

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Victor Juan de Souza Lima

**ESTUDO DA BIOLOGIA DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO CANINO**

Florianópolis

2022

Victor Juan de Souza Lima

**ESTUDO DA BIOLOGIA DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO CANINO**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências
Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina como requisito
para a obtenção do título de Licenciado em Ciências
Biológicas
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Gonçalves Trentin.
Coorientadora: Dr^a. Bianca Luise Teixeira.

Florianópolis

2022

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

Souza Lima, Victor Juan de Souza Lima ESTUDO DA BIOLOGIA DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO CANINO / Victor Juan de Souza Lima Souza Lima ; orientadora, Andréa Gonçalves Trentin Trentin, coorientadora, Bianca Luise Teixeira Teixeira, 2022.

47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Células Estromais Mesenquimais. 3. Tecido adiposo. 4. Medicina veterinária. 5. Cães. I. Trentin, Andréa Gonçalves Trentin. II. Teixeira, Bianca Luise Teixeira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Victor Juan de Souza Lima

**ESTUDO DA BIOLOGIA DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO CANINO**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado e aprovado em sua forma final para
obtenção do Título de Licenciado em Ciências Biológicas

Florianópolis, 10 de março de 2022.

Prof^ª. Dr^ª. Daniela Cristina de Toni
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

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

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – UFSC

Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni
Avaliador(a)

Laboratório de Plasticidade e Diferenciação de Células da Crista Neural – Universidade
Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Norma Machado da Silva
Avaliador(a)

Laboratório de Genética Evolutiva – Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais que me fornecem todo o suporte necessário para a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo imensamente à minha orientadora, Prof. Dra. Andréa Trentin, que me recebeu de portas abertas no LACERT, aceitou o desafio de me orientar e me auxiliou de todas as maneiras possíveis para que este trabalho fosse realizado. A minha graduação sem dúvidas foi inesquecível por conta dos momentos e experiências que pude compartilhar com o pessoal do LACERT, e você tem papel fundamental nisso. Obrigado pelos conselhos, ensinamentos e discussões, lhe admiro muito e tenho orgulho de ser orientado por uma cientista incrível como você!

Agradeço à minha coorientadora Dra. Bianca Teixeira que foi o meu primeiro contato com o laboratório e com o mundo da biologia celular. Me ensinou praticamente tudo que sei sobre cultura de células e afins. Saiba que, mesmo seguindo caminhos diferentes, você foi fundamental durante todo o processo de execução deste trabalho. Sou extremamente grato pelo o que me ensinaste e pela sua companhia durante as muitíssimas horas que passamos dentro da sala de cultura, vou te levar sempre com carinho no coração pois em muitos momentos difíceis, da minha vida acadêmica e pessoal, as nossas conversas e a sua companhia de trabalho foram extremamente confortantes. Muito obrigado!

À Prof. Dra. Débora Olsson que também esteve bastante presente em boa parte da elaboração deste trabalho. Agradeço por ampliar meus horizontes e me apresentar um outro mundo, interdisciplinar e cheio de possibilidades incríveis. Sem a sua colaboração este trabalho nunca poderia ter sequer começado.

Agradeço a todos que passaram pelo projeto de extensão com as células caninas, em especial à Karynne de Brito por ter me auxiliado na culturas de células e colaborado na elaboração de diversos trabalhos; e ao Gustavo Goulart, ex-Aluno de Iniciação Científica do LACERT, obrigado pelo tempo em que fomos parceiros de bancada e por toda a ajuda ao longo deste período da graduação.

Agradeço aos veterinários, veterinárias e tutores da cachorrinha que teve seu tecido adiposo doado e disponibilizado para fins acadêmicos.

Agradeço à clínica veterinária parceira de Florianópolis que disponibilizou o acesso ao tecido adiposo coletado.

À Prof. Dra. Talita Jeremias, não só por participar como suplente da banca de defesa, mas por ter me auxiliado a trabalhar com as células e por seus conselhos sempre pertinentes e esclarecedores, instigando o meu lado crítico e científico.

Ao Prof. Dr. Ricardo Garcez que, mesmo não contribuindo diretamente para a elaboração deste trabalho, sempre foi muito solícito quando precisei de ajuda, além de dar diversas sugestões e críticas construtivas nos seminários do LACERT, que contribuíram para a idealização deste trabalho.

À já quase Doutora Priscilla Delben que me ajudou em diversas etapas deste trabalho, além de me ensinar muito sobre senescência celular e envelhecimento. Conversar contigo sempre foi muito divertido e seus conselhos científicos e pessoais vou levar pra sempre. Pri, você tem um coração enorme e saiba que guardo uma gratidão enorme por você.

Às minhas amigas e ex-colegas de LACERT Laís Andrade e Denise Nascimento por terem me acompanhado diversas vezes no início da execução do meu trabalho, além de terem me ensinado muitas coisas fundamentais da vida em laboratório. Vocês duas são cientistas brilhantes!

Agradeço ao apoio técnico disponibilizado pelo Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB – UFSC) e por todos os seus profissionais, que são extremamente competentes e solícitos.

Aos membros da banca de defesa deste TCC, Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni, Prof. Dra. Norma Machado da Silva e à Prof. Dra. Talita da Silva Jeremias, por terem aceitado o meu convite e por disponibilizarem tempo e conhecimento, contribuindo com a minha formação acadêmica.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) que foi a minha segunda casa durante grande parte da minha graduação, além de me fornecer apoio financeiro, pedagógico e estrutural.

Agradeço ao CNPq por ter contribuído financeiramente através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Tecnológica, para que eu pudesse realizar este trabalho da melhor maneira possível.

Também agradeço a todos os amigos e alunos LACERTianos que fazem ou já fizeram parte deste laboratório, e que tive a oportunidade de conhecer. Vocês fazem este laboratório ser (como diria o cara mais animado de todos: Felipe Benevenuto) incrível! Obrigado, Adriane, Alessandra, Augusto, Camila (a Acordi e a dos Santos), Carmem, Daniel, Daniely, Êndel, Felipe, Gustavo, Isadora, Jaqueline, Karynne, Maiara, Nathali, Peterson, Polliana, Priscilla Thais. Gostaria de agradecer especialmente ao Leonardo e à Monique que me ajudaram na reta final dos experimentos e tornaram esse momento menos apreensivo. Muito obrigado!

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família, por ter me fornecido todo o ambiente e estrutura para que eu pudesse crescer com valores extremamente valiosos. Obrigado por serem meu fundamento e refúgio. Em especial gostaria de agradecer à minha avó Maria do Carmo (vulgo dona Carminha) por ter me auxiliado muito na reta final da minha graduação e por ter me recebido no momento que mais precisei. Agradeço infinitamente aos meus pais, Robson e Regiane, por terem me dado todo o suporte, emocional, psicológico e financeiro para que eu pudesse me manter em Florianópolis em busca dos meus sonhos, prometo que num futuro próximo eu farei o mesmo por vocês. Vocês dois foram imprescindíveis para eu chegar até aqui. Amo vocês!

“What happens to other species also happens to us.”

Bill Nye

RESUMO

As Células Estromais Mesenquimais (CEM) são células multipotentes e com potencial de autorrenovação com grande possibilidade de aplicação clínica veterinária. Estas células podem atuar regenerando diversos tecidos através da sua atividade parácrina e imunomoduladora. Neste sentido, o tecido adiposo canino constitui uma fonte importante de CEM pois pode ser facilmente coletado. As células obtidas possuem características de CEM sendo mais proliferativas quando comparadas às de outras fontes caninas. Porém, para uma melhor compreensão do seu potencial terapêutico é necessário compreender mais profundamente o comportamento destas células em cultivo e o estabelecimento de protocolos de isolamento, cultivo e expansão mais eficientes. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi realizar a coleta, isolamento, cultivo, caracterização e análise da cinética, migração e danos genéticos de CEM derivadas de tecido adiposo canino (CEM-TAC) de um doador fêmea de oito meses de idade ao longo de três passagens celulares. O isolamento das CEM-TAC foi realizado por dissociação mecânica e enzimática do tecido adiposo abdominal proveniente de excedentes de cirurgia de castração. Após obtidas, as CEM-TAC foram mantidas sob condições de cultivo padrão e expandidas *in vitro* até a passagem 3 (P3). Amostras de células foram criopreservadas nas passagens 1 (P1) e 2 (P2). As CEM-TAC apresentaram, por microscopia de contraste de fase, a morfologia alongada e fusiforme característica das CEM *in vitro*, assim como a capacidade de adesão ao plástico. Em P3 começaram a apresentar aumento de tamanho e morfologia irregular, característico de células senescentes. Análises de citometria de fluxo para identificação de marcadores de superfície celular revelaram, de modo semelhante em P1 e P3, positividade para os marcadores mesenquimais e negatividade para os hematopoiéticos. O potencial migratório, avaliado pelo ensaio de fechamento de lesão *in vitro* das CEM-TAC demonstrou redução em P3 comparado às duas primeiras passagens. Foi observado ainda pela análise das curvas de crescimento e cálculo do Tempo de Duplicação Celular (CDT), redução da capacidade proliferativa das CEM-TAC com o aumento das passagens, acompanhado de aumento na frequência de células positivas para γ -H2AX, coerente com início do processo de senescência celular. Os resultados obtidos sugerem que as CEM-TAC sofrem com a redução da proliferação celular, alteração de morfologia e aumento da incidência de danos genéticos devido à expansão *in vitro* já em P3, porém suas características de célula-tronco mantem-se preservadas nas duas passagens mais iniciais.

Palavras-chave: Células-tronco. Medicina veterinária. Cultura de células. Cinética celular. Caracterização *in vitro*.

ABSTRACT

Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) are multipotent and have a self-renewal potential, with great possibility for application in the veterinary clinics. These cells can act by promoting tissue repair through their paracrine and immunomodulatory activities. Canine adipose tissue is an important source of MSCs that can be easily collected. Cells obtained from canine adipose tissue are more proliferative than MSCs from other canine sources. However, for a better understanding of their therapeutic potential in dogs, it is necessary to understand more deeply their behavior in culture and to establish efficient protocols for isolation, cultivation, and expansion. Thus, this study aimed to isolate, to cultivate, to characterize and to evaluate the kinetics, migration, and genetic damage of MSCs derived from canine adipose tissue (MSC-CAT) of an eight-month-old female donor over three cellular passages. Isolation was performed through the mechanical and enzymatic dissociation of adipose tissue and the MSC-CATs were maintained and expanded under standard culture conditions until passage 3 (P3). Cell samples were cryopreserved in passages 1 (P1) and 2 (P2). The MSC-CATs showed by phase contrast microscopy, the elongated and fusiform morphology characteristic of the MSCs, as well as the plastic adhesion ability. However, in P3 cells began to show the irregular and enlarged senescent morphology. Flow cytometry analyses revealed positivity for the mesenchymal markers and negativity for the hematopoietic ones similarly in P1 and P3. *Scratch assay* showed reduction in the migratory potential of MSC-CATs in P3 compared to P1 and P2. Reduction in the proliferative capacity with passages was also observed by growth curves analysis and calculation of Cell Doubling Time (CDT), accompanied by increased frequency of cells positives for γ -H2AX, consistent with the senescent process. Taken together, results suggest that MSC-CAT display reduced cell proliferation, morphological alterations, and increased incidence of genetic damage due to *in vitro* expansion already in P3, but their stem cell characteristics remain preserved in the two most initial passages.

Keywords: Stem cells. Veterinary medicine. Cell culture. Cell kinetics. *In vitro* characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografias representativas em microscopia de contraste de fase revelando a morfologia alongada e fusiforme das CEM-TAC em P1, P2 e P3	26
Figura 2. Expressão de marcadores de superfície mesenquimais CD90 e CD105 por citometria de fluxo	27
Figura 3. Expressão de marcadores de superfície hematopoiéticos CD34 e CD45 por citometria de fluxo	28
Figura 4. Quantificação do número de CEM-TAC em P1 a P3	29
Figura 5. Tempo de Duplicação (CDT) das CEM-TAC em P1 a P3	30
Figura 6. Micrografias representativas de contraste de fase da área da lesão	31
Figura 7. Análise quantitativa do fechamento de ferida	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características do Doador Canino (CA08F).....	20
Quadro 2 – Características dos anticorpos utilizados para a citometria de fluxo.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CDT *Cell Doubling Time* (Tempo de Duplicação Celular)
- CEM Células Estromais Mesenquimais
- CEM-TA Células Estromais Mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo
- CEM-TAC Células Estromais Mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo Canino
- CFMV Conselho Federal de Medicina Veterinária
- CTs Células-tronco
- DAPI 4',6'-diamino-2-fenil-indol
- DDR *DNA Damage Response* (resposta ao dano de DNA)
- DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO Dimetilsulfóxido
- ISCT *International Society for Cellular Therapy* (Sociedade Internacional para Terapia Celular)
- LACERT Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual
- OA Osteoartrite
- PBS *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)
- PS Penicilina-Estreptomicina
- SFB Soro Fetal Bovino
- SRD Sem Raça Definida
- UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	CÉLULAS-TRONCO	15
1.2	CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS	15
1.3	CEM NA MEDICINA VETERINÁRIA	16
1.4	PARÂMETROS RELACIONADOS AO POTENCIAL CLÍNICO DE CEM	17
1.5	JUSTIFICATIVA	18
2	OBJETIVOS	19
2.1.1	Objetivo Geral.....	19
2.1.2	Objetivos Específicos	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	OBTENÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO CANINO	19
3.1.1	Características do doador	20
3.2	ISOLAMENTO DAS CEM-TAC	20
3.2.1	Dissociação mecânica.....	21
3.2.2	Dissociação enzimática	21
3.3	CULTIVO E EXPANSÃO CELULAR DAS CEM-TAC.....	21
3.3.1	Subcultivo das CEM-TAC	22
3.3.2	Criopreservação das CEM-TAC	22
3.4	CARACTERIZAÇÃO DE CEM-TAC.....	22
3.4.1	Morfologia celular	23
3.4.2	Citometria de fluxo	23
3.5	CINÉTICA CELULAR DE CEM-TAC.....	24
3.5.1	Curva de crescimento celular de CEM-TAC	24
3.5.2	Cálculo do tempo de duplicação das CEM-TAC	24
3.5.3	Ensaio de fechamento de ferida <i>in vitro</i> (Cell Scratch Assay)	24

3.6	ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA DO MARCADOR GAMA-H2AX.....	25
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4	RESULTADOS	26
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS CEM-TAC.....	26
4.1.1	Avaliação da morfologia das CEM-TAC.....	26
4.1.2	Análise da expressão de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos por citometria de fluxo	27
4.1.2.1	<i>Análise dos marcadores mesenquimais</i>	27
4.1.2.2	<i>Análise dos marcadores hematopoiéticos</i>	28
4.2	CINÉTICA CELULAR DAS CEM-TAC	28
4.2.1	Avaliação da curva de crescimento celular	29
4.2.2	Tempo de duplicação celular	29
4.2.3	Análise do potencial de fechamento de ferida <i>in vitro</i> (Scratch Assay)	30
4.3	AVALIAÇÃO DO MARCADOR DE DANO GENÉTICO GAMA-H2AX	32
5	DISCUSSÃO	34
5.1	OBTENÇÃO, cultivo e criopreservação DE CEM DO TECIDO ADIPOSEO CANINO (CEM-TAC).....	34
5.2	CARACTERIZAÇÃO DE CEM-TAC.....	35
5.3	O POTENCIAL PROLIFERATIVO DE CEM-TAC É REDUZIDO COM O AUMENTO DE PASSAGENS.....	36
5.4	MIGRAÇÃO CELULAR E ENSAIO DE FECHAMENTO DE FERIDA.....	38
5.5	AUMENTO DOS DANOS GENÉTICOS DAS CEM-TAC COM AS PASSAGENS	38
6	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO A – RESOLUÇÃO Nº 1363 (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA)	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULAS-TRONCO

O termo “célula-tronco” (CT) é utilizado para definir células com capacidade de autorrenovação e de diferenciação em fenótipos celulares especializados. As CT são classificadas conforme a sua origem (embrionária ou adulta) e potencialidade (totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou oligopotentes) (Sobhani *et al.*, 2017).

As CT adultas, assim como as células-tronco de pluripotência induzida, são amplamente pesquisadas com o intuito de aplicação na medicina regenerativa, mais especificamente na terapia celular, devido ao seu potencial terapêutico e a sua vantagem em comparação às CT embrionárias que, por sua vez, estão envolvidas em debates éticos e são mais instáveis para aplicação clínica, por conta da alta imunogenicidade e propensão para a formação de teratomas (Bifari *et al.*, 2010; Barad *et al.*, 2014). Apesar disso, ainda há um longo e árduo caminho para a aplicação das CT na rotina clínica, sendo necessário ainda estudos *in vitro* e pré-clínicos mais robustos verificando a eficácia e segurança da aplicação destas células na medicina regenerativa.

1.2 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Dentre as CT adultas, as células-tronco mesenquimais, atualmente também definidas como Células Estromais Mesenquimais (CEM) (Sidney *et al.*, 2014), se destacam nas pesquisas visando a aplicação clínica. As CEM possuem um potencial terapêutico que pode contribuir para o tratamento de doenças degenerativas e/ou inflamatórias devido a quatro principais fatores: (1) podem se diferenciar em fenótipos mesenquimais, como osteoblastos e condroblastos, recompondo tecidos lesionados; (2) realizam o chamado *homing* migrando através de quimiotaxia para sítios de lesão; (3) possuem potencial imunomodulador, capaz de atenuar a resposta inflamatória e (4) secretam fatores tróficos com potencial de induzir o reparo tecidual (Katsuda *et al.*, 2013). Apesar das expectativas por trás do grande potencial terapêutico das CEM, verificou-se que, para a aplicação correta e segura destas células na prática clínica, é necessário uma série de estudos verificando diversas particularidades ainda não desvendadas (Gao *et al.*, 2016). De qualquer maneira, os estudos clínicos e pré-clínicos atualmente são, em

grande parte, focados no tratamento de doenças ósseas e/ou cartilaginosas, como a osteoartrite e em doenças imunológicas, como a doença do enxerto *vs* hospedeiro (Brown *et al.*, 2019).

Devido ao grande aumento no número de pesquisas utilizando CEM, e a falta de protocolos de caracterização adequados para estas células, em 2006 a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT – *International Society for Cellular Therapy*) publicou um artigo sugerindo uma série de critérios para a caracterização dessas células. Neste trabalho, Dominici e colaboradores (2006) propõem três critérios que são utilizados para definir diferentes populações de CEM: (1) morfologia alongada e fusiforme e capacidade de aderência ao plástico em condições padronizadas de cultivo; (2) perfil imunofenotípico característico, tendo expressão positiva para marcadores de superfície mesenquimais (CD73, CD90 e CD105) e negativa par marcadores hematopoiéticos (CD14 ou CD11b, CD34, CD45, CD79 α ou CD19 e HLA-DR) e (3) potencialidade de diferenciação para osteoblastos, adipócitos e condroblastos.

As CEM podem ser encontradas em diversos tecidos adultos, tanto em seres humanos quanto em outros modelos animais. As fontes de CEM mais estudadas incluem a medula óssea, o tecido adiposo, o sangue periférico e os músculos (Brown *et al.*, 2019). Na última década o tecido adiposo vem se destacando como uma fonte apropriada para obtenção de CEM, uma vez que possuem as mesmas características das obtidas a partir de outros tecidos, porém a disponibilidade do tecido é maior e pode ser coletado através de cirurgia minimamente invasiva (Rashid *et al.*, 2021). Além disso, em comparação com as CEM derivadas de medula óssea, que são as mais pesquisadas e conhecidas, as CEM de tecido adiposo possuem maior potencial proliferativo e são capazes de manter o seu fenótipo durante o cultivo *in vitro* em passagens celulares mais altas (Zhu *et al.*, 2008).

1.3 CEM NA MEDICINA VETERINÁRIA

Assim como na medicina humana, grande parte dos ensaios clínicos na medicina veterinária são focados no tratamento de doenças degenerativas e inflamatórias (Maki *et al.*, 2020; Brondeel *et al.*, 2021). Em muitos países a utilização de CEM para o tratamento de determinadas doenças é regulamentado. No Brasil, por exemplo, a Resolução Nº 1363, de 22 de outubro de 2020 (Anexo A) do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), regulamenta a aplicação de CT para o tratamento de doenças em animais, com respaldo técnico indicando segurança e eficácia do procedimento.

Uma parte considerável dos trabalhos com a aplicação de CEM na medicina veterinária é focada no tratamento de animais de companhia, mais especificamente cães, devido ao fato de que muitos destes animais são acometidos com doenças de articulação, como o caso da Osteoartrite (OA) (Ganiev *et al.*, 2021). Olsson e colaboradores (2021) relatam em sua revisão sistemática que ensaios clínicos utilizando CEM para o tratamento de cães com OA resultaram em melhora no quadro clínico dos pacientes de todos os estudos analisados a curto prazo, necessitando, porém, maior número de ensaios clínicos randomizados para avaliação dos efeitos ao decorrer do tempo após a aplicação das CEM. Além disso, a compreensão das características específicas de cada fonte de obtenção de CEM caninas, suas qualidades e deficiências, também influenciam muito na construção de práticas clínicas que visam utilizar CT íntegras e em quantidade suficiente para aplicação no tratamento de determinadas doenças em pacientes caninos.

Como citado anteriormente, o tecido adiposo vem se mostrando uma fonte muito eficiente e acessível para se obter CEM, e em cães não é diferente. As CEM derivadas do Tecido Adiposo Canino (CEM-TAC) possuem características semelhantes a CEM de outras fontes animais e possuem potencial de proliferação bastante elevado, superior a diversas outras fontes, devido ao seu tempo de duplicação celular reduzido (Zhan *et al.*, 2019).

1.4 PARÂMETROS RELACIONADOS AO POTENCIAL CLÍNICO DE CEM

A capacidade proliferativa, muito verificada através de experimentos de avaliação da cinética celular, como o cálculo de Tempo de Duplicação Celular (CDT – *Cell Doubling Time*) e análise da curva de crescimento celular, é utilizada como parâmetro de qualidade em diversos estudos com CEM-TAC com potencial para aplicação veterinária (Guercio *et al.*, 2013; Rashid *et al.*, 2021), isto porque a terapia celular com CEM exige uma quantidade elevada de células (Hassan *et al.*, 2020). Sendo assim, pesquisadores buscam otimizar cada vez mais os protocolos de cultivo de CEM caninas para que seja aproveitado ao máximo o seu potencial proliferativo.

Outro fator importante que pode ser utilizado como parâmetro de qualidade, e fundamental para a atividade terapêutica de CT, é a migração celular (Grada *et al.*, 2017). Este parâmetro pode ser facilmente avaliado através de metodologias bastante simples. O ensaio de fechamento de ferida *in vitro*, também chamado de *Scratch Assay*, é uma análise de migração e proliferação celular utilizado em diversas pesquisas com CT. Este ensaio pode ajudar a

compreender melhor a cinética de CEM e avaliar a qualidade de migração nas células em expansão *in vitro* (Martinotti & Ranzato, 2019).

Diversos outros parâmetros podem ser utilizados para constatação da qualidade das CEM-TAC isoladas, como a caracterização celular, citada anteriormente, mas um outro bom exemplo é a análise de integridade genética. Desde 2008 quando Kuo & Yang sugeriram a fosforilação da histona H2AX como um biomarcador para quebra de dupla fita de DNA, muitos pesquisadores passaram a utilizar este método para verificar, por exemplo, senescência celular induzida por danos genéticos (He *et al.*, 2016) e citotoxicidade (Kim *et al.*, 2013).

A fosforilação da Serina-139 da histona H2AX ocorre quando a dupla fita de DNA é quebrada, transformando esta histona da família H2A em uma variante chamada de gama-H2AX (γ -H2AX). A fosforilação, realizada por uma série de quinases específicas, como algumas serina/treonina quinases, é o estopim para o recrutamento da maquinaria de reparo de DNA, processo chamado de resposta ao dano de DNA (DDR – DNA Damage Response) (Kuo & Yang, 2008). Por conta da histona γ -H2AX representar uma característica importante para verificação da integridade genética, diversos autores vêm utilizando esta análise no âmbito das pesquisas com CEM (Acordi, 2019; Delben, 2017; Konkova, 2020; Liu, 2020).

Delben & Zomer (2021) descrevem que CEM do tecido adiposo cultivadas a longo prazo, sofrem redução da integridade genética, resultado observado através da metodologia de identificação de células γ -H2AX positivas e entram em senescência replicativa em passagens elevadas. Sendo assim, o ensaio de imunocitoquímica com marcação para γ -H2AX pode ser uma ferramenta importante para a identificação de populações senescentes de CEM.

1.5 JUSTIFICATIVA

Com o grande aumento de ensaios clínicos e pré-clínicos envolvendo a terapia celular com CEM, na medicina regenerativa humana e animal, surge a necessidade de se avaliar intensivamente as características de CEM quando em cultura celular *in vitro*, desta maneira análises das características celulares devem ser verificadas conforme o aumento do número de passagens celulares. Além disso, se faz necessário o estabelecimento de protocolos de isolamento, cultivo e expansão otimizados para a prática veterinária, uma vez que boa parte dos procedimentos aplicados nestas células são baseados em CEM humanas

Por conta disso, este trabalho buscou verificar as características de CEM, o potencial proliferativo e a presença de danos genéticos em CEM-TAC ao longo da amplificação celular

in vitro, verificando possíveis alterações das CEM-TAC, relacionadas à queda do potencial proliferativo e senescência celular, conforme o aumento de passagens.

2 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Realizar o isolamento, cultivo, caracterização e a análise da biologia e cinética de células estromais mesenquimais de tecido adiposo subcutâneo canino (CEM-TAC).

2.1.2 Objetivos Específicos

- Obter, cultivar, expandir e criopreservar CEM-TAC até passagem 3 (P3), e avaliar:
 - i. A morfologia celular por microscopia de contraste de fase;
 - ii. A expressão de marcadores de superfície mesenquimais e hematopoiéticos por citometria de fluxo;
 - iii. O potencial proliferativo, através da avaliação da curva de crescimento e do cálculo do tempo de duplicação celular;
 - iv. A migração celular por ensaio de fechamento de ferida;
 - v. A presença do marcador de dano genético γ -H2AX por imunocitoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO CANINO

O tecido adiposo da região abdominal foi obtido de excedente de cirurgia de castração (histerectomia) de um doador canino, em clínica veterinária parceira da cidade de Florianópolis, após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido pelo tutor do animal. Os procedimentos cirúrgicos referentes à coleta do tecido adiposo foram realizados por um cirurgião veterinário capacitado para posterior isolamento e cultivo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) sob o protocolo 1852210519.

O fragmento de tecido adiposo de cerca de 3g foi lavado duas vezes em solução de Tampão Fosfato Salino (PBS, do Inglês *Phosphate Buffered Saline*, Gibco) acrescido de 1% de solução de antibiótico (PS) contendo penicilina ([200 U/mL]; Sigma-Aldrich) e estreptomicina ([10 µg/mL]; Sigma-Aldrich) e em seguida armazenado em recipiente estéril contendo meio de transporte composto pelo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado com 0,5% de PS. O recipiente contendo os fragmentos de tecido foi então hermeticamente fechado e encaminhado para o Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) localizado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para posterior processamento e isolamento das CEM-TAC.

3.1.1 Características do doador

O doador canino do qual se obteve o excedente de tecido adiposo foi uma fêmea SRD (Sem Raça Definida) de cerca de 8 meses na data do isolamento. A amostra foi utilizada para isolamento das células, conforme descrito no item 3.2 abaixo, sendo parcialmente criopreservadas para compor o biobanco do LACERT e posterior uso nos experimentos. Os dados referentes ao doador das CEM-TAC utilizadas neste trabalho estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Características do Doador Canino (CA08F).

Código da linhagem celular	CA08F
Sexo	Fêmea
Idade na data do isolamento	8 meses
Data do isolamento	18/06/2019
Raça	SRD

3.2 ISOLAMENTO DAS CEM-TAC

Para o isolamento das CEM foi utilizado protocolo já estabelecido no LACERT para a obtenção de CEM de tecido adiposo subcutâneo humano e animal (Zomer, 2019), com algumas modificações. Todos os procedimentos de isolamento, manipulação e posterior cultivo das CEM-TAC foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical. O recipiente contendo o fragmento de tecido foi aberto e iniciado o processo de isolamento das CEM-TAC que se dividiu em duas etapas: a fase de dissociação mecânica do tecido e a de dissociação enzimática.

3.2.1 Dissociação mecânica

Inicialmente o fragmento de tecido foi transferido para uma placa de Petri de 35 mm contendo 1,5 mL de PBS, lavado com o auxílio de uma pinça cirúrgica objetivando a retirada do excesso de sangue e em seguida transferido para uma nova placa de Petri de 35 mm contendo 500 µl de PBS. Após esta primeira lavagem, iniciou-se o procedimento de dissociação mecânica do tecido, onde este foi delicadamente fragmentado em pedaços ainda menores com o auxílio de tesoura cirúrgica de ponta fina, a fim de se facilitar a ação da enzima que foi aplicada na sequência.

3.2.2 Dissociação enzimática

Os pequenos fragmentos teciduais obtidos do processo de dissociação mecânica foram transferidos para um tubo cônico de 15 mL e em seguida incubados a 37°C por 40-60 minutos com 1 mL de Colagenase Tipo I [2 mg/mL] (Sigma-Aldrich) para cada 1,5 mL do tecido dissociado em PBS, com homogeneização do conteúdo a cada 10 minutos.

Após o tempo de incubação com a Colagenase, a ação enzimática foi neutralizada com a aplicação de DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Vitrocell), no mesmo volume do conteúdo presente no tubo. Em seguida o tubo foi centrifugado a 300 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspensionado e incubado com 10 mL de Tampão de Lise de Hemácias (155 mM NH₄Cl; 12 mM NaHCO₃; 0,1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético) durante 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida novamente centrifugado (300 x g, 5 minutos). O sobrenadante foi descartado, o *pellet* obtido ressuspensionado em 5 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB e filtrado com filtro de células (CellStrainer, Falcon) de poros de 40 µm. Em seguida as células obtidas foram semeadas em garrafa de cultura de 25 cm² constituindo a passagem 0 (P0).

3.3 CULTIVO E EXPANSÃO CELULAR DAS CEM-TAC

As células foram mantidas em incubadora a 37°C, em 5% de CO₂ e 95% de umidade por cerca de sete dias até confluência de 80%. O meio de cultura, composto por DMEM-10% SFB, foi trocado no dia seguinte ao isolamento, com o objetivo de retirar possíveis células mortas e outros fragmentos biológicos não aderidos ao plástico e depois a cada 2-3 dias de

cultivo. A troca do meio de cultura consistiu na retirada do meio utilizado nas garrafas de cultura, seguido de uma lavagem com PBS e da adição de DMEM suplementado com 10% SFB. Atingida a confluência, foi realizado o procedimento de subcultura como descrito no item a seguir.

3.3.1 Subcultivo das CEM-TAC

Para a amplificação das CEM-TAC, após atingida a confluência de cerca de 80% da cultura em P0, as células foram descoladas de frasco de cultura através da metodologia de tripsinização. Para isso, o meio de cultura foi descartado e as CEM-TAC incubadas durante 5 minutos à 37°C, com 1 mL de solução de Tripsina-EDTA (0,25%, ThermoFisher). A seguir as CEM-TAC foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL e a ação da tripsina foi neutralizada com a adição de 2 mL de DMEM-10% SFB. O tubo foi então centrifugado (300 x g; 5 minutos) e o sobrenadante obtido, descartado. Em seguida as células foram ressuspensas em DMEM-10% SFB e plaqueadas em novas garrafas/placas de cultivo constituindo a passagem 1 (P1). O procedimento foi repetido até a passagem 3 (P3).

3.3.2 Criopreservação das CEM-TAC

As CEM-TAC foram congeladas para compor o biobanco de CEM de animais de companhia do LACERT para posterior utilização em experimentos. Para o procedimento de criopreservação, as CEM-TAC em P0 e P1 foram tripsinizadas como descrito no item anterior, ressuspensas em DMEM-10% SFB e quantificadas em Câmara de Neubauer. Amostras de 1×10^6 células foram ressuspensas em 1 mL de meio de congelamento composto DMEM-10% SFB acrescido de 10% do crioprotetor Dimetilsulfóxido (DMSO) e então transferidas para criotubos, devidamente identificados. Em seguida os criotubos foram transferidos para o recipiente *CoolCell*TM (Corning) que foi armazenado em ultrafreezer a -80°C. No dia seguinte, os criotubos foram transferidos para cilindros de nitrogênio líquido. É importante ressaltar que as células criopreservadas foram utilizadas apenas para a execução do experimento de ensaio de fechamento de ferida em P3.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DE CEM-TAC

3.4.1 Morfologia celular

A morfologia das CEM-TAC foi verificada em microscópio invertido de contraste de fase (Olympus CK40), onde observou-se o formato fusiforme e a capacidade de aderência ao material plástico das garrafas de cultura celular. O acompanhamento da morfologia foi realizado rotineiramente em todas as passagens celulares a cada 2-3 dias de cultivo.

3.4.2 Citometria de fluxo

A expressão positiva de marcadores de superfície mesenquimais (CD90 e CD105) e negativa de marcadores hematopoiéticos (CD34 e CD45) foi avaliada por citometria de fluxo conforme protocolo estabelecido previamente no LACERT (Jeremias, 2013), com pequenas alterações.

Para tanto, as células em P1 e P3 foram cultivadas, conforme descrito anteriormente no item 3.3, até confluência de 80% e tripsinizadas. Em seguida, as células foram transferidas para tubos de citometria, na densidade de 1×10^5 células em 100 μ L de solução de PBS acrescido de 10% de SFB por tubo. Foi realizada a marcação imunocitoquímica com os anticorpos específicos para os marcadores analisados (CD34, CD45, CD90 e CD105) (BD Biosciences), conforme Quadro 2, com incubação durante 1 hora a 4°C (todos os anticorpos em concentração de 5 μ g/mL). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACS Scalibur (BD Biosciences), disponibilizado pelo Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB – UFSC).

O Quadro 2 apresenta as informações referentes aos anticorpos utilizados na citometria de fluxo para caracterização das CEM-TAC.

Quadro 2 – Características dos anticorpos utilizados para a citometria de fluxo.

Anticorpo	Imunoglobulina	Fluorocromo	Objetivo
Anti-Human CD34	IgG1 de camundongo	PE	Marcador hematopoiético
Anti-Human CD45	IgG1 de camundongo	FITC	Marcador hematopoiético
Anti-Human CD90	IgG1 de camundongo	FITC	Marcador mesenquimal
Anti-Human CD105	IgG1 de camundongo	PerCP	Marcador mesenquimal

3.5 CINÉTICA CELULAR DE CEM-TAC

3.5.1 Curva de crescimento celular de CEM-TAC

Para avaliar a capacidade proliferativa das CEM-TAC foi realizada a curva de crescimento celular. Para tanto, 5×10^3 células foram plaqueadas em poços de placa de cultivo de 24 poços (total de 10 poços) em DMEM-10% SFB com trocas a cada 2-3 dias e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 . A cada 24 horas, e até 120 horas, células de 2 poços eram tripsinizadas e quantificadas utilizando-se uma Câmara de Neubauer em um microscópio óptico de contraste de fase. Este ensaio foi realizado em P1, P2 e P3.

3.5.2 Cálculo do tempo de duplicação das CEM-TAC

O tempo de duplicação celular ou *Cell Doubling Time* (CDT) foi calculado em P1, P2 e P3 utilizando os dados do ensaio descrito no item anterior, aplicando-se a seguinte fórmula (Roth, 2006):

$$CDT = \frac{T \times \log(2)}{\log(Nf) \times \log(Ni)}$$

Onde:

CDT = tempo de duplicação celular

T = Tempo de cultivo

Nf = número final de células (em 120 horas)

Ni = número inicial de células (em 24 horas)

3.5.3 Ensaio de fechamento de ferida *in vitro* (*Cell Scratch Assay*)

O ensaio de fechamento de ferida, também chamado de *Cell Scratch Assay* foi realizado com o objetivo de avaliar a migração e a proliferação das CEM-TAC *in vitro*. Para isso, 2×10^4 células foram plaqueadas em triplicata em poços de placa de 24 poços e cultivadas até confluência de 95%. A seguir foram realizadas lesões em formato de cruz nas monocamadas celulares com o auxílio de uma micropipeta com ponteira de 200 μL .

O fechamento da ferida foi acompanhado pela medida da área da lesão a 0, 24 e 48 horas após a indução da ferida. Para tanto foram obtidas fotos de seis campos diferentes da área das feridas por microscopia óptica de contraste de fase (microscópio invertido Olympus CK40). A área da ferida foi mensurada utilizando-se o software ImageJ (NIH) e calculado o fechamento da área após 24 horas relativo à área inicial da ferida (em 0 horas).

3.6 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA DO MARCADOR GAMA-H2AX

A presença do marcador de quebra de dupla fita γ -H2AX (KUO et al, 2008,) foi avaliada por imunocitoquímica para fluorescência em P1, P2 e P3 seguida de quantificação da frequência relativa de células γ -H2AX positivas de acordo com protocolo previamente descrito (Delben *et al.*, 2021).

Para tanto, foram plaqueadas 2×10^3 células, em duplicata, em placa de 24 poços, e em seguida fixadas com fixador paraformaldeído 4%. Após 24 horas as células foram lavadas com PBS-Triton durante 30 minutos e a seguir incubadas com PBS-5% SFB durante 40-60 minutos para bloqueio dos sítios inespecíficos. A seguir, as células foram incubadas com o anticorpo primário (IgG, monoclonal) para o marcador γ -H2AX (*Mouse Anti-Human phospho-Histone H2A.X*) (1:500, Millipore) *overnight* a 4°C. Após lavagens com PBS-Tween foi realizada a incubação com anticorpo secundário (*Anti-Mouse Alexa Fluor 488*; IgG, Invitrogen) durante 60 minutos à temperatura ambiente. Os núcleos totais foram corados com DAPI (4'-6-diamidina-2-fenilindol; 1:1000, Sigma Aldrich) por 10 minutos em temperatura ambiente. As marcações foram analisadas em microscópio invertido de fluorescência (OLYMPUS IX71) disponibilizado pelo LAMEB/UFSC e obteve-se 9 fotografias (Câmera Olympus DP83) de diferentes campos em cada passagem celular, totalizando 27 imagens. As micrografias obtidas foram analisadas através do software ImageJ (NIH) e a proporção de núcleos contendo focos de γ -H2AX, calculado em relação aos núcleos totais corados com DAPI.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias dependendo do grupo de dados analisados, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, com auxílio do *Software GraphPad Prism 5* (Graphpad Software, Inc.). Os valores foram descritos como a média \pm desvio padrão (DP). As diferenças estatísticas foram consideradas

significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas são referentes a um doador canino, do qual obteve-se o tecido adiposo e realizou-se os experimentos descritos, com as replicatas técnicas descritas anteriormente.

4 RESULTADOS

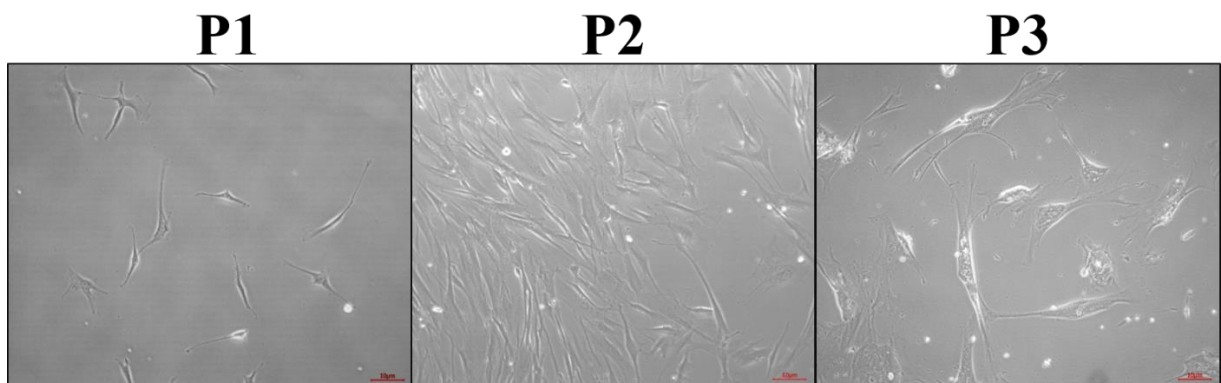
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CEM-TAC

Uma boa caracterização de células-tronco com potencial clínico é essencial para o desenvolvimento e otimização de técnicas de cultivo e aplicação destas células, e na medicina veterinária não é diferente. As CEM-TAC foram caracterizadas de acordo com os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (ISCT) (Dominici et al., 2006).

4.1.1 Avaliação da morfologia das CEM-TAC

A análise microscópica das CEM-TAC revela que a adesão ao plástico e a morfologia alongada e fusiforme, característica de CEM, se manteve constante em P1 e P2. Porém em P3 algumas células apresentaram morfologia e tamanho irregulares similar ao de células senescentes. A Figura 1 apresenta fotomicrografias representativas da morfologia das CEM-TAC em P1, P2 e P3.

Figura 1. Fotografias representativas em microscopia de contraste de fase revelando a morfologia alongada e fusiforme das CEM-TAC em P1, P2 e P3. Barra de escala: 10 μm .

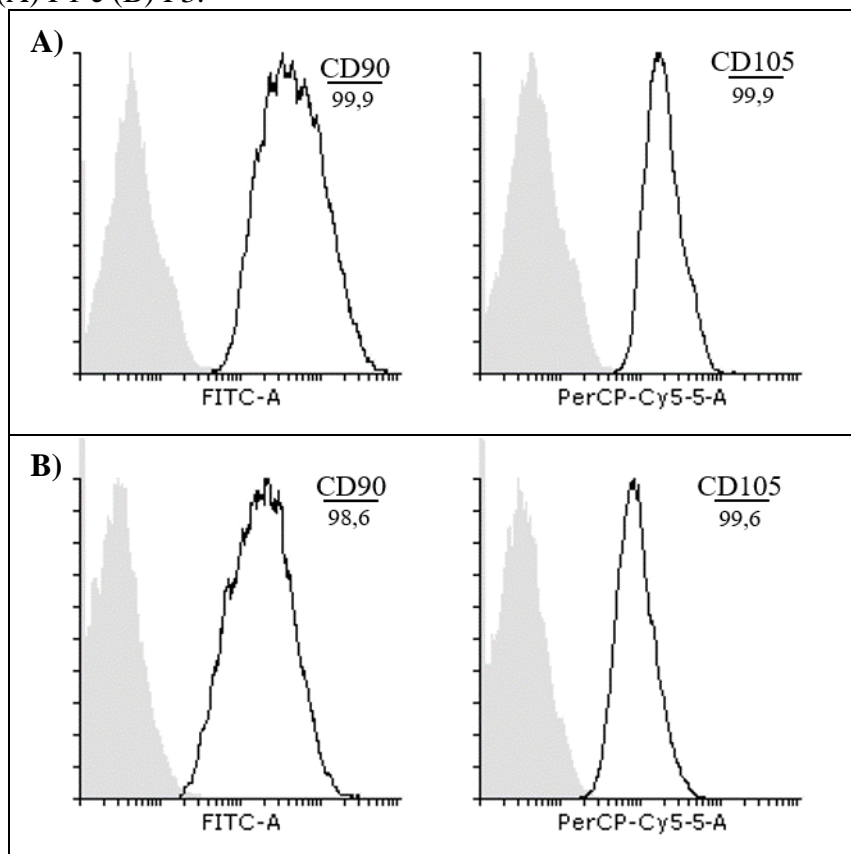


4.1.2 Análise da expressão de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos por citometria de fluxo

4.1.2.1 Análise dos marcadores mesenquimais

A análise de citometria de fluxo para marcadores de superfície mesenquimais revelou expressão positiva de CD90 e CD105 de modo semelhante nas duas passagens analisadas (P1 e P3) (Figura 2). O CD90 foi expresso em 99,9% das CEM-TAC em P1 e em 98,6% em P3. Já o CD105 foi observado em 99,9% das células em P1 e em 99,6% em P3. Esses resultados demonstram que a população de CEM-TAC cultivada apresenta características mesenquimais até P3.

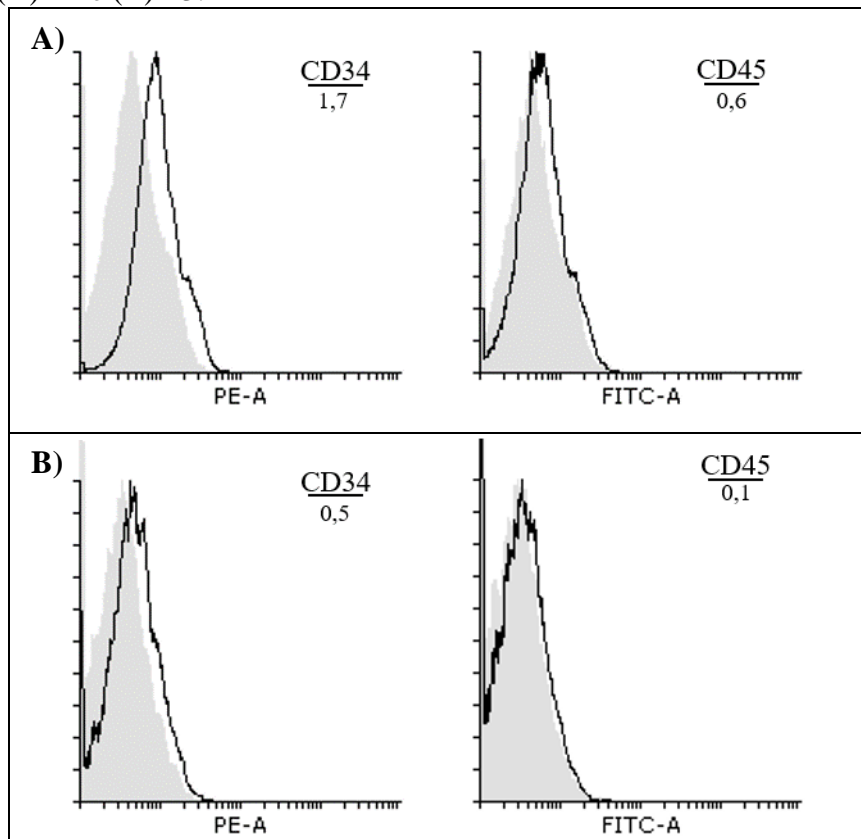
Figura 2. Expressão de marcadores de superfície mesenquimais CD90 e CD105 por citometria de fluxo em (A) P1 e (B) P3.



4.1.2.2 Análise dos marcadores hematopoiéticos

A expressão dos marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 foi avaliada também por citometria de fluxo (Figura 3). Os resultados demonstraram expressão extremamente reduzida desses marcadores pelas CEM-TAC tanto em P1 (1,7% e 0,6% para CD34 e CD45, respectivamente) quanto P3 (0,5% e 0,1% para CD34 e CD45, respectivamente), demonstrando que as células obtidas não estão relacionadas com a linhagem hematopoiética.

Figura 3. Expressão de marcadores de superfície hematopoiéticos CD34 e CD45 por citometria de fluxo em (A) P1 e (B) P3.



4.2 CINÉTICA CELULAR DAS CEM-TAC

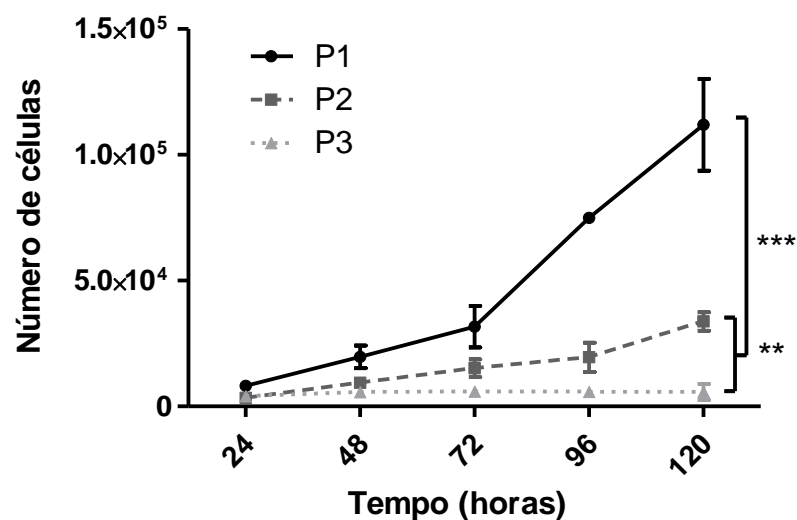
Parâmetros de cinética celular como proliferação e migração são extremamente importantes para o desenvolvimento de protocolos que visam a aplicação clínica e biotecnológica de produtos biológicos. Desta maneira, buscou-se avaliar o potencial proliferativo e migratório da população de CEM-TAC obtida.

4.2.1 Avaliação da curva de crescimento celular

A análise da curva de crescimento das CEM-TAC indica relação direta entre a passagem e o potencial proliferativo (Figura 4). Os resultados revelaram alta taxa proliferativa em P1 ao longo das 120 horas analisadas, especialmente após as 72 horas de cultivo.

Em P2 a curva de crescimento das CEM-TAC foi significativamente reduzida em relação a P1 ($p < 0,001$) nas 120 horas analisadas. Em P3 foi possível observar uma redução ainda mais acentuada e significativa no potencial proliferativo das células no período comparado a P1 e a P2 ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente).

Figura 4. Quantificação do número de CEM-TAC em P1 a P3. As linhas refletem os dados (média \pm DP) de duas replicatas experimentais para cada passagem celular. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.



Em conjunto, com os resultados de crescimento celular é possível verificar o alto potencial de expansão das CEM-TAC em P1 e a drástica redução da sua taxa de multiplicação nas passagens seguintes que pode estar relacionada com o processo de subcultivo.

4.2.2 Tempo de duplicação celular

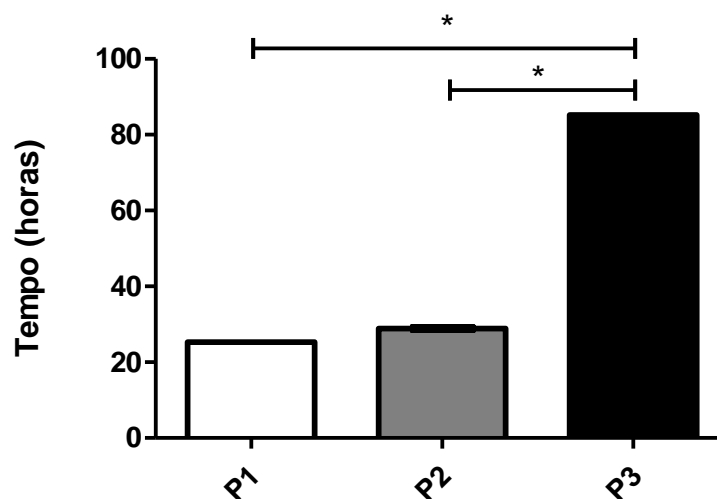
O cálculo do Tempo de Duplicação Celular (do Inglês, *Cell Doubling Time*, CDT) revela o tempo em que a população de células leva para duplicar seu número. Esse cálculo considera que a taxa de proliferação de uma população não é a mesma nas diferentes fases do

cultivo devido ao efeito da densidade celular ou da adaptação ao ambiente (Lindström & Friedman, 2020).

Para esta análise foram necessárias algumas adaptações devido à baixa proliferação das CEM-TAC em P3 que, ao final das 120 horas do ensaio, teve menos células do que a quantidade inicialmente semeada, em uma das duplicatas. Assim, o número inicial e o final de células tiveram de ser desconsiderados para o cálculo.

Esta análise mostrou que o tempo de duplicação, em horas, das CEM-TAC em P3 ($85,23 \pm 9,32$) foi significativamente superior a P1 ($25,33 \pm 0,53$) e a P2 ($28,87 \pm 0,6$) ($p < 0,05$), que foram semelhantes entre si (Figura 5).

Figura 5. Tempo de Duplicação (CDT) das CEM-TAC em P1 a P3. Os valores estão expressos em horas e foram obtidos em P1 ($25,33 \pm 0,53$), P2 ($28,87 \pm 0,6$) e P3 ($85,23 \pm 9,32$). $*p < 0,05$ por ANOVA de uma via seguido pós-teste de Bonferroni.



4.2.3 Análise do potencial de fechamento de ferida *in vitro* (Scratch Assay)

O *Scratch Assay* traz uma informação importante sobre o potencial migratório/proliferativo das células (Grada et al., 2017). Com esta análise foi possível observar que houve diferença significativa no potencial de fechamento da ferida das CEM-TAC entre as 3 passagens analisadas (Figuras 6 e 7). Em P2, houve aumento significativo na porcentagem de fechamento da área da lesão após 24 horas ($90,76 \pm 6,12$) em relação a P1 ($73,16 \pm 5,85$). Por outro lado, em P3 os valores foram significativamente inferiores tanto a P1 quanto a P2 ($50,22 \pm 11,38$). É importante ressaltar que após 48 horas as lesões estavam fechadas em todas as culturas analisadas, exceto em uma das replicatas em P3.

Figura 6. Micrografias representativas de contraste de fase da área da lesão (linha amarela) imediatamente (0 horas) e após 24 horas de lesão em P1, P2 e P3. Barra de escala: 10 μ m.

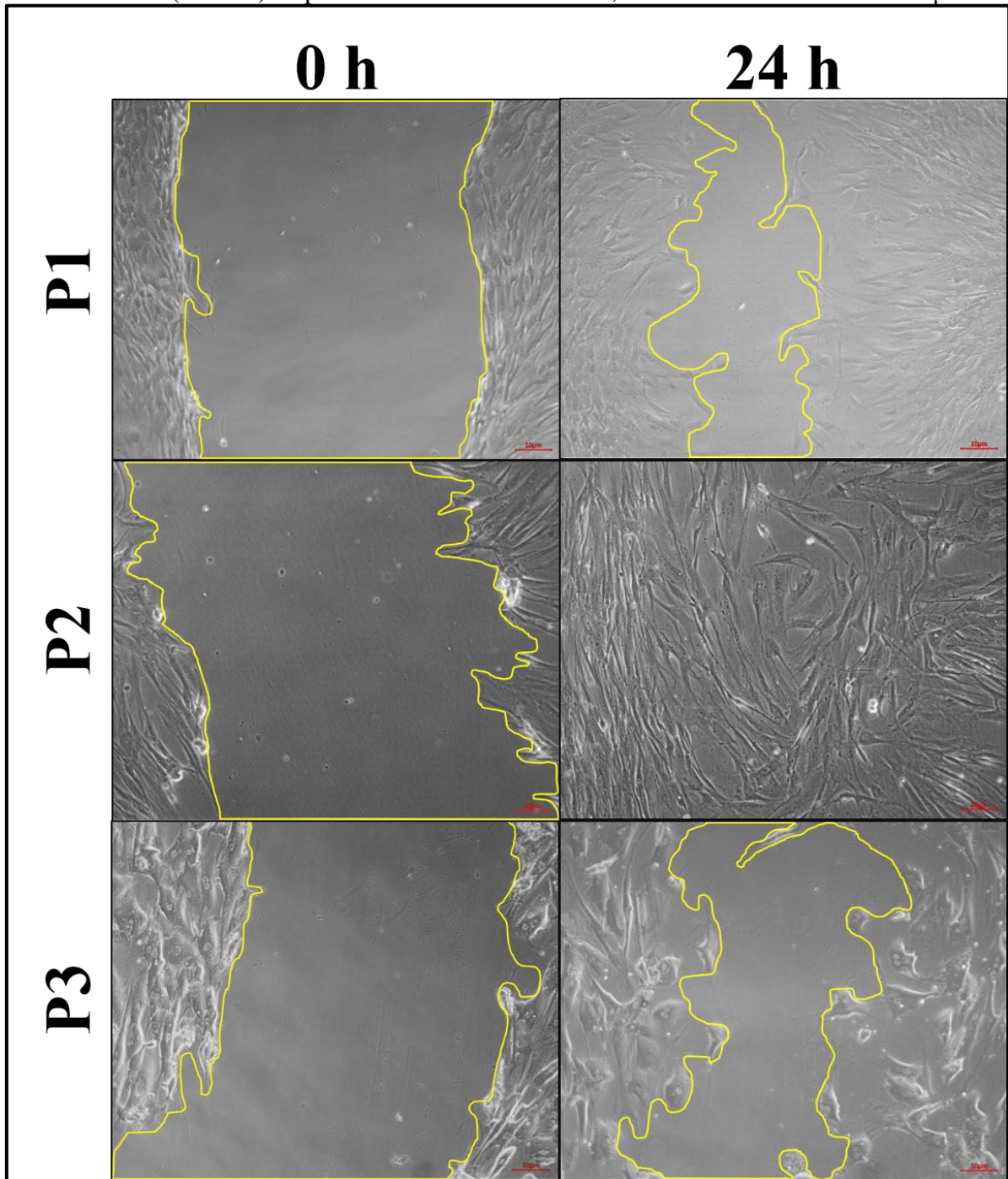
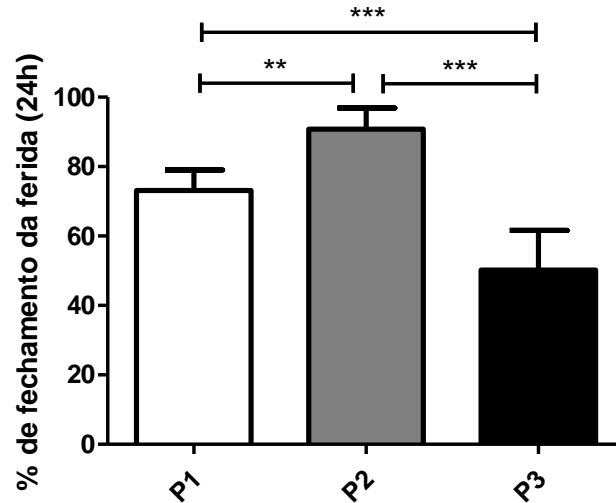


Figura 7. Análise quantitativa do fechamento de ferida. Os dados representam a média \pm DP de 6 campos microscópicos realizados em triplicata em P1 ($73,16 \pm 5,85$), P2 ($90,76 \pm 6,12$) e P3 ($50,22 \pm 11,38$). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ por ANOVA uma via seguido do teste Bonferroni.



4.3 AVALIAÇÃO DO MARCADOR DE DANO GENÉTICO GAMA-H2AX

A análise imunocitoquímica para fluorescência revelou que 32,12% ($\pm 21,68$) das CEM-TAC em P1 eram positivas para o marcador de dano genético γ -H2AX. Os resultados demonstraram aumento significativo na proporção de células positivas para esse marcador em P2 ($61,83 \pm 18,82$) e em P3 ($80,56 \pm 6,15$) quando comparados a P1 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figuras 8 e 9).

Figura 8. Imagens representativas em microscopia de fluorescência das CEM-TAC revelando os núcleos totais corados com DAPI (coluna esquerda) e os núcleos imunomarcados para γ -H2AX em P1, P2 e P3. Barra de escala: 10 μ m.

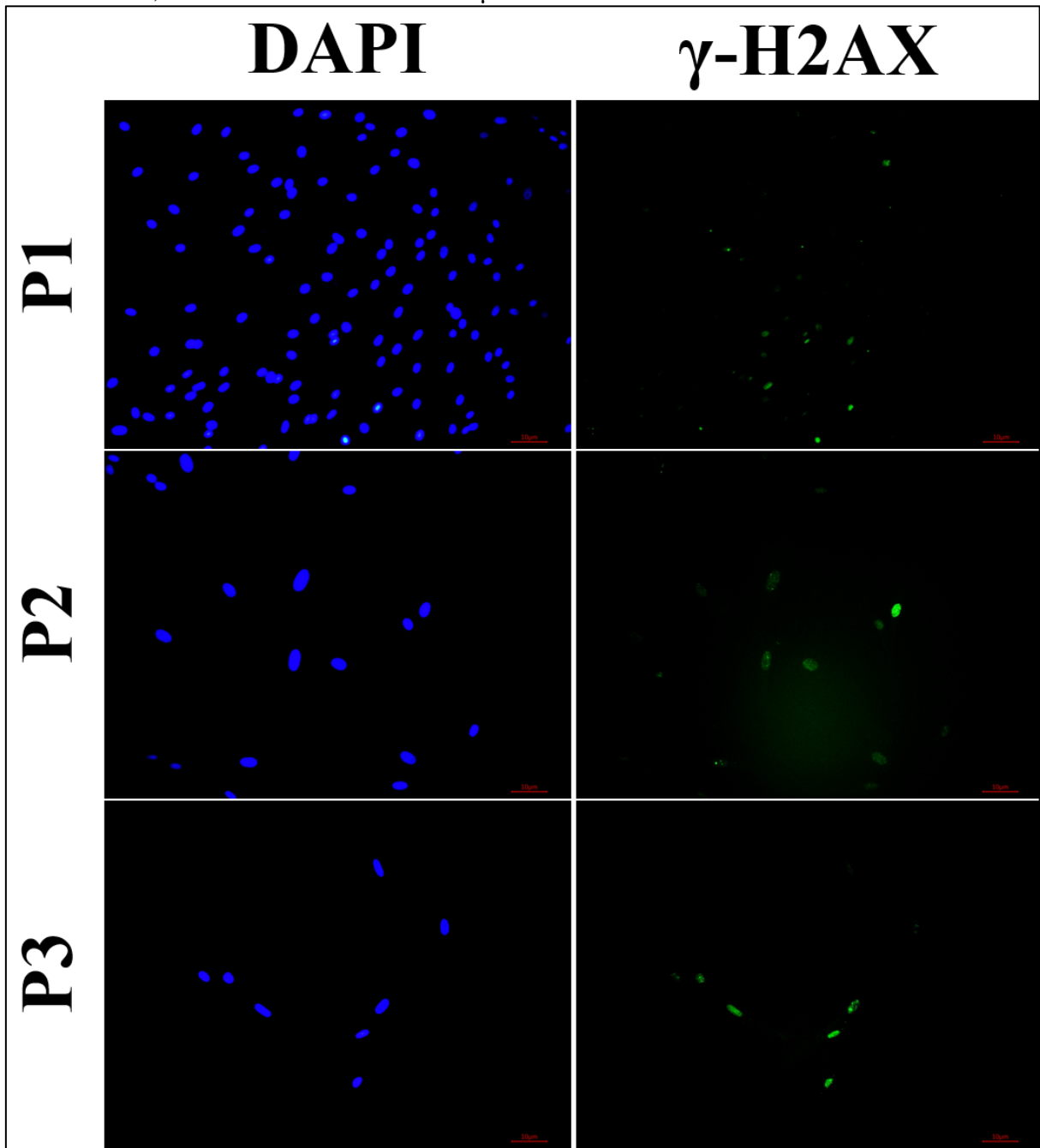
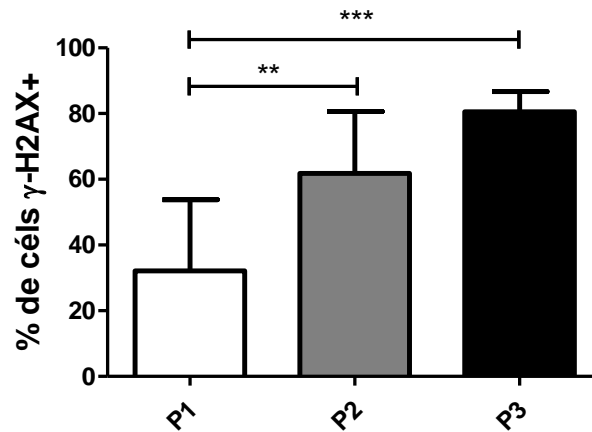


Figura 9. Análise da proporção de CEM-TAC positivas para γ -H2AX em relação aos núcleos totais corados com DAPI. Os dados representam a média \pm DP de 9 campos microscópicos fotografados em cada passagem celular: P1 ($32,12 \pm 21,68$), P2 ($61,83 \pm 18,82$) e P3 ($80,56 \pm 6,15$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ por ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni.



5 DISCUSSÃO

Este trabalho se propôs a isolar, cultivar, caracterizar e analisar os parâmetros de cinética, migração e dano genético de CEM obtidas do tecido adiposo de um doador canino, tendo em vista o potencial de aplicação na clínica veterinária. Foi possível observar que, nas três passagens analisadas, as CEM-TAC apresentaram características de células-tronco mesenquimais, resultado este que pode ser observado pela capacidade de adesão ao plástico e perfil imunofenotípico positivo para marcadores mesenquimais e negativo para marcadores hematopoiéticos. Nas metodologias utilizadas para avaliar a cinética celular e a morfologia verificou-se que a proliferação das CEM-TAC foi consideravelmente reduzida após P1 e estas começaram a apresentar morfologia e tamanho irregulares em P3, o que pode indicar uma forte influência do processo de subcultura e/ou de tripsinização na capacidade de divisão celular e indução de senescência.

5.1 OBTENÇÃO, CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO DE CEM DO TECIDO ADIPOSEO CANINO (CEM-TAC)

Neste trabalho mostrou-se que os protocolos utilizados para a obtenção de CEM do tecido adiposo subcutâneo canino foram eficientes, o que é importante para a aquisição de linhagens celulares com potencial para aplicação clínica. Atualmente, o tecido adiposo vem sendo muito utilizado como fonte de CEM adultas por conta da sua facilidade de obtenção e

disponibilidade (Rashid, 2021), além do que as CEM obtidas a partir deste tecido apresentam características semelhantes às humanas que são, por sua vez, padronizadas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (ISCT) (Dominici *et al.*, 2006). Dito isso, as CEM-TAC isoladas neste trabalho corroboram a ideia de que o tecido adiposo é uma fonte apropriada e eficiente de CEM caninas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DE CEM-TAC

O desenvolvimento de protocolos de caracterização, incluindo a avaliação da biologia básica, é essencial para novas aplicações clínicas das CEM (Samsonraj *et al.*, 2017). As CEM-TAC caracterizadas neste trabalho demonstraram capacidade de aderência ao plástico *in vitro*, morfologia fibroblastóide e perfil imunofenotípico característico de CEM em P1 e P3.

A morfologia celular é um critério prático muito utilizado para a caracterização das CEM, uma vez que através dela é possível verificar o formato característico e a capacidade de adesão ao material plástico das CEM. Além disso, a observação da morfologia pode ser aplicada para a identificação dos fenótipos senescentes em cultura de CEM, pois são facilmente detectáveis devido ao seu tamanho e formato irregulares (Kamal *et al.*, 2020). Neste sentido, as CEM-TAC apresentaram a morfologia alongada e fusiforme característica das CEM durante as 2 primeiras passagens, indicando a integridade morfológica destas células durante o tempo em que foram cultivadas. Em P3 algumas células começaram a apresentar tamanho maior e morfologia irregular, indicando início de senescência. Do mesmo modo, Fang e colaboradores (2018) descrevem aumento na frequência de alterações morfológicas em CEM-TAC durante o cultivo prolongado *in vitro* acompanhado de aumento considerável do marcador associado à senescência β -galactosidase (SA- β -gal) entre as passagens 3 e 11. Estas observações podem indicar que a senescência de CEM-TAC ocorre em passagens superiores às utilizadas neste trabalho, porém, devido à alta complexidade do processo de senescência celular são necessários outros métodos de análise e em passagens mais tardias buscando verificar o início do fenótipo senescente nessas células.

A análise de citometria de fluxo, usada para identificar verificar o perfil imunofenotípico das CEM-TAC, demonstrou que a população de células em P1 e P3 apresentava expressão positiva dos marcadores mesenquimais CD90 e CD105. O CD90 (*Cluster of Differentiation* 90), também conhecido como Thy-1, é uma proteína de superfície celular relacionada com diversos processos de interação célula-célula, célula-matriz

extracelular e com processos de adesão e migração celular, dentre outros (Rege & Hagood, 2006). Já o CD105 (*Cluster of differentiation 105*), também chamado de endoglin, é um receptor da superfamília TGF- β envolvido em processos importantes como a angiogênese (Nassiri, 2011). Estes dois marcadores são tidos como parte do quadro imunofenotípico de CEM, e aqui demonstrou-se que as células obtidas a partir do tecido adiposo canino, sob os protocolos aplicados, expressa positivamente estes marcadores mesenquimais. Quanto aos marcadores de células de linhagem hematopoiética (CD34 e CD45), houve uma expressão negativa por parte das CEM-TAC, indicando mais uma vez a característica de CEM da população de células obtidas.

Apesar dos marcadores utilizados para compor a análise imunofenotípica das CEM-TAC serem bastante relevantes, existem outros marcadores que devem ser avaliados nas células caninas a fim de verificar a semelhança, ou não, em relação às CEM humanas, uma vez que os estudos de caracterização de CEM são na maioria realizados em humanos. Um exemplo da diferença potencial entre espécies são alguns resultados parciais, ainda não publicados, obtidos pelo nosso grupo de pesquisa que apontam para uma menor expressão de CD73 em CEM-TAC comparado a CEM humanas. Por conta disso a continuidade do processo de caracterização através de identificação destes marcadores é extremamente importante.

Um outro aspecto que não pôde ser avaliado neste trabalho, mas que também é determinante para a completa caracterização de CEM é o potencial de diferenciação para os fenótipos mesenquimais (Dominici *et al.*, 2006). Desta maneira, uma das perspectivas de continuidade do trabalho aqui apresentado, é a realização de procedimentos a fim de verificar o potencial de diferenciação de CEM-TAC para osteoblastos, adipócitos e condroblastos.

5.3 O POTENCIAL PROLIFERATIVO DE CEM-TAC É REDUZIDO COM O AUMENTO DE PASSAGENS

Para a terapia celular, o potencial de proliferação das células-tronco é um parâmetro extremamente importante, uma vez que a sua aplicação para tratamento de determinadas doenças ou condições clínicas depende de uma quantidade elevada de células, maior do que o necessário para experimentação *in vitro* (Hassan *et al.*, 2020).

A criopreservação de CEM vem sendo estudada por diversos grupos ao redor do mundo com o objetivo de avaliar a eficiência do congelamento de células-tronco com potencial clínico. Martinello e colaboradores (2011) descrevem que, mesmo após um ano de

criopreservação, as CEM-TAC não perdem suas características CEM, podendo ser expandidas novamente, após o descongelamento, com poucas perdas relativas à taxa de proliferação celular. Uma das variáveis que parece afetar a eficiência da criopreservação de CEM-TAC é a quantidade de Soro Fetal Bovino (SFB) utilizada no protocolo de congelamento. Di Bella e colaboradores (2021) demonstraram que uma maior eficiência na manutenção do potencial proliferativo de CEM-TAC, após criopreservação prolongada, pode estar relacionada com a proporção de SFB e DMSO utilizadas no meio de congelamento. Isso abre uma outra oportunidade para se otimizar protocolos de criopreservação já estabelecidos, incorporando dados recentes da literatura. Neste trabalho, apesar de não ter sido profundamente analisada, foi possível constatar que a criopreservação pode ter influenciado negativamente no potencial de migração das CEM-TAC, discutido a seguir no item 5.4.

Neste trabalho, o processo de amplificação *in vitro* aparentemente influenciou na proliferação das CEM-TAC, possivelmente como consequência do protocolo de expansão utilizado. Assim, sugere-se a necessidade da otimização dos procedimentos aplicados para melhor aproveitamento do potencial proliferativo das CEM-TAC. Alternativamente, mas não necessariamente de modo exclusivo, a redução da taxa de proliferação celular observada pode estar relacionada a características intrínsecas das CEM-TAC, havendo assim a necessidade de avaliar células provenientes de outros doadores. Neste sentido, observações da prática de cultura celular apontam para a queda da capacidade proliferativa das CEM com o aumento das passagens.

O Tempo de Duplicação Celular (CDT) pode ser um aliado fortíssimo ao se trabalhar com CEM pois através deste cálculo é possível montar um planejamento para a expansão otimizando tempo e uso de recursos. O cálculo CDT mostrou aumento significativo no tempo necessário para a duplicação das CEM-TAC em P3 em relação ao das duas passagens iniciais, sugerindo que o ciclo celular se tornou mais longo. Este resultado demonstra a dificuldade de expansão prolongada *in vitro* das CEM-TAC pelo menos as provenientes desse doador e corrobora com a queda da capacidade proliferativa e alteração da morfologia observadas em P3 pelo ensaio de proliferação e análise microscópica.

Outro aspecto que pode interferir no potencial proliferativo das CEM-TAC são as características do doador do tecido adiposo, como o peso, idade, condições clínicas específicas, dentre outros. Neste sentido, com relação à idade dos doadores do tecido, Guercio e colaboradores (2013) constataram que CEM isoladas de cães jovens (8 meses a 4 anos) apresentaram potencial proliferativo superior a doadores adultos (8-14 anos). O doador das

CEM-TAC utilizadas neste trabalho tinha cerca de 8 meses na data da coleta do tecido adiposo subcutâneo, fato este que pode ter contribuído para a alta taxa de proliferação observada em passagem inicial. Porém novos ensaios com maior número de repetições e com CEM obtidas de outros doadores devem ser realizados para avaliar essa hipótese.

Os resultados aqui obtidos podem contribuir para a elaboração de novos protocolos de expansão de CEM-TAC visando otimizar ao máximo o potencial proliferativo destas células e o tempo de cultivo celular *in vitro*.

5.4 MIGRAÇÃO CELULAR E ENSAIO DE FECHAMENTO DE FERIDA

O potencial de fechamento de ferida *in vitro* foi avaliado através do *cell scratch assay*, que fornece resultado referente à migração e proliferação das CEM através da simulação simplificada do processo de cicatrização cutânea (Walter *et al.*, 2010). Neste trabalho foi constatado que houve uma redução da capacidade de fechamento de ferida das CEM-TAC em P3, em comparação com as outras passagens, após 24 horas, o que pode estar relacionado com a queda drástica no potencial proliferativo observado nesta passagem celular. Por outro lado, pôde-se observar um potencial semelhante de fechamento da ferida entre as passagens, após 48 horas, onde todas as lesões *in vitro*, exceto uma em P3, haviam sido fechadas. Zomer e colaboradores (2020) descrevem uma possível relação entre a taxa de proliferação e o tempo de duplicação celular, com o potencial de fechamento de ferida *in vitro*, o que vai ao encontro com o observado aqui neste trabalho, através do *cell scratch assay*. Porém isso não explica o maior potencial de fechamento de ferida verificado em P2, em comparação com as outras passagens.

Neste sentido, um fato que pode explicar parcialmente a redução mais que significativa na migração das CEM-TAC em P3 é a criopreservação das células. Isto porque as CEM-TAC utilizadas para o experimento de fechamento de ferida *in vitro* haviam sido congeladas em março de 2020, devido ao início da pandemia mundial de COVID-19, e só puderam ser descongeladas e cultivadas novamente para experimentação no segundo semestre de 2021. Desta maneira, o processo de criopreservação pode ter contribuído para redução da migração em P3 em conjunto com o aumento do número de passagens e a queda na taxa proliferativa.

5.5 AUMENTO DOS DANOS GENÉTICOS DAS CEM-TAC COM AS PASSAGENS

A resposta aos danos de DNA é um importante processo responsável pelo reparo de quebra de dupla-fita. Um dos componentes deste tipo de resposta inicia-se na fosforilação da Serina-139 da histona H2AX, gerando a forma γ -H2AX (Sharma *et al.*, 2012). Desta maneira o γ -H2AX está presente em regiões do DNA onde houve a quebra de dupla fita, funcionando como um sinalizador para a maquinaria de reparo.

A análise de imunocitoquímica para fluorescência revelou aumento significativo e progressivo na taxa de CEM-TAC positivas para γ -H2AX em P2 e P3, indicando um aumento de danos de DNA relacionados à quebra de dupla fita, conforme o aumento das passagens. Estes resultados sugerem que o cultivo prolongado de CEM-TAC pode levá-las ao desenvolvimento de alterações genéticas mais cedo do que em CEM derivadas de tecido adiposo humano, que apresentam uma quantidade de marcação com γ -H2AX semelhante àquela demonstrada aqui neste trabalho, em passagens superiores à P3 (Acordi, 2019; Delben *et al.*, 2021). Isto pode ocorrer por conta de características intrínsecas às células caninas, como a eficiência de proteínas relacionadas aos mecanismos de reparo do DNA, porém novos ensaios devem ser realizados a fim de avaliar esse parâmetro.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos e analisados neste trabalho, conclui-se que as Células Estromais Mesenquimais isoladas a partir do tecido adiposo subcutâneo canino apresentam características comuns às CEM, como morfologia, capacidade de adesão ao plástico e perfil imunofenotípico específico. Além disso o potencial proliferativo, a integridade genética e a morfologia celular das CEM-TAC são afetadas pelo aumento no número de passagens, indicando uma possível influência do processo de expansão celular *in vitro* sob estes parâmetros. Por fim, novas análises com um maior número amostral de doadores caninos, além de análises referentes ao processo de senescência e ciclo celular, são necessárias para melhor avaliar estas características e o potencial clínico das CEM-TAC na medicina veterinária.

Ficam como perspectivas para continuidade deste trabalho, o aumento do número amostral de doadores de tecido adiposo e inclusão de novas análises de caracterização, como a diferenciação para os fenótipos mesenquimais, e de senescência celular, como a avaliação do ciclo celular e do estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ACORDI, C. S. **Avaliação comparativa da integridade celular e genética das células estromais mesenquimais do tecido adiposo abdominal e facial humano durante as passagens e exposição à radiação ultravioleta, em cultivo.** Universidade Federal de Santa Catarina (dissertação de mestrado), Florianópolis, 2019.
- BARAD, L.; SCHICK, R.; ZEEVI-LEVIN, N.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; BINAH, O. Human Embryonic Stem Cells vs Human Induced Pluripotent Stem Cells for Cardiac Repair. **Canadian Journal Of Cardiology**, v. 30, n. 11, p. 1279-1287, 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2014.06.023>.
- BIFARI, F. et al. Immunological properties of embryonic and adult stem cells. **World Journal Of Stem Cells**, v. 2, n. 3, p. 50, 2010. Baishideng Publishing Group Inc <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v2.i3.50>.
- BRONDEEL, C. et al. Review: mesenchymal stem cell therapy in canine osteoarthritis research. **Frontiers In Veterinary Science**, v. 8, p. 1-13, 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2021.668881>.
- BROWN, C. et al. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential. **Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1738-1755, 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/term.2914>
- DELBEN, P. B. **Estudo Comparativo de caracterização entre células estromais mesenquimais isoladas do tecido adiposo facial e do abdominal.** Universidade Federal de Santa Catarina (dissertação de mestrado), Florianópolis, 2017.
- DELBEN, P. B.; ZOMER, H. D.; SILVA, C. A.; GOMES, R. S.; MELO, F. R.; DILLENBURG-PILLA, P.; TRENTIN, A. G. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells from face and abdomen undergo replicative senescence and loss of genetic integrity after long-term culture. **Experimental Cell Research**, v. 406, n. 1, p. 1-13, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112740>.
- DIAS, I., et al. Clinical application of mesenchymal stem cells therapy in musculoskeletal injuries in dogs - A review of the scientific literature. **Open Veterinary Journal**, v. 11, n. 2, p. 188, 2021. ScopeMed. <http://dx.doi.org/10.5455/ovj.2021.v11.i2.2>.
- DOMINICI, M.; BLANC, K. Le; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C; KRAUSE, D.s.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- GAO, F.; CHIU, S. M.; MOTAN, D. A. L.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; JI, H-L.; TSE, H-F.; FU, Q-L.; LIAN, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.327>.

GANIEV, Y. et al. The treatment of articular cartilage injuries with mesenchymal stem cells in different animal species. **Open Veterinary Journal**, v. 11, n. 1, p. 128-134, 2021. ScopeMed. <http://dx.doi.org/10.4314/ovj.v11i1.19>.

GRADA, A.; OTERO-VINAS, M.; PRIETO-CASTRILLO, F.; OBAGI, Z.; FALANGA, V. Research Techniques Made Simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 2, p. 11-16, 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>.

FANG, J. et al. Melatonin prevents senescence of canine adipose-derived mesenchymal stem cells through activating NRF2 and inhibiting ER stress. **Aging**, v. 10, n. 10, p. 2954-2972, 2018.

GUERCIO, A. et al. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. **Cell Biology International**, v. 37, n. 8, p. 789-798, 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbin.10090>.

HASSAN, M. N. F. B. et al. Large-Scale Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2020, p. 1-17, 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/9529465>.

HE, Z-Y.; WANG, W-Y.; HU, W-Y.; YANG, L.; LI, Y.; ZHANG, W-Y.; YANG, Y-S.; LIU, S-C.; ZHANG, F-L.; MEI, R. Gamma-H2AX upregulation caused by Wip1 deficiency increases depression-related cellular senescence in hippocampus. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep34558>.

JEREMIAS, T. D. S. **Avaliação do potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais derivadas da pele no reparo de lesões cutâneas**. Universidade Federal de Santa Catarina, (tese de doutorado), 2013.

KAMAL, N. S. M.; SAFUAN, S.; SHAMSUDDIN, S.; FOROOZANDEH, P.. Aging of the cells: insight into cellular senescence and detection methods. **European Journal Of Cell Biology**, v. 99, n. 6, p. 1-14, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151108>.

KATSUDA, T. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep01197>.

KAUR, G., et al. A double-blinded placebo-controlled evaluation of adipose-derived mesenchymal stem cells in treatment of canine atopic dermatitis. **Veterinary Research Communications**, v. 46, n. 1, p. 251-260, 29 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-021-09853-9>.

KIM, Y. B.; JEUNG, H.-C.; JEONG, I.; LEE, K.; RHA, S. Y.; CHUNG, H. C.; KIM, G. E.. Mechanism of enhancement of radiation-induced cytotoxicity by sorafenib in colorectal cancer. **Journal Of Radiation Research**, v. 54, n. 1, p. 52-60, 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jrr/rrs074>.

KONKOVA, Marina; ABRAMOVA, Margarita; KALIANOV, Andrey; ERSHOVA, Elizaveta; DOLGIKH, Olga; UMRIUKHIN, Pavel; IZHEVSKAYA, Vera; KUTSEV, Sergey; VEIKO, Natalia; KOSTYUK, Svetlana. Mesenchymal Stem Cells Early Response to Low-Dose Ionizing Radiation. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, v. 8, p. 1-17, 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.584497>.

KUO, L. J. & YANG, LI-XI. γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. **In Vivo**, v. 22, n. 3, p. 305-310, 2008.

LINDSTRÖM, H. J. G.; FRIEDMAN, R. Inferring time-dependent population growth rates in cell cultures undergoing adaptation. **Bmc Bioinformatics**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-020-03887-7>.

LIU, Zheng-Zhao; HONG, Chun-Gu; HU, Wen-Bao; CHEN, Meng-Lu; DUAN, R.; LI, Hong-Ming; YUE, T.; CAO, J.; WANG, Zhen-Xing; CHEN, Chun-Yuan. Autophagy receptor OPTN (optineurin) regulates mesenchymal stem cell fate and bone-fat balance during aging by clearing FABP3. **Autophagy**, v. 17, n. 10, p. 2766-2782, 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2020.1839286>.

MAKI, C. B et al. Intra-articular Administration of Allogeneic Adipose Derived MSCs Reduces Pain and Lameness in Dogs With Hip Osteoarthritis: a double blinded, randomized, placebo controlled pilot study. **Frontiers In Veterinary Science**, v. 7, p. 1-11, 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2020.00570>.

MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZZO, L.; MOLLO, A.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F.; DECAMINADA, M.; PATRUNO, M. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Research In Veterinary Science**, v. 91, n. 1, p. 18-24, 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.024>.

MARTINOTTI, S. & Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. In: ASSAY, Scratch Wound Healing. **Epidermal Cells: methods and protocols**. 4. ed. New York: Humana, 2019. p. 225-229.

NASSIRI F., et al. Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy, **Anticancer Research**, v. 31, p. 2283-2290, 2011.

OLSSON, D. C.; TEIXEIRA, B. L.; JEREMIAS, T. S.; RÉUS, J. C.; CANTO, G. L.; PORPORATTI, A. L.; TRENTIN, A. G.. Administration of mesenchymal stem cells from adipose tissue at the hip joint of dogs with osteoarthritis: a systematic review. **Research In Veterinary Science**, v. 135, p. 495-503, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.11.014>.

PLAPPERT-HELBIG, U.; LIBERTINI, S.; FRIEAUFF, W.; THEIL, D.; MARTUS, H. Gamma-H2AX immunofluorescence for the detection of tissue-specific genotoxicity in vivo. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, v. 60, n. 1, p. 4-16, 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/em.22238>.

- RASHID, U. et al. Characterization and differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from multiple canine adipose tissue sources. **Bmc Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-021-03100-8>.
- REGE, T. A.; HAGOOD, J. S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 8, p. 1045-1054, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.05-5460rev>.
- ROTH, V. 2006. **Doubling Time Computing**. Disponível em: <http://www.doubling-time.com/compute.php>.
- SAMSONRAJ, R. M.; RAGHUNATH, M.; NURCOMBE, V.; HUI, J. H.; VAN WIJNEN, A. J.; COOL, S. M. Concise Review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 12, p. 2173-2185, 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1002/sctm.17-0129>.
- SHARMA, A.; SINGH, K.; ALMASAN, A. Histone H2AX Phosphorylation: a marker for dna damage. **Methods In Molecular Biology**, p. 613-626, 2012. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3_40.
- SIDNEY, L. E.; BRANCH, M. J.; DUNPHY, S. E.; DUA, H. S.; HOPKINSON, A. Concise Review: evidence for cd34 as a common marker for diverse progenitors. **Stem Cells**, v. 32, n. 6, p. 1380-1389, 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1661>.
- SOBHANI, A. et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. **Acta Med Iran**, v. 55, n. 1, p. 6 – 23, 2017.
- WALTER, M.N.M.; WRIGHT, K.T.; FULLER, H.R.; MACNEIL, S.; JOHNSON, W.e.B.. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 7, p. 1271-1281, 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.026>.
- ZHAN, X-S. A Comparative Study of Biological Characteristics and Transcriptome Profiles of Mesenchymal Stem Cells from Different Canine Tissues. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1-16, 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20061485>.
- ZHU, Y.; LIU, T.; SONG, K.; FAN, X.; MA, X.; CUI, Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than bmsc. **Cell Biochemistry And Function**, v. 26, n. 6, p. 664-675, ago. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.1488>.
- ZOMER, H. D. **Derme versus tecido adiposo: influência da fonte de células estromais mesenquimais em engenharia de tecidos para o reparo cutâneo**. Universidade Federal de Santa Catarina (tese de doutorado), Florianópolis, 2018.
- ZOMER, H. D.; JEREMIAS, T. S.; RATNER, B.; TRENTIN, A. G. Mesenchymal stromal cells from dermal and adipose tissues induce macrophage polarization to a pro-repair

phenotype and improve skin wound healing. **Cytotherapy**, v. 22, n. 5, p. 247-260, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.02.003>.

ZOMER, H. D.; VARELA, G. K. S.; DELBEN, P. B.; HECK, D.; JEREMIAS, T. S.; TRENTIN, A. G. In vitro comparative study of human mesenchymal stromal cells from dermis and adipose tissue for application in skin wound healing. **Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, v. 13, n. 5, p. 729-741, 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/term.2820>.

ANEXO A – RESOLUÇÃO Nº 1363 (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA)

RESOLUÇÃO Nº 1363, DE 22 DE OUTUBRO DE 2020

Define orientações para a terapia com células-tronco em animais.

O CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV), no uso das atribuições que lhe confere a alínea “f” do artigo 16 da Lei 5.517, de 23 de outubro de 1968;

considerando competir ao CFMV orientar e disciplinar o exercício da medicina veterinária;

considerando o disposto nas alíneas “a” e “c” do artigo 5º da Lei 5.517, de 23 de outubro de 1968;

considerando o disposto nas Resoluções CFMV nº 1138, de 25 de janeiro de 2016, nº 1236, de 26 de outubro de 2018;

RESOLVE:

Art. 1º A terapia com células-tronco em animais compreendida a indicação, a prescrição e o uso, é atividade clínica privativa do médico-veterinário e deve seguir as seguintes orientações:

I - deve contar com respaldo técnico que indique segurança e eficácia para o tratamento da doença ou agravo específico, na dose e via indicada, seja de forma isolada, adjuvante ou complementar;

II - o médico-veterinário é responsável pela utilização de equipamentos, produtos e materiais apropriados e, devidamente, registrados nos órgãos competentes.

III - deve ser autorizada expressamente pelo proprietário, responsável ou tutor do animal mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o procedimento, conforme diretrizes contidas Resolução CFMV nº 1321, de 24 de abril de 2020, e outras que a complementem ou substituam.

Art. 2º Esta Resolução entra em vigor no dia **03 de novembro de 2020**.

Francisco Cavalcanti de Almeida
Presidente
CRMV-SP nº 1012

Helio Blume
Secretário-Geral
CRMV-DF nº 1551

Publicada no DOU de 23/10/2020, Seção 1, pág. 528