 250-255.
- [26] R. Schofield, "The Stem Cell System," *Biomedicine Pharmacotherapy*, Vol. 37, No. 8, 1983, pp. 375-380.
- [27] M. G. Cipolleschi, P. Dello Sbarba and M. Olivetto, "The Role of Hypoxia in the Maintenance of Hematopoietic Stem Cells," *Blood*, Vol. 82, No. 7, 1993, pp. 2031-2037.
- [28] D. P. Lennon, J. M. Edmison and A. I. Caplan, "Cultivation of Rat Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Reduced Oxygen Tension: Effects on *in Vitro* and *in Vivo* Osteochondrogenesis," *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 187, No. 3, 2001, pp. 345-355. [doi:10.1002/jcp.1081](https://doi.org/10.1002/jcp.1081)
- [29] T. Ma, W. L. Grayson, M. Frohlich and G. Vunjak-Novakovic, "Hypoxia and Stem Cell-Based Engineering of Mesenchymal Tissues," *Biotechnology Progress*, Vol. 25, No. 1, 2009, pp. 32-42. [doi:10.1002/btpr.128](https://doi.org/10.1002/btpr.128)
- [30] Z. Ivanovic, "Hypoxia or *in Situ* Normoxia: The Stem Cell Paradigm," *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 219, No. 2, 2009, pp. 271-275. [doi:10.1002/jcp.21690](https://doi.org/10.1002/jcp.21690)
- [31] I. G. Winkler, V. Barbier, R. Wadley, A. C. Zannettino, S. Williams and J. P. Levesque, "Positioning of Bone Mar-

- row Hematopoietic and Stromal Cells Relative to Blood Flow *in Vivo*: Serially Reconstituting Hematopoietic Stem Cells Reside in Distinct Nonperfused Niches,” *Blood*, Vol. 116, No. 3, 2010, pp. 375-385.
- [32] W. Zhu, J. Chen, X. Cong, S. Hu and X. Chen, “Hypoxia and Serum Deprivation-Induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells,” *Stem Cells*, Vol. 24, No. 2, 2006, pp. 416-425. [doi:10.1634/stemcells.2005-0121](https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0121)
- [33] S. Lord-Dufour, I. B. Copland, L. C. Levros Jr., M. Post, A. Das, C. Khosla, J. Galipeau, E. Rassart and B. Annabi, “Evidence for Transcriptional Regulation of the Glucose-6-Phosphate Transporter by HIF-1Alpha: Targeting G6PT with Mumbaistatin Analogs in Hypoxic Mesenchymal Stromal Cells,” *Stem Cells*, Vol. 27, No. 3, 2009, pp. 489-497. [doi:10.1634/stemcells.2008-0855](https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0855)
- [34] J. A. Wang, T. L. Chen, J. Jiang, H. Shi, C. Gui, R. H. Luo, X. J. Xie, M. X. Xiang and X. Zhang, “Hypoxic Preconditioning Attenuates Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells,” *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 29, No. 1, 2008, pp. 74-82. [doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00716.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00716.x)
- [35] W. L. Grayson, F. Zhao, B. Bunnell and T. Ma, “Hypoxia Enhances Proliferation and Tissue Formation of Human Mesenchymal Stem Cells,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 358, No. 3, 2007, pp. 948-953.
- [36] S. P. Hung, J. H. Ho, Y. R. Shih, T. Lo and O. K. Lee, “Hypoxia Promotes Proliferation and Osteogenic Differentiation Potentials of Human Mesenchymal Stem Cells,” *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 30, No. 2, 2012, pp. 260-266. [doi:10.1002/jor.21517](https://doi.org/10.1002/jor.21517)
- [37] E. Martin-Rendon, S. J. Hale, D. Ryan, D. Baban, S. P. Forde, M. Roubelakis, D. Sweeney, M. Moukayed, A. L. Harris, K. Davies and S. M. Watt, “Transcriptional Profiling of Human Cord Blood CD133+ and Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Response to Hypoxia,” *Stem Cells*, Vol. 25, No. 4, 2007, pp. 1003-1012. [doi:10.1634/stemcells.2006-0398](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0398)
- [38] H. Ren, Y. Cao, Q. Zhao, J. Li, C. Zhou, L. Liao, M. Jia, H. Cai, Z. C. Han, R. Yang, G. Chen and R. C. Zhao, “Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells under Hypoxic Conditions,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 347, No. 1, 2006, pp. 12-21. [doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.169](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.169)
- [39] S. C. Hung, R. R. Pochampally, S. C. Hsu, C. Sanchez, S. C. Chen, J. Spees and D. J. Prockop, “Short-Term Exposure of Multipotent Stromal Cells to Low Oxygen Increases Their Expression of CX3CR1 and CXCR4 and Their Engraftment *in Vivo*,” *PLoS One*, Vol. 2, No. 5, 2007, p. e416. [doi:10.1371/journal.pone.0000416](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000416)
- [40] D. Baksh, L. Song and R. S. Tuan, “Adult Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Application in Cell and Gene Therapy,” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol. 8, No. 3, 2004, pp. 301-316. [doi:10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x)
- [41] J. Huang, F. Deng, L. Wang, X. R. Xiang, W. W. Zhou, N. Hu and L. Xu, “Hypoxia Induces Osteogenesis-Related Activities and Expression of Core Binding Factor Alpha1 in Mesenchymal Stem Cells,” *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, Vol. 224, No. 1, 2011, pp. 7-12.
- [42] T. Fink, L. Abildtrup, K. Fogd, B. M. Abdallah, M. Kassem, P. Ebbesen and V. Zachar, “Induction of Adipocyte-Like Phenotype in Human Mesenchymal Stem Cells by Hypoxia,” *Stem Cells*, Vol. 22, No. 7, 2004, pp. 1346-1355. [doi:10.1634/stemcells.2004-0038](https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0038)
- [43] C. Fehrer, R. Brunauer, G. Laschober, H. Unterluggauer, S. Reitingner, F. Kloss, C. Gully, R. Gassner and G. Lepperdinger, “Reduced Oxygen Tension Attenuates Differentiation Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells and Prolongs Their Lifespan,” *Aging Cell*, Vol. 6, No. 6, 2007, pp. 745-757. [doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x](https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x)
- [44] E. Potier, E. Ferreira, R. Andriamanalijaona, J. P. Pujol, K. Oudina, D. Logeart-Avramoglou and H. Petite, “Hypoxia Affects Mesenchymal Stromal Cell Osteogenic Differentiation and Angiogenic Factor Expression,” *Bone*, Vol. 40, No. 4, 2007, pp. 1078-1087. [doi:10.1016/j.bone.2006.11.024](https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.11.024)
- [45] C. Wan, J. Shao, S. R. Gilbert, R. C. Riddle, F. Long, R. S. Johnson, E. Schipani and T. L. Clemens, “Role of HIF-1Alpha in Skeletal Development,” *Annals of New York Academy of Science*, Vol. 1192, 2010, pp. 322-326. [doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05238.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05238.x)
- [46] M. G. Valorani, E. Montelatici, A. Germani, A. Biddle, D. D’Alessandro, R. Strollo, M. P. Patrizi, L. Lazzari, E. Nye, W. R. Otto, P. Pozzilli and M. R. Alison, “Pre-Culturing Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells under Hypoxia Increases Their Adipogenic and Osteogenic Differentiation Potentials,” *Cell Proliferation*, Vol. 45, No. 3, 2012, pp. 225-238. [doi:10.1111/j.1365-2184.2012.00817.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00817.x)
- [47] I. Muller, M. Vaegler, C. Holzwarth, N. Tzaribatchev, S. M. Pfister, B. Schutt, P. Reize, J. Greil, R. Handgretinger and M. Rudert, “Secretion of Angiogenic Proteins by Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Potential in the Treatment of Avascular Osteonecrosis,” *Leukemia*, Vol. 22, No. 11, 2008, pp. 2054-2061. [doi:10.1038/leu.2008.217](https://doi.org/10.1038/leu.2008.217)
- [48] A. Salim, R. P. Nacamuli, E. F. Morgan, A. J. Giaccia and M. T. Longaker, “Transient Changes in Oxygen Tension Inhibit Osteogenic Differentiation and *Runx2* Expression in Osteoblasts,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 38, 2004, pp. 40007-40016. [doi:10.1074/jbc.M403715200](https://doi.org/10.1074/jbc.M403715200)
- [49] K. Scherer, M. Schunke, R. Sellckau, J. Hassenpflug and B. Kurz, “The Influence of Oxygen and Hydrostatic Pressure on Articular Chondrocytes and Adherent Bone Marrow Cells *in Vitro*,” *Biorheology*, Vol. 41, No. 3-4, 2004, pp. 323-333.
- [50] M. Kanichai, D. Ferguson, P. J. Prendergast and V. A. Campbell, “Hypoxia Promotes Chondrogenesis in Rat Mesenchymal Stem Cells: A Role for AKT and Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1Alpha,” *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 216, No. 3, 2008, pp. 708-715. [doi:10.1002/jcp.21446](https://doi.org/10.1002/jcp.21446)
- [51] J. C. Robins, N. Akeno, A. Mukherjee, R. R. Dalal, B. J. Aronow, P. Koopman and T. L. Clemens, “Hypoxia Induces Chondrocyte-Specific Gene Expression in Mesen-

- chymal Cells in Association with Transcriptional Activation of Sox9,” *Bone*, Vol. 37, No. 3, 2005, pp. 313-322. [doi:10.1016/j.bone.2005.04.040](https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.04.040)
- [52] W. L. Grayson, F. Zhao, R. Izadpanah, B. Bunnell and T. Ma, “Effects of Hypoxia on Human Mesenchymal Stem Cell Expansion and Plasticity in 3D Constructs,” *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 207, No. 2, 2006, pp. 331-339. [doi:10.1002/jcp.20571](https://doi.org/10.1002/jcp.20571)
- [53] L. A. Mylotte, A. M. Duffy, M. Murphy, T. O’Brien, A. Samali, F. Barry and E. Szegezdi, “Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment,” *Stem Cells*, Vol. 26, No. 5, 2008, pp. 1325-1336. [doi:10.1634/stemcells.2007-1072](https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1072)
- [54] S. Carrancio, N. Lopez-Holgado, F. M. Sanchez-Guijo, E. Villaron, V. Barbado, S. Tabera, M. Diez-Campelo, J. Blanco, J. F. San Miguel and M. C. Del Canizo, “Optimization of Mesenchymal Stem Cell Expansion Procedures by Cell Separation and Culture Conditions Modification,” *Experimental Hematology*, Vol. 36, No. 8, 2008, pp. 1014-1021. [doi:10.1016/j.exphem.2008.03.012](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.03.012)
- [55] E. M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause and A. Keating, “Clarification of the Nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy Position Statement,” *Cytotherapy*, Vol. 7, No. 5, 2005, pp. 393-395. [doi:10.1080/14653240500319234](https://doi.org/10.1080/14653240500319234)
- [56] M. Kassem, M. Kristiansen and B. M. Abdallah, “Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential Use in Therapy,” *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, Vol. 95, No. 5, 2004, pp. 209-214. [doi:10.1111/j.1742-7843.2004.pto950502.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2004.pto950502.x)
- [57] M. Miura, Y. Miura, H. M. Padilla-Nash, A. A. Molinolo, B. Fu, V. Patel, B. M. Seo, W. Sonoyama, J. J. Zheng, C. C. Baker, W. Chen, T. Ried and S. Shi, “Accumulated Chromosomal Instability in Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Leads to Malignant Transformation,” *Stem Cells*, Vol. 24, No. 4, 2006, pp. 1095-1103. [doi:10.1634/stemcells.2005-0403](https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0403)
- [58] A. S. Grigorian, P. V. Kruglyakov, U. A. Taminkina, O. A. Efimova, A. A. Pendina, A. V. Voskresenskaya, T. V. Kuznetsova and D. G. Polyntsev, “Alterations of Cytological and Karyological Profile of Human Mesenchymal Stem Cells during *in Vitro* Culturing,” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 150, No. 1, 2010, pp. 125-130. [doi:10.1007/s10517-010-1086-x](https://doi.org/10.1007/s10517-010-1086-x)
- [59] D. Rubio, J. Garcia-Castro, M. C. Martin, R. de la Fuente, J. C. Cigudosa, A. C. Lloyd and A. Bernad, “Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation,” *Cancer Research*, Vol. 65, No. 8, 2005, pp. 3035-3039.
- [60] L. Basciano, C. Nemos, B. Foliguet, N. de Isla, M. de Carvalho, N. Tran and A. Dalloul, “Long Term Culture of Mesenchymal Stem Cells in Hypoxia Promotes a genetic Program Maintaining Their Undifferentiated and Multipotent Status,” *BMC Cell Biology*, Vol. 12, 2011, p. 12. [doi:10.1186/1471-2121-12-12](https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-12)
- [61] Y. Jin, T. Kato, M. Furu, A. Nasu, Y. Kajita, H. Mitsui, M. Ueda, T. Aoyama, T. Nakayama, T. Nakamura and J. Toguchida, “Mesenchymal Stem Cells Cultured under Hypoxia Escape from Senescence via Down-Regulation of p16 and Extracellular Signal Regulated Kinase,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 391, No. 3, 2010, pp. 1471-1476. [doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.096](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.096)
- [62] H. Liu, W. Xue, G. Ge, X. Luo, Y. Li, H. Xiang, X. Ding, P. Tian and X. Tian, “Hypoxic Preconditioning Advances CXCR4 and CXCR7 Expression by Activating HIF-1Alpha in MSCs,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 401, No. 4, 2010, pp. 509-515. [doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.076](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.076)
- [63] C. C. Tsai, Y. J. Chen, T. L. Yew, L. L. Chen, J. Y. Wang, C. H. Chiu and S. C. Hung, “Hypoxia Inhibits Senescence and Maintains Mesenchymal Stem Cell Properties through Down-Regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST,” *Blood*, Vol. 117, No. 2, 2011, pp. 459-469. [doi:10.1182/blood-2010-05-287508](https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-287508)
- [64] S. Ohnishi, T. Yasuda, S. Kitamura and N. Nagaya, “Effect of Hypoxia on Gene Expression of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Cells,” *Stem Cells*, Vol. 25, No. 5, 2007, pp. 1166-1177. [doi:10.1634/stemcells.2006-0347](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0347)
- [65] M. Shi, Z. W. Liu and F. S. Wang, “Immunomodulatory Properties and Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells,” *Clinical and Experimental Immunology*, Vol. 164, No. 1, 2011, pp. 1-8. [doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x)
- [66] C. D. Wan, R. Cheng, H. B. Wang and T. Liu, “Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissues in a Rat Orthotopic Liver Transplantation Model,” *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, Vol. 7, No. 1, 2008, pp. 29-33.
- [67] P. R. Crisostomo, Y. Wang, T. A. Markel, M. Wang, T. Lahm and D. R. Meldrum, “Human Mesenchymal stem Cells Stimulated by TNF-Alpha, LPS, or Hypoxia Produce Growth Factors by an NF Kappa B, but Not JNK-Dependent Mechanism,” *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, Vol. 294, No. 3, 2008, pp. C675-C682. [doi:10.1152/ajpcell.00437.2007](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00437.2007)
- [68] E. H. Wu, H. S. Li, T. Zhao, J. D. Fan, X. Ma, L. Xiong, W. J. Li, L. L. Zhu and M. Fan, “Effect of hypoxia on the gene profile of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells,” *Acta Physiologica Sinica*, Vol. 59, No. 2, 2007, pp. 227-232.
- [69] C. Muir, L. W. Chung, D. D. Carson and M. C. Farach-Carson, “Hypoxia Increases VEGF-A Production by Prostate Cancer and Bone Marrow Stromal Cells and Initiates Paracrine Activation of Bone Marrow Endothelial Cells,” *Clinical and Experimental Metastasis*, Vol. 23, No. 1, 2006, pp. 75-86. [doi:10.1007/s10585-006-9021-2](https://doi.org/10.1007/s10585-006-9021-2)
- [70] Y. Wang, Y. Deng and G. Q. Zhou, “SDF-1Alpha/CXCR4-Mediated Migration of Systemically Transplanted Bone Marrow Stromal Cells towards Ischemic Brain Lesion in a Rat Model,” *Brain Research*, Vol. 1195, No. 2008, pp. 104-112. [doi:10.1016/j.brainres.2007.11.068](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.11.068)
- [71] X. Hu, S. P. Yu, J. L. Fraser, Z. Lu, M. E. Ogle, J. A. Wang and L. Wei, “Transplantation of Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Improves Infarcted Heart Function via Enhanced Survival of Implanted Cells and Angiogenesis,” *Journal of Thoracic*

## **7. ARTIGO II**

EFFECTS OF HYPOXIA IN LONG TERM IN VITRO EXPANSION OF HUMAN  
BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

(Artigo original submetido à revista *Cytotherapy*)

EFFECTS OF HYPOXIA IN LONG TERM IN VITRO EXPANSION OF HUMAN BONE  
MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

Annelise Pezzi<sup>1,2</sup>, Bruna Amorin<sup>1,3</sup>, Álvaro Laureano<sup>1,2</sup>, Vanessa Valim<sup>1,2</sup>, Alice Dahmer<sup>1,2</sup>,  
Bruna Zambonato<sup>1,2</sup>, Filipe Sehn<sup>1,2</sup>, Ianaê Wilke<sup>1,2</sup>, Lia Bruschi<sup>4</sup>, Maria Aparecida Lima da  
Silva<sup>1</sup>, Eduardo Filippi-Chiela<sup>2</sup>, Lucia Silla<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Celular Therapy Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Center for Experimental  
Research, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Post-graduation: Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Centro Universitário Ritter dos Reis, Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup>Feevale University, Novo Hamburgo, Brazil

<sup>5</sup>Hematology and Bone Marrow Transplantation of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto  
Alegre, Brazil.

*Correspondence to:*

Professor Lucia Silla, MD, PhD

Cellular Therapy Center

Center for Experimental Research, / Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350

Postal Code: 90035-903- Porto Alegre/RS, Brazil

Telephone: 55 (51) 3359-8317

E-mail: lsilla@hcpa.ufrgs.br

## **Abstract**

**Introduction:** Mesenchymal stem cells (MSC) are considered multipotent stromal, non-hematopoietic cells with properties of self-renovation and differentiation. Optimal conditions for culture of MSC have been under investigation. The oxygen tension used for cultivation has been studied and appears to play an important role in biological behavior of mesenchymal cells. The aim is characterize MSC in hypoxia and normoxia conditions comparing their morphological and functional characteristics. **Methods:** bone marrow-derived mesenchymal stem cells obtained from 15 healthy donors and cultured. MSC obtained from each donor were separated into two cultivation conditions normoxia (21 % O<sub>2</sub>) and hypoxia (three donors at 1 %, three donors at 2 %, five donors at 3 %, and four donors at 4 % O<sub>2</sub>) up to second passage. MSC were evaluated for proliferation, differentiation, immunophenotyping, size and cell complexity, oxidative stress, mitochondrial activity, and autophagy. **Results:** Culture conditions applied didn't seem to affect immunophenotypic features and cellular plasticity. However, cells subjected to hypoxia showed smaller size and greater cellular complexity, besides lower proliferation (p<0.002). Furthermore, cells cultured in low O<sub>2</sub> tension had lower mitochondrial activity (p<0.03) and a reduced tendency to autophagy, although oxidative stress didn't vary among groups (p< 0.39). **Conclusion:** Oxygen tension seems to be a key regulator of cellular adaptation in vitro, and metabolic effects underlying this variable remain undescribed. Heterogeneity or even lack of results on the impact of oxygen concentration used for expanding MSC highlights the need for further research, in order to optimize conditions of cultivation and expansion and achieve greater safety and therapeutic efficacy.

**Keywords:** Mesenchymal Stem Cell, Hypoxia, Reactive oxygen species, mitochondrial activity, autophagy.

## **Introduction**

Mesenchymal stem cells (MSCs), initially described by Friedenstein and colleagues (1) in the seventies as cells morphologically similar to fibroblasts with high adhesion to plastic surfaces, are multipotent non-hematopoietic cells, with property of self-renewal and differentiation into mesodermic tissues.

MSCs can be isolated from many tissues such as bone marrow (BM), adipose tissue, dental pulp, umbilical cord, synovium, fetal liver and lung, placenta, endometrium, trabecular or compact bone, kidney, and articular cartilage. Some of their unique properties suggest MSCs as ideal for cell therapy in a series of pathologies. Besides being easy to isolate and expand in vitro, their potent immunomodulatory effect makes MSCs a promising approach for treating auto and alloimmune conditions such as graft-versus-host disease (GVHD), inflammatory bowel disease, multiple sclerosis, rheumatic diseases, lupus erythematosus and type I diabetes. The use of MSCs in regenerative medicine is based on their ability of differentiation and restoration of tissue homeostasis. It is also highlighted their migratory capacity to site of injury, paracrine action, and low immunogenicity (2-4).

Although it's possible to isolate MSCs from various tissue sources, concentration in these is very low (5, 6) making it difficult to obtain an adequate number of cells for clinical use without prior in vitro expansion (7). Currently, most MSCs expansion procedures are conducted using an ambient oxygen concentration wherein the cells are exposed to 21 % O<sub>2</sub>, that leads to about 4 to 10 fold greater than the concentration found in their natural niches (8, 9).

In the last years, interest in potential of clinical use of MSCs has led to an increasing number of studies on how conditions of culture and expansion impact behavior and function of these cells amongst it the oxygen tension utilized for culture. The influence of oxygen tension in morphology, phenotype, proliferative capacity, and functionality of MSCs has been increasingly studied with controversial results. Such controversies could be related to the different culture conditions such as the different oxygen tension utilized in hypoxic chambers (10-23).

Thus, cell culture in oxygen tension that best mimics in vivo condition may have effects in several ways, and therefore is of great importance the characterization and comparison of MSCs grown in hypoxia and normoxia regarding morphological, proliferative, metabolic, and functional aspects in order to optimize culture conditions suitable for clinical use, so called Clinical Grade cell expansion, in favor of achieving greater therapeutic safety and efficacy.

## Methods

### *Samples*

After obtaining written informed consent, discharged bags and filters of BM grafts were obtained from 15 healthy hematopoietic stem cell donors. MSC obtained from each donor were splitted into two flasks and divided in two cultivation conditions normoxia (21 % O<sub>2</sub>) and hypoxia (1-4 % O<sub>2</sub>) according to figure 1.

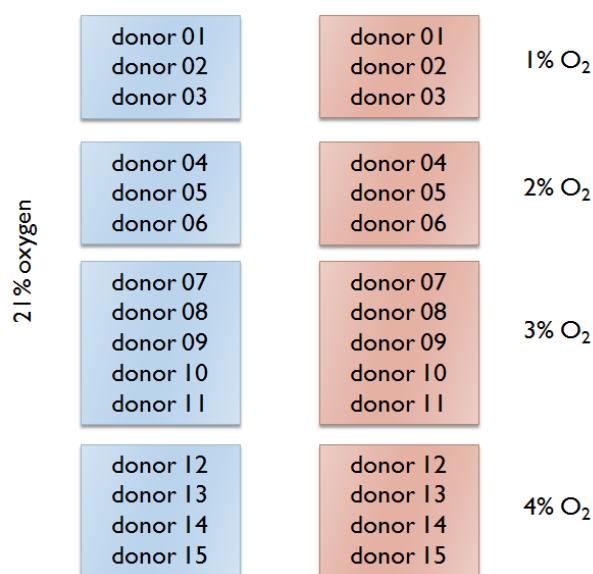


Figure 1: Representation of culture conditions used in MSC samples from each donor.

### *Cell Cultures*

Bags and filters were washed with 100 mL phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, Invitrogen), and cells were centrifuged at 400 g 10 min. After isolation, cells were counted in Neubauer chamber and cell viability checked by dye exclusion test with Trypan Blue 0.4% (Sigma-Aldrich). Next, cells were plated in culture flasks (TTP) at density of 300,000 living



nucleated cells/cm<sup>2</sup> in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10 % human platelet lysate, and 1 % of penicillin/streptomycin. Culture flasks were then transferred to humidified incubators with 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C with oxygen tension (percentage of O<sub>2</sub>) according to figure 1. Cell growth was monitored by microscopy and when culture reached confluency of approximately 80 %, cells were detached by enzymatic treatment using 0.05 % trypsin/EDTA (Gibco, Invitrogen), and then plated in new bottles (TTP) in a concentration of 5,000 cells/cm<sup>2</sup> up to second passage.

### *Proliferation*

In order to compare rates of cell proliferation at the varying O<sub>2</sub> levels, population doubling (PD) was calculated using the following equation:

$$PD = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$$

Where N(t) is the number of cells per well at the time of passage, and N(t<sub>0</sub>) is the number of cells seeded at previous passage.

### *Immunophenotyping*

Cells were analyzed for membrane markers by flow cytometry on their second passage for the following markers: CD73, CD90, CD105, CD14, CD34, CD19, CD45 and HLA-DR. After detaching the cells, viability was determined and concentration adjusted at 2 x 10<sup>6</sup> cells/mL in PBS (Gibco, Invitrogen), and cells were then distributed in flow cytometry tubes (50µL/tube). In each tube 10µL of antibodies was added (according to the manufacturer's recommendations) in appropriate combinations, and cells were incubated for 30 min at 4 °C, protected from light. After that, 1 mL of PBS was added, cells were centrifuged at 400 g for 10 min, supernatant was removed to eliminate unbound antibodies, and cells were resuspended in 500µL PBS. Cells were assayed in a flow cytometer (FACS Canto II, BD Biosciences) and data analyzed with Flow-jo software. Unmarked MSC were analyzed for their size (FSC) and internal complexity (SSC) in the same equipment. FSC-A and SSC-A parameters of the

software were used for cell size and internal complexity measurements, respectively, as recommended by BD Biosciences (24).

#### *MSC differentiation*

For adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation experiments, on second-passage MSC were cultured in STEMPRO® Adipogenic, Osteogenic and Chondrogenic Differentiation Kits (STEMPRO®, Life Technologies), respectively. Test cells were maintained in 24-well plates and plated at concentration of  $5 \times 10^3$  cells per well in duplicate. Media was changed every two days. Adipogenic, osteogenic and chondrogenic stimulation were conducted for 21 days.

For microscopic evaluation, cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS for 10 min and stained for 20 min at room temperature with the following stainings: adipogenesis was verified with Oil Red-O (Sigma-Aldrich) staining; matrix calcification, which is present following osteogenesis, was visualized with Alizarin Red (Sigma-Aldrich); and finally, chondrogenesis was stained with Alcian blue (Sigma-Aldrich). Excess stain was removed by several washes with PBS, and stained cells visualized with inverted microscope (AxioVert A1, Zeiss).

#### *ROS detection*

Second-passage cells were grown in 6-well plates at density of  $3 \times 10^4$  per well in triplicate up to confluency of 80 %. For reactive oxygen species (ROS) detection, the level of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) was determined using 6'-carboxy-2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), CellROX® deep red reagent (C10422, Life Technologies), and analyzed by flow cytometer FACSCanto II (BD Biosciences) as indicated by manufacturer.

#### *Autophagy*

Second-passage cells were grown in 6-well plates at density of  $3 \times 10^4$  per well in triplicate up to confluency of 80 %. Acridine orange (AO) (235474, Sigma-Aldrich) staining was used for detection and quantification of acidic vesicular organelles in autophagic cells. Briefly, cells were collected and stained with 1  $\mu$ g/mL AO for 15 min. In AO-stained cells,

cytoplasm fluorescence is bright green, and acidic vesicular organelles fluorescence bright red. Green (510-530 nm) and red (650 nm) fluorescence emission from  $1 \times 10^4$  cells illuminated with blue excitation light (488 nm) was measured on flow cytometer FACSCanto II (BD Bioscience), and analyzed with Flow-jo software.

#### *Mitochondrial activity*

Second-passage cells were grown in 6-well plates at density of  $3 \times 10^4$  per well in triplicate up to confluency of 80 %. Mitochondrial transmembrane potential was evaluated with Mitotracker® Deep Red FM fluorochrome (M22426, Life Technologies) according to manufacturer guidelines. MitoTracker® Deep Red also measures mitochondrial mass, but does so in a manner that is dependent on the maintenance of mitochondrial membrane potential.

#### *Statistical Analysis*

Data were analyzed using SPSS 17.0. Variables were expressed as mean  $\pm$  SD and compared with paired sample Student's "t" test for variables with Gaussian distribution or Wilcoxon test for paired sample. Two-tailed p values less than 0.05 were considered statistically significant.

#### *Ethical aspects*

All procedures described were performed in accordance with Declaration of Helsinki and its later amendments, and were approved by the Local Bioethics Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (registry number 12-0484). Written informed consent for using samples for research purposes was obtained from each donor.

## **Results**

#### *Characterization of sample*

Bone marrow-derived MSC from 15 healthy donors were isolated and cultured, being 40 % (6) of donors female and 60 % (9) male, with a median age of 20 years (age range of 1 to 51 years; table 1).

Table 1: MSC's donors general characteristics.

	<b>Age(months)</b>	<b>Gender</b>
<b>MSC01</b>	36	M
<b>MSC02</b>	19	M
<b>MSC03</b>	13	M
<b>MSC04</b>	51	M
<b>MSC05</b>	19	M
<b>MSC06</b>	18	M
<b>MSC07</b>	20	F
<b>MSC08</b>	45	F
<b>MSC09</b>	27	F
<b>MSC10</b>	21	F
<b>MSC11</b>	1	M
<b>MSC12</b>	15	M
<b>MSC13</b>	35	F
<b>MSC14</b>	15	F
<b>MSC15</b>	51	M

MSC: Mesenchymal Stem Cell; F: female; M: male.

#### *Cell viability and population doubling*

There was no significant difference in viability between cells grown in normoxia and hypoxia conditions, with a mean ( $\pm$  SD) of 98.2 % ( $\pm$  3.22) and 99 % ( $\pm$  1.05) of living cells, respectively. However, cells grown at 21 % oxygen showed greater proliferation with average population doubling of 3.75 ( $\pm$  0.62) vs. 3 ( $\pm$  0.65) than the ones cultured in hypoxia ( $p < 0.002$ ; figure 2a). Comparing cell proliferation only for cells submitted to low O<sub>2</sub> tension, among groups cultivated in O<sub>2</sub> concentrations of 1, 2, 3, and 4 %, there was no significant difference ( $p > 0.05$ )(figure2b).

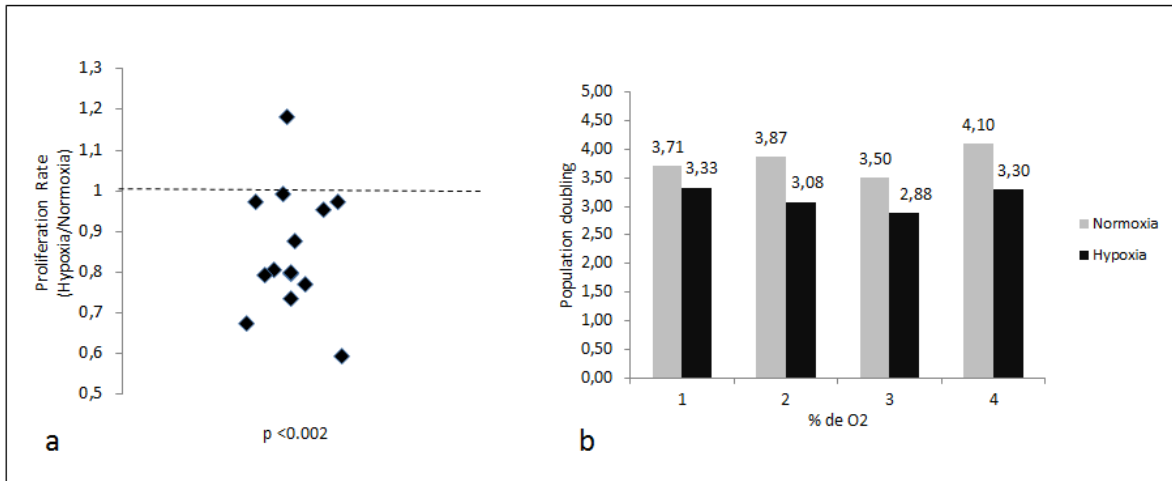


Figure 2: a: Hypoxia/normoxia population doubling ratio; b: Mean population doubling at O<sub>2</sub> concentrations of 1 to 4 % in comparison to 21 % O<sub>2</sub>.

### *Immunophenotyping*

Expectedly, all cells expressed homogeneous immunophenotypic characteristics consistent with those of mesenchymal progenitor lineage, indistinguishably across groups. Cells were positive for CD73, CD90, and CD105, while negative for CD3, CD34, CD19, CD45, CD14 and HLA-DR, shown in figure 3.

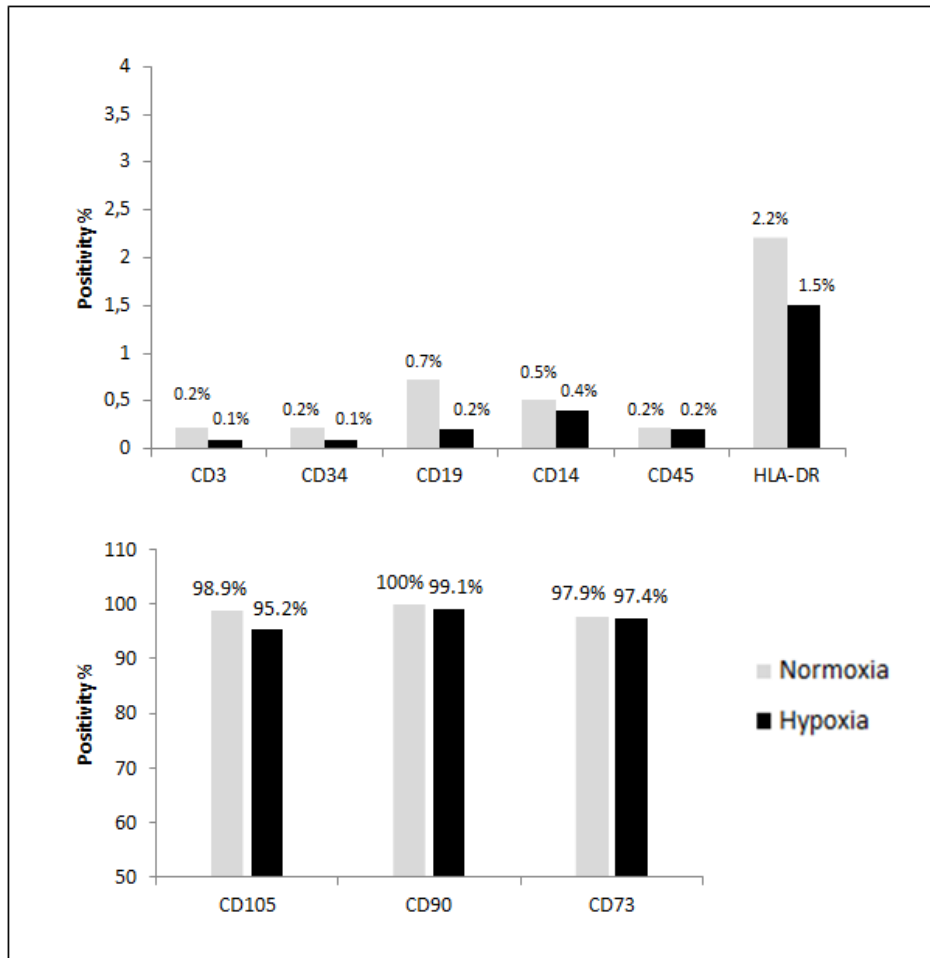


Figure 3: Percentage of expression of immunophenotypic markers in MSC cultured in normoxia and hypoxia.

### *Differentiation*

All cells stimulated with STEMPRO® differentiation kit exhibited characteristics consistent with adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineage separately. Microscopically, there was no difference in the ability to differentiate between second-passage MSC grown in hypoxia and normoxia (figure 4).

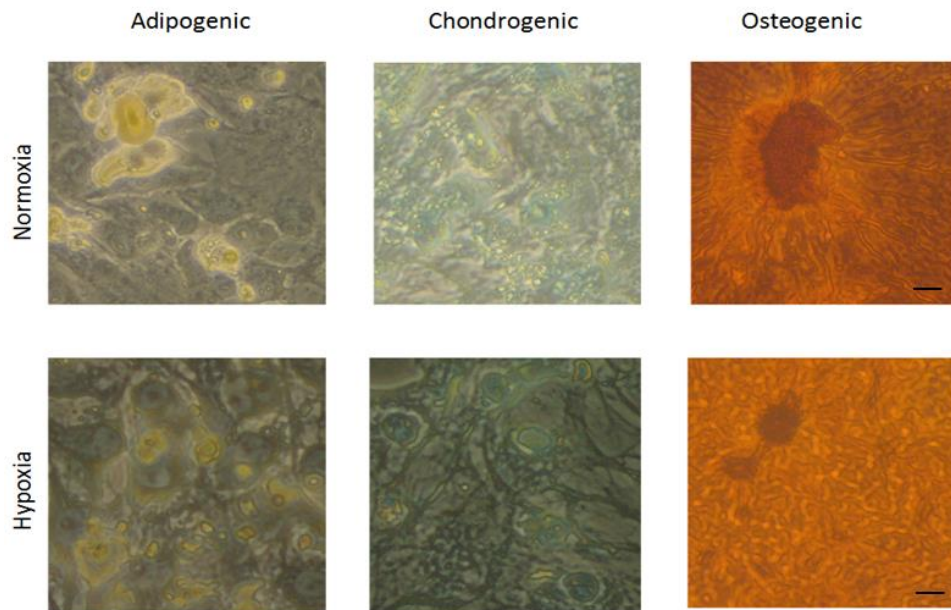


Figure 4: Comparison of differentiation potential of MSC at P2, under normoxia and hypoxia. (Scale bar: 100 $\mu$ m).

#### *Size and complexity*

Although not statistically significant, 73 % (11) of cells exposed to low oxygen tensions showed smaller cell size and 67% (10) ( $p < 0.84$ ) had greater internal complexity ( $p < 0.85$ ) in relation to their control in normoxia. This trend remained for all  $O_2$  concentrations used (figure 5).

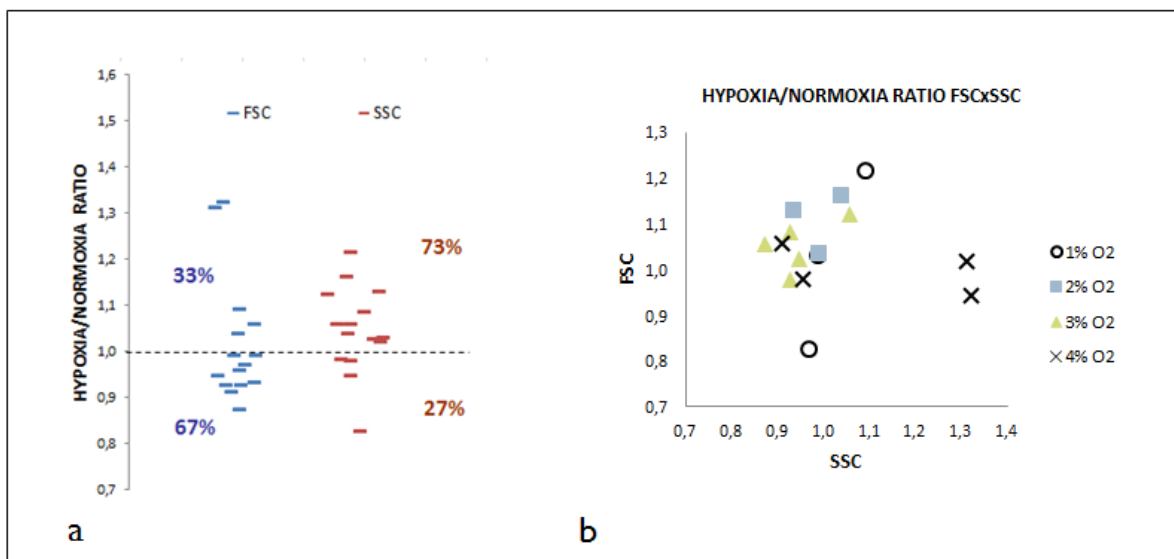


Figure 5: a) Hypoxia/normoxia ratio for forward-scatter (FSC) and side-scatter (SSC). b) Normoxia/hypoxia ratio for forward-scatter (FSC) and side-scatter (SSC) in different O<sub>2</sub> percentage groups (1-4%).

*ROS quantification, mitochondrial activity and autophagy*

Second-passage MSC grown in both conditions showed similar quantifications of ROS (p< 0.39). On the other hand, 80% (12) of MSC cultured in hypoxia had lower mitochondrial activity compared to their control in normoxia (p< 0.03). In analysis of autophagy, 73% (11) of cases of cells cultured at 21 % O<sub>2</sub> showed greater or equal autophagy quantification in relation to their matched sample in hypoxia (p< 0.05) (figure 6).

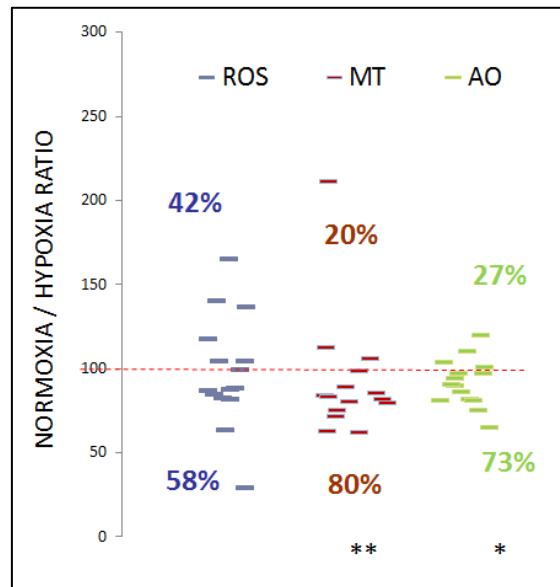


Figure 6: Hypoxia/normoxia ratio for: reactive oxygen species (ROS); mitochondrial activity (MT); and autophagy with acridine orange (AO).

The different percentages of oxygen used in hypoxia cultures (1-4 %) didn't seem to exert any difference regarding the parameters evaluated (table 2).

Table 2: Results of population doubling (PD), forward-scatter (FSC), side-scatter (SSC), reactive oxygen species (ROS), mitochondrial activity (MT), and autophagy (AO) at varying levels of O<sub>2</sub> in hypoxia (1-4 %) in comparison to their control in normoxia (21 % O<sub>2</sub>).



	O <sub>2</sub> (%)	PD	FSC	SSC	MT	ROS	AO
MSC01	1	↓	↓	↓	↓	↓	↑
MSC02	1	↑	↑	↑	↓	↑	↓
MSC03	1	↓	=	↑	↑	↑	↓
MSC04	2	↓	↓	↑	↑	↓	↑
MSC05	2	↓	↑	↑	↓	=	=
MSC06	2	↓	=	↑	↓	↓	↓
MSC07	3	↓	↓	↑	↓	↑	↓
MSC08	3	↓	↓	↑	=	↓	↓
MSC09	3	=	↓	↑	↑	↓	=
MSC10	3	↓	↓	↓	↓	↑	↓
MSC11	3	↓	↑	↑	↓	↓	↑
MSC12	4	↓	↓	↓	↓	↑	↓
MSC13	4	↓	↓	↑	↓	↓	=
MSC14	4	↓	↑	↓	↓	↑	↓
MSC15	4	↓	↑	↑	↓	↓	↓

## Discussion

We found that cells under prolonged hypoxia showed no difference between their controls in normoxia regarding viability, immunophenotyping, differentiation and ROS levels. However, cells subjected to low oxygen concentrations (4% to 1% oxygen concentration) had lower proliferation ( $p < 0.002$ ), smaller size, greater cellular complexity, lower mitochondrial activity ( $p < 0.03$ ), and decreased autophagy ( $p < 0.05$ ).

The greatest proliferation found in MSC cultivated in normoxia counteract results observed by some researchers as Fehrer et al, wherein BM-derived MSC cultivated at a O<sub>2</sub> tension of 1 % showed significantly increased proliferation, with a population doubling significantly higher compared to cells grown in normoxia (10, 12-15, 25). On the other hand, our data corroborate a study by Holzwarth et al., that by analyzing MSC proliferation in conditions of 21 %, 5 %, 3 %, and 1 % oxygen, concluded that hypoxia reduces proliferation of MSC in incubation period of 7 days (15). Likewise, Kumar et al. had significant inhibition of proliferation at 1 % oxygen, confirmed by enhanced expression of protein p27, known to mediate cell cycle arrest by blocking transition from G1 to S phase (26). The reason for this contradiction could be linked to heterogeneity of culture conditions such as supplementation

and duration of exposure to hypoxia, as well as intra-donor variability. Furthermore, it is known that donor's age directly affects proliferative capacity, which could contribute to the variability of results (27).

Expectedly, all cells expressed homogeneous immunophenotypic characteristics consistent with those of mesenchymal progenitor lineage, indistinguishably across groups. These results agree with data already well established in the literature, indicating that the cell retains its standard immunophenotypic profile in both culture conditions (11, 19, 28).

There's little data in the literature comparing size and internal complexity of MSC cultivated in hypoxia and normoxia. Kim et al (29) reported a decrease in cell size in cells cultured at 1% O<sub>2</sub>, a result also found in our study. However, data on internal complexity were not found. Still, some authors suggest that morphology relates to "quality" of MSC, reporting that smaller cells have greater capacity for renewal and differentiation (30). In microscopic analysis we observed no difference in adipogenic, chondrogenic, and osteogenic differentiation, i.e., cells cultured in 21 % O<sub>2</sub> or in O<sub>2</sub> deprivation conditions, in our hands, preserved their ability to differentiate. It is important to point out that among the main characteristics analyzed in cells submitted to oxygen tensions similar to their natural niche, differentiation capacity seems to be the most controversial. Several authors suggest that cells in hypoxia show increased plasticity (20, 31, 32). On the other hand, studies that found lower capacity to differentiate or even no influence of cultivation conditions on this characteristic are also abundant (13, 33-35).

As metabolic characteristics, it is known that ROS are key intermediates in oxidative metabolism, and when they are generated in excess promotes oxidative stress. This excess is generated by a variety of cellular stresses, including oxygen supply changes. It is discussed what ideal O<sub>2</sub> tension would be to be used for in vitro expansion to avoid stress - a condition of ambient O<sub>2</sub>, considered hyperoxide, or O<sub>2</sub> deprivation like the one experienced in their natural niches. Unfortunately, there are few studies quantifying ROS levels in cells under these conditions. Hsu et al. (16) found a reduction of ROS levels in hypoxia, and in agreement with

these results Estrada et al. suggest that cell culture conditions with unphysiological concentrations of oxygen (21 % O<sub>2</sub>) increase generation of ROS (36).

Mitochondrial activity is closely linked to generation of ROS through oxidative phosphorylation. In a study (17) evaluating effects of hypoxia on mitochondrial activity of BM-derived MSC, it was observed a significant decrease in expression of respiratory complex enzymes, indicating lower mitochondrial activity in hypoxia, which corroborates ours and other authors' findings (10, 12, 37).

Several mechanisms of defense have been developed to protect cells against oxidative stress, including increased antioxidant activity, removal of specific proteins for ubiquitin-proteasome system, and removing damaged proteins and organelles by autophagy (38, 39). This mechanism could explain the result found in our study, where MSC cultured in normoxia and hypoxia presented similar levels of ROS. However, there was greater autophagic activity in cells at 21 % O<sub>2</sub> which could indicate recruitment of this defense mechanism in most stress situation, such as excessive supply of oxygen, demonstrating their competence in maintaining an appropriate balance between ROS production and degradation by preventing damage caused by oxidative stress.

Supporting this theory, studies indicate that ROS levels increase when cell receives treatment for preventing autophagic process, such as chloroquine (40). Thus, some studies have provided strong evidence for the importance of autophagy in controlling ROS, protecting cells from injury (41). We could speculate that the excess of ROS already described in normoxia was being controlled by increasing autophagy, while in hypoxia, with lower production of ROS, the autophagic process is less recruited. Although some studies report autophagy induction in MSC subjected to low oxygen tensions, these results are controversial because only the acute effect (2-72 h) of decreased oxygen intake in MSC was evaluated (42-45).

## **Conclusion**

Maintenance of MSC physiological properties after in vitro expansion is an important requirement in therapeutic application of these cells. During cultivation, a metabolic adaptation appears to occur when they are exposed to a non-physiological culture environment including, among other things, changes in cell-cell contact, lack of heterotypic interactions, mitogenic persistent activation, oxygen tension and adherence to the plastic surface, experiencing conditions that differ greatly from their natural niches. In this process of adaptation, cells must reconfigure their metabolic network, which in turn can influence morphological factors such as size and internal complexity and proliferation, mitochondrial activity and autophagy, along with control of oxidative stress.

Either way, oxygen tension appears to be a key regulator in this cell adaptation, and metabolic effects underlying this variable remain to be fully understood. Heterogeneity, or even lack of consistent results on the impact of oxygen concentration used for the expansion of MSC, underlines the need for further studies in order to optimize cultivation and expansion conditions to achieve greater safety and therapeutic efficacy.

## **Acknowledgements**

The study received financial support from the Research and Event Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

## References

1. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976;4(5):267-74.
2. Ying Wang XC, Wei Cao & Yufang Shi. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology.* 2014;15:1009–16.
3. Bernardo ME, Fibbe WE. Safety and efficacy of mesenchymal stromal cell therapy in autoimmune disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1266:107-17.
4. Bernardo ME, Pagliara D, Locatelli F. Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine? *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(2):164-71.
5. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy.* 2004;6(1):7-14.
6. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 1999;72(4):570-85.
7. Faustini M, Bucco M, Chlapanidas T, Lucconi G, Marazzi M, Tosca MC, et al. Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(6):1515-21.
8. Antoniou ES, Sund S, Homsy EN, Challenger LF, Rameshwar P. A theoretical simulation of hematopoietic stem cells during oxygen fluctuations: prediction of bone marrow responses during hemorrhagic shock. *Shock.* 2004;22(5):415-22.
9. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J.* 2001;81(2):675-84.
10. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol.* 2011;12:12.
11. Dionigi B, Ahmed A, Pennington EC, Zurakowski D, Fauza DO. A comparative analysis of human mesenchymal stem cell response to hypoxia in vitro: Implications to translational strategies. *J Pediatr Surg.* 2014;49(6):915-8.
12. Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol.* 2010;223(1):27-35.
13. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 2007;6(6):745-57.
14. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(3):948-53.

15. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.* 2010;11:11.
16. Hsu SH, Chen CT, Wei YH. Inhibitory effects of hypoxia on metabolic switch and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2013;31(12):2779-88.
17. Hung SC, Pochampally RR, Hsu SC, Sanchez C, Chen SC, Spees J, et al. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS One.* 2007;2(5):e416.
18. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 2001;15(7):1312-4.
19. Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal.* 2010;8:18.
20. Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, et al. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(1):12-21.
21. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda).* 2009;24:97-106.
22. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(9):4304-8.
23. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* 2002;16(10):1151-62.
24. Biosciences B. FACService TECHNOTES, Customer Focused Solutions. 2004. Available: [https://www.bdbiosciences.com/documents/BD\\_Research\\_Sorting\\_TechBulletin.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Research_Sorting_TechBulletin.pdf). Accessed May 2016.
25. Hung SP, Ho JH, Shih YR, Lo T, Lee OK. Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2011.
26. Kumar S, Vaidya M. Hypoxia inhibits mesenchymal stem cell proliferation through HIF1 $\alpha$ -dependent regulation of P27. *Mol Cell Biochem.* 2016;415(1-2):29-38.
27. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med.* 2014;12:8.
28. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(8):2173-82.
29. Kim DS, Ko YJ, Lee MW, Park HJ, Park YJ, Kim DI, et al. Effect of low oxygen tension on the biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Stress Chaperones.* 2016.
30. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells.* 2002;20(6):530-41.

31. Valorani MG, Montelatici E, Germani A, Biddle A, D'Alessandro D, Strollo R, et al. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *Cell Prolif.* 2012;45(3):225-38.
32. Fink T, Abildtrup L, Fogd K, Abdallah BM, Kassem M, Ebbesen P, et al. Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *Stem Cells.* 2004;22(7):1346-55.
33. Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone.* 2007;40(4):1078-87.
34. Mylotte LA, Duffy AM, Murphy M, O'Brien T, Samali A, Barry F, et al. Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells.* 2008;26(5):1325-36.
35. Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, Villarón E, Barbado V, Tabera S, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol.* 2008;36(8):1014-21.
36. Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ.* 2012;19(5):743-55.
37. Buravkova LB, Rylova YV, Andreeva ER, Kulikov AV, Pogodina MV, Zhivotovsky B, et al. Low ATP level is sufficient to maintain the uncommitted state of multipotent mesenchymal stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(10):4418-25.
38. Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(1-2):152-62.
39. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010;40(2):280-93.
40. Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(3):709-18.
41. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(5):H2023-31.
42. Liu J, Hao H, Huang H, Tong C, Ti D, Dong L, et al. Hypoxia regulates the therapeutic potential of mesenchymal stem cells through enhanced autophagy. *Int J Low Extrem Wounds.* 2015;14(1):63-72.
43. Wang XM, Yang YJ, Wu YJ, Zhang Q, Qian HY. Attenuating Hypoxia-Induced Apoptosis and Autophagy of Mesenchymal Stem Cells: the Potential of Sitagliptin in Stem Cell-Based Therapy. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(5):1914-26.
44. Lee Y, Jung J, Cho KJ, Lee SK, Park JW, Oh IH, et al. Increased SCF/c-kit by hypoxia promotes autophagy of human placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells via regulating the phosphorylation of mTOR. *J Cell Biochem.* 2013;114(1):79-88.
45. Wu J, Niu J, Li X, Li Y, Wang X, Lin J, et al. Hypoxia induces autophagy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via activation of ERK1/2. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(5):1467-74.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A manutenção das propriedades inatas das CTM após expansão *in vitro* é um requisito importante na aplicação terapêutica destas células. Durante o cultivo parece ocorrer uma adaptação metabólica quando estas são expostas a um ambiente de cultura não fisiológico incluindo, entre outros fatores, alterações de contato célula-célula, falta de interações heterotípicas, ativação persistente mitogênica, tensão de oxigênio e a adesão à superfície plástica, experimentando condições que diferem muito de seus nichos naturais. Neste processo de adaptação as células devem reconfigurar sua rede metabólica, que por sua vez pode influenciar fatores morfológicos como tamanho e complexidade interno, bem como proliferação, atividade mitocondrial e autofagia aliada ao controle de estresse oxidativo.

A ideia de possível manipulação da funcionalidade das CTMs através do cultivo em diferentes tensões de oxigênio causou particular interesse pela hipótese de obtenção de células mais eficazes nas diferentes aplicações clínicas propostas. No entanto sobrepõe-se a esta possibilidade de aprimoramento das condições de cultivo, a necessidade de se assegurar que as CTMs cultivadas em ambas as situações de normóxia e hipóxia, são capazes de se adaptar metabolicamente e preservar seus aspectos morfológicos, imunofenotípicos e funcionais inatos.

De qualquer maneira, a tensão de oxigênio parece ser um regulador chave nesta adaptação celular e efeitos metabólicos subjacentes a esta variável continuam a ser descritos. A heterogeneidade ou até mesmo escassez de resultados acerca do impacto da concentração de oxigênio utilizada na expansão de CTM sublinha a necessidade de novos estudos a fim de aprimorar as condições de cultivo e expansão e obter maior segurança e eficácia terapêutica.



## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

O recente interesse na potencial aplicação terapêutica de CTMs acompanhados da disponibilidade de novas tecnologias para o cultivo e expansão destas células foi seguido pela realização de diversos estudos avaliando diferentes variações nas condições de cultivo das CTMs como, por exemplo, os efeitos das baixas tensões de O<sub>2</sub> no comportamento e função das CTMs. Contudo, as condições ideais para a cultura de CTMs ainda não foram claramente definidos, e é extremamente importante para determinação precisa de que forma as células cultivadas em condições de hipóxia são afetadas com relação a sua morfologia, metabolismo e função.

No contexto de otimização destas condições de cultivo se faz necessário, sobretudo o estudo acerca do efeito da exposição prolongada a baixas tensões de O<sub>2</sub> já que são mais expressivos os estudos que mensuram o efeito agudo, onde as CTM são cultivadas em normóxia e submetidas à hipóxia por apenas algumas horas. Desta forma outros estudos são necessários para que um consenso possa ser alcançado, especialmente devido ao grande interesse em padronizar o cultivo de CTM para utilização em terapia celular e medicina regenerativa, uma ferramenta promissora para o tratamento de diferentes condições que atualmente não possuem opções terapêuticas ótimas.

## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA DOADOR DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

Prezado Paciente ou responsável,

Você está sendo convidado para participar do estudo “Caracterização da célula-tronco mesenquimal expandida *in vitro* em condições de hipóxia e normóxia” realizado pelo Centro de Terapia Celular (CTC-RS) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Você está sendo convidado a participar deste estudo porque você já é um doador voluntário de medula óssea que irá realizar o procedimento nesta Instituição.

Nosso estudo busca caracterizar e padronizar as melhores condições de cultivo destas células-tronco para melhor segurança e eficácia clínica no tratamento de diversas doenças para quais as células-tronco mesenquimais estão sendo testadas.

Gostaríamos de obter a sua permissão para utilizarmos as células de sua medula que restarem na bolsa utilizada para o transplante já que, ocasionalmente, conseguimos obter destas células residuais uma quantidade suficiente para o tratamento de outro paciente. Isto não acarretará em nenhum procedimento extra para você, já que utilizaremos um material que seria usualmente descartado pelo hospital.

As células-tronco mesenquimais precisam ser isoladas da amostra de medula óssea do doador, e passam por um período de cultivo em laboratório de aproximadamente 20 a 30 dias, onde necessitam crescer e se proliferar para que após sejam testadas. Muitas vezes, infelizmente, essas células coletadas do doador não conseguem crescer nos meios de cultivo e, portanto não podem ser utilizadas. O sucesso do cultivo dessas células só pode ser garantido se ocorrer a sua multiplicação no laboratório. Após a realização dos testes necessários para este estudo, solicitamos autorização para descartá-las, conforme as normas de segurança existentes.

Além disso, estamos solicitando sua autorização para acessar seus registros de prontuário, para avaliarmos seus dados clínicos e resultados de exames.

A participação neste estudo é totalmente voluntária e você não terá benefício com essa doação, contudo, poderá contribuir para o uso futuro destas células. Você não receberá nenhum tipo de pagamento, bem como, não terá nenhum custo com este procedimento. Seu nome não será divulgado nas publicações relacionadas a este estudo e todos os seus dados serão tratados de forma confidencial.

A equipe do transplante de medula óssea permanecem ao inteiro dispor para esclarecer eventuais dúvidas a respeito da doação e dos procedimentos. É importante ressaltar que você receberá o mesmo tratamento dispensado a todos os doadores de medula óssea, tendo ou não concordado com esta doação de células residuais na bolsa para pesquisa.

Se você tiver alguma dúvida poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável pelo projeto Dr<sup>a</sup> Lucia Mariano da Rocha Silla (Serviço de Hematologia Clínica do HCPA – 51 33598317) em horário comercial. Se você tiver alguma dúvida quanto ao conteúdo ético desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, localizado no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone 51 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

Este documento possui duas vias, uma via será entregue a você e a outra ficará em posse do pesquisador.

Se após a leitura deste termo você concordar em participar deste estudo, preencha as informações abaixo e assine após.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Número do prontuário do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Nome do responsável (se aplicável): \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável (se aplicável): \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.