



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

Monique Coelho Bion

**AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA REPLICATIVA DAS CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSE DE FELINOS DURANTE A
AMPLIFICAÇÃO *IN VITRO***

Florianópolis
2023

Monique Coelho Bion

**AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA REPLICATIVA DAS CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSE DE FELINOS DURANTE A
AMPLIFICAÇÃO *IN VITRO***

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre.

Orientador(a): Profa. Dra. Andréa
Gonçalves Trentin

Florianópolis
2023

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

Bion, Monique Coelho

Avaliação da senescência replicativa das células estromais mesenquimais do tecido adiposo de felinos durante a amplificação in vitro / Monique Coelho Bion ; orientadora, Andréa Gonçalves Trentin, 2023.

59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

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

Monique Coelho Bion

Avaliação da senescência replicativa das células estromais mesenquimais do tecido adiposo de felinos durante amplificação *in vitro*

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

Prof.^a Patrícia de Souza Brocardo, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Viviane Glaser, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Virgínia Meneghini Lazzari, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Claudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

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

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais,
por sempre acreditarem nos meus
sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço imensamente à minha orientadora Prof. Dra. Andréa, pela oportunidade de desenvolver meu mestrado no LACERT. Mesmo sem nenhuma experiência na área de células-tronco você me recebeu de portas abertas e aceitou o desafio de me orientar. Obrigada pela confiança em meu trabalho, pelos conselhos, ensinamentos e discussões. Durante esse tempo adquiri aprendizados que irei levar para a vida e pude evoluir como pesquisadora.

À Prof. Dra. Talita Jeremias por me auxiliar na análise dos meus resultados e pelos seus conselhos esclarecedores, suas contribuições foram muito valiosas. Ao Prof. Dr. Ricardo Garcez que, mesmo não contribuindo diretamente para elaboração deste trabalho, sempre se mostrou muito solícito e me auxiliou com diversas sugestões que estimularam meu pensamento crítico.

Meus sinceros agradecimentos ao programa de bolsas universitárias de Santa Catarina, UNIEDU/FUMDES, que concedeu minha bolsa de pesquisa e possibilitou o desenvolvimento do meu projeto de mestrado. À Universidade Federal de Santa Catarina, que vem sendo minha segunda casa por 8 anos, pelo apoio estrutural e financeiro. Agradeço também ao PPGBCD pelo acolhimento, pelas oportunidades de aprendizado e pelas amizades que pude formar durante esse tempo.

Agradeço também aos coordenadores e corpo técnico do LAMEB, que são extremamente competentes e solícitos. Sem a estrutura oferecida pelo LAMEB não seria possível desenvolver diversas análises presentes nesse trabalho.

À Diretoria de Bem-estar Animal e ao Hospital Veterinário Santa Vida por disponibilizar o acesso ao tecido adiposo de felinos coletado. Agradeço especialmente as veterinárias Giovanna Vinci Roberto e Camila Batschke, por abraçarem o meu projeto e oferecerem os seus serviços para coleta dos tecidos. E não poderia deixar de agradecer a todas as gatas que doaram o seu tecido adiposo, Nikita, Ilíada, Rajada, Amélia, Kyara e Rosemary, e aos seus tutores.

Agradeço os meus colegas de laboratório, do PPGBCD e da vida: Gabriel, Vitória, Fernanda, Karynne, Maiara, Gabriel, Vitória, Thais, Victor, Peterson, Lucas, Camila, Nathali, Johanna, Felipe, Isadora, Leonardo e Daniely. Especialmente aos IC's Eduardo e a Aline, que me deram a oportunidade de desenvolver as minhas habilidades pedagógicas e pelos conhecimentos que trocamos. Nossos cafés,

karaokês e bares tornaram essa experiência muitos mais divertida e leve. Agradeço também a minha eterna dupla acadêmica e de vida, Barbara, pela parceria de todos os momentos, por todo o apoio e por compartilhar os mesmos sonhos.

Ao meu namorado e colega de trabalho, Victor, por me acompanhar nessa trajetória. Como colega de trabalho, agradeço por me receber tão bem no laboratório e me ensinar a grande maioria do conhecimento que tenho sobre células-tronco, admiro a tua dedicação com a pesquisa e ensino. Como namorado, obrigada por estar sempre presente e pela dedicação, por me auxiliar nos momentos difíceis e por vibrar as minhas vitórias. Obrigada pelo companheirismo, formamos o melhor time!

E, sobretudo, agradeço à minha família pelo amor, educação e incentivo. Ao meu irmão, Matheus, por me obrigar a exercitar a paciência, pelas palhaçadas e cumplicidade. Acima de tudo, agradeço aos meus pais, Julio e Raquel, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem nos meus sonhos e não medirem esforços para realizá-los. Obrigado por me ensinarem valores extremamente valiosos, que irei levar para a vida. Amo vocês!

“Dreams are lovely. But they are just dreams. Fleeting, ephemeral. Pretty. But dreams do not come true just because you dream them. It’s hard work that makes things happen. It’s hard work that creates change.”

Shonda Rhimes, 2015

RESUMO

Nos últimos anos, observou-se um crescente interesse pela utilização de células estromais mesenquimais (CEM) como estratégia terapêutica em animais de companhia, principalmente em cães e gatos. Um fator indispensável para o transplante de CEM durante a terapia celular é o grande número de células, o qual é alcançado por amplificação celular *in vitro*. No entanto, sabe-se que a amplificação prolongada *in vitro* pode ocasionar acúmulo de dano celular associado a senescência. Portanto, para garantir a eficácia do tratamento e estabelecer protocolos seguros para utilização das CEM em aplicação terapêutica é necessário um aprofundamento na pesquisa básica, contemplando estudos controlados das características e das propriedades biológicas das CEM. Sendo assim, o presente trabalho buscou avaliar o efeito da técnica de amplificação celular *in vitro* sobre as características das CEM do tecido adiposo de felinos, visando a análise de senescência replicativa. Para isso, as CEM do tecido adiposo de felinos (CEM-TAF), obtidas de excedentes de cirurgia de castração, foram previamente isoladas e caracterizadas quanto ao perfil mesenquimal. Os dados obtidos demonstraram que as CEM-TAF isoladas neste trabalho apresentaram perfil mesenquimal, por meio de morfologia fibroblastóide, presença de marcador de superfície mesenquimal (CD90) e ausência de marcadores hematopoiéticos (CD45 e CD34), e pela capacidade de diferenciação das células em fenótipos mesenquimais. A seguir, foi avaliado o efeito da amplificação celular *in vitro* sobre parâmetros de senescência celular. Para isso, as CEM-TAF foram submetidas ao cultivo de passagem 1 (P1) a passagem 7 (P7), e as suas propriedades foram analisadas ao longo das passagens. Os resultados demonstraram que as CEM-TAF apresentaram aumento no número de células hipertróficas e achatadas com o aumento do número de passagens, e tendência de diminuição no potencial proliferativo acompanhado pela redução da capacidade clonogênica em passagens tardias. Além disso, foi observado aumento do número de células positivas para SA- β -gal e da proporção de células com alterações nucleares em passagens tardias. As análises de ciclo celular demonstraram uma tendência de aumento na proporção de CEM-TAF na fase G1/G0 do ciclo celular e diminuição na fase S em P5 e P7. Em adição, as análises de alterações nucleares e ciclo celular demonstraram aumento da proporção de células em apoptose durante o cultivo de longo prazo. Esses resultados sugerem que a técnica de amplificação celular *in vitro* por tempo prolongado afeta negativamente características importantes das CEM-TAF, que são requeridas para o sucesso da aplicação terapêutica, o que pode comprometer seriamente a segurança e eficácia da utilização dessas células na medicina veterinária regenerativa.

Palavras-chave: Células-tronco; Medicina Veterinária; Senescência Replicativa; Felino.

ABSTRACT

In recent years, there has been a growing interest in the use of mesenchymal stromal cells (MSC) as a therapeutic strategy in companion animals, mainly dogs, and cats. An indispensable factor for MSC transplantation during cell therapy is the large number of cells achieved by cell amplification in vitro. However, prolonged amplification in vitro can cause an accumulation of cell damage associated with senescence. Therefore, to guarantee treatment efficacy and establish safe protocols for MSC use in therapeutic applications, it is necessary to deepen basic research, including controlled studies of MSC characteristics and biological properties. Thus, the present work evaluated the effect of the in vitro cellular amplification technique on feline adipose tissue-derived MSC (DSC) characteristics, focusing on replicative senescence. In this way, MSC from feline adipose tissue obtained from castration surgery was previously isolated and characterized according to the mesenchymal profile. The data obtained demonstrated that the feline DSC isolated in this work presented a mesenchymal profile through fibroblastic morphology, the presence of mesenchymal surface marker (CD90) and absence of hematopoietic markers (CD45 and CD34), and the ability of cells to differentiate into mesenchymal phenotypes. Next, was evaluated the effect of in vitro cell amplification on cell senescence parameters. Then, feline DSC was cultivated from passage 1 (P1) to passage 7 (P7), and their properties were analyzed along the passages. The results showed that feline DSC showed an increase in the number of hypertrophic and flattened cells with an increase in the number of passages and a tendency towards a decrease in the proliferative potential accompanied by a reduction in the clonogenic capacity in late passages. Furthermore, an increase in the number of cells positive for SA- β -gal and the proportion of cells with nuclear alterations in late passages was observed. Cell cycle analyses showed a trend towards an increase in the feline DSC ratio in the G1/G0 phase of the cell cycle and a decrease in the S phase at P5 and P7. In addition, analyses of nuclear and cell cycle changes demonstrated an increase in the proportion of cells undergoing apoptosis during long-term culture. These results suggest that in vitro cell amplification for a long time negatively affects important characteristics of feline DSC and can seriously compromise the safety and efficacy of MSC use in regenerative veterinary medicine.

Keywords: Stem cell; Veterinary Medicine; Replicative senescence; Feline.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aplicação clínica das células estromais mesenquimais na medicina veterinária.....	14
Figura 2. Características de senescência celular.....	16
Figura 3. Desenho experimental.....	20
Figura 4. Caracterização do perfil mesenquimal de CEM-TAF.....	30
Figura 5. Potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais de CEM-TAF.....	31
Figura 6. Potencial de proliferação de CEM-TAF cultivada de P1 a P7.....	33
Figura 7. Eficiência clonal de CEM-TAF durante amplificação celular <i>in vitro</i>	34
Figura 8. Alteração morfológica em CEM-TAF submetidas à amplificação <i>in vitro</i> .	35
Figura 9. Acúmulo de SA- β -gal em CEM-TAF durante o cultivo de longo prazo.....	36
Figura 10. Perfil das fases do ciclo celular de CEM-TAF submetidas à amplificação <i>in vitro</i>	37
Figura 11. Avaliação da integridade genética das CEM-TAF submetidas a amplificação <i>in vitro</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados na citometria de fluxo	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CBMN	<i>Cytokinesis-block micronucleus</i> (Micronúcleo com bloqueio de citocinese)
CDT	Cumulative doubling time (Tempo cumulativo de duplicação da população)
CEM	Células estromais mesenquimais
CEM-TA	Células estromais mesenquimais do tecido adiposo
CEM-TAF	Células estromais mesenquimais do tecido adiposo de felinos
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFU	<i>Colony-forming unit</i> (Unidades formadoras de colônia)
CPDL	<i>Cumulative population doubling level</i> (Nível cumulativo de duplicação da população)
DIBEA	Diretoria de Bem-estar Animal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
FUMDES	Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i> (Sociedade Internacional para Terapia Celular)
LACERT	Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PS	Penicilina-Estreptomicina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SA-β-gal	β -galactosidase associada à senescência
SASP	Fenótipo secretor associado a senescência
SFB	Soro Fetal Bovino
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Células estromais mesenquimais.....	11
1.2 Células estromais mesenquimais na medicina veterinária.....	12
1.3 Células estromais mesenquimais de felinos	13
1.4 Senescência replicativa	15
2. OBJETIVO GERAL	18
2.1 Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Desenho experimental	19
3.2 Obtenção das CEM do tecido adiposo felino	20
3.3 Isolamento e cultivo das CEM-TAF	21
3.4 Expansão das CEM-TAF	22
3.5 Criopreservação.....	22
3.6 Descongelamento das CEM-TAF.....	23
3.7 Caracterização das CEM-TAF	23
3.6.1 Morfologia celular e potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais.....	23
3.6.2 Citometria de fluxo	24
3.8 Potencial clonogênico	25
3.9 <i>Cumulative population doubling level</i> (CPDL) e tempo de duplicação (CDT) das CEM-TAF	26
3.10 Detecção de SA- β -gal	26
3.10 Análise de ciclo celular.....	27
3.11 Ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese.....	28
3.12 Análises estatísticas	29
4. RESULTADOS	30

4.1	Avaliação do perfil mesenquimal das CEM-TAF	30
4.2	Avaliação das características de CEM-TAF durante amplificação celular <i>in vitro</i> . 32	
4.3	Avaliação de parâmetros senescentes de CEM-TAF durante amplificação celular <i>in vitro</i>	34
5.	DISCUSSÃO	40
5.1	As células isoladas do tecido adiposo de felinos apresentam características de células estromais mesenquimais.	40
5.2	O potencial de proliferação e a capacidade clonogênica são reduzidos durante amplificação celular <i>in vitro</i>	41
5.3	A amplificação <i>in vitro</i> resulta em alterações morfológicas em CEM-TAF ao longo das passagens	43
5.4	As CEM-TAF submetidas à cultura de longo prazo apresentam alterações na fase do ciclo celular	46
5.5	As CEM-TAF submetidas à cultura de longo prazo apresentam instabilidade genética em passagens tardias.	48
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
7.	REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células estromais mesenquimais

As células estromais mesenquimais (CEM) são uma variedade de células-tronco não especializadas com capacidade de autorrenovação e diferenciação (WEBB, 2020). De maneira geral, podemos classificar as células-tronco em duas grandes classes: as embrionárias e as adultas. As células-tronco embrionárias são pluripotentes, dando origem às células de todo o organismo e possuem capacidade de se diferenciarem nas três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme). Por sua vez, as células-tronco adultas são encontradas em diversos tecidos onde contribuem para a manutenção da homeostase tecidual (GATTEGNO-HO; ARGYLE; ARGYLE, 2012). As CEM são um tipo de células-tronco multipotentes adultas e possuem capacidade de se diferenciarem em tecidos derivados da camada germinativa mesodérmica, como os tecidos ósseo, adiposo e cartilaginoso (DOMINICI et al., 2006; WEBB, 2020).

As CEM já foram isoladas de diversos tecidos adultos como medula óssea, tecido adiposo, tecidos dentários, pele, tecidos extraembrionários etc. (HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009; JEREMIAS et al., 2014; SALEHINEJAD; MOSHREFI; ESLAMINEJAD, 2020; WAGNER et al., 2005). Devido à heterogeneidade encontrada entre os tecidos, em 2006 a Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu um conjunto de critérios mínimos para especificação das CEM que incluem: (I) capacidade de proliferação e aderência ao plástico *in vitro*; (II) a presença de marcadores de superfície mesenquimal (CD44, CD73, CD90 e CD105) e ausência de marcadores hematopoiéticos (CD14, CD34 e CD45); (III) e a habilidade de diferenciação em fenótipos mesenquimais como adipócitos, condroblastos e osteoblastos (DOMINICI et al., 2006).

No organismo, as CEM são responsáveis por contribuir para a homeostase tecidual por meio de mecanismos que incluem a substituição de células danificadas e a secreção de fatores parácrinos (VIKARTOVSKA et al., 2020). Além da capacidade de substituir células locais danificadas, as CEM também podem agir recrutando outras células-tronco e estimulando a sua proliferação e diferenciação (GURTNER et al.,

2008). O seu efeito parácrino resulta na secreção de moléculas bioativas e vesículas extracelulares que agem modulando a atividade das células adjacentes (MARKOSKI, 2016). Por meio desses mecanismos, as CEM estimulam a angiogênese, reduzindo a inflamação e modulando o sistema imune (QUIMBY; BORJESSON, 2018).

Devido a isto, as CEM vêm se tornando muito atrativas como uma abordagem terapêutica para restauração de função em diversos tecidos. Além disso, as CEM apresentam a vantagem de não possuírem potencial tumorigênico. Sendo assim, cada vez mais visa-se entender os mecanismos pelos quais as CEM promovem a renovação dos tecidos tanto em organismos sadios quanto doentes (MARKOSKI, 2016).

1.2 Células estromais mesenquimais na medicina veterinária

Na medicina veterinária, nas últimas décadas, o cenário tem sido alterado de um espectro de doenças infecciosas para o de doenças crônicas, para as quais grande parte dos tratamentos existentes visam apenas o alívio dos sinais clínicos ao invés da cura (GATTEGNO-HO; ARGYLE; ARGYLE, 2012). Nesse sentido, muitas limitações foram observadas no manejo de doenças crônicas em diferentes espécies de animais, levantando a necessidade de estratégias terapêuticas alternativas para tratar doenças para as quais não existem terapias ou contra as quais as terapias existentes não são totalmente eficientes (WEBB, 2020). Neste contexto, as CEM emergiram como um campo de pesquisa inovador com potencial para aplicação na medicina veterinária regenerativa (QUIMBY; BORJESSON, 2018).

Enquanto em humanos a utilização das CEM ainda é majoritariamente experimental, na medicina veterinária um número relativamente grande de animais já foi tratado com essas células, contribuindo para o fornecimento de uma base substancial para avaliar a sua eficácia no tratamento de doenças (MARKOSKI, 2016). Nos últimos anos, o foco da utilização de CEM na medicina veterinária são os animais de companhia, principalmente cães e gatos, e os equinos (VOGA; KOVAČ; MAJDIC, 2021). Nesse contexto, as propriedades e a eficácia das CEM de cavalos e de cães estão melhor estabelecidas, e os trabalhos publicados têm como foco o tratamento de doenças como osteoartrite e lesões de ligamentos e tendões (Figura 1) (MARX; SILVEIRA; BEYER NARDI, 2015). Em contraste, as características das CEM de

felinos são pouco conhecidas e suas propriedades permanecem incertas (KIM et al., 2017).

1.3 Células estromais mesenquimais de felinos

As CEM de felinos foram isoladas e caracterizadas pela primeira vez em 2002, a partir da medula óssea (MARTIN et al., 2002). Posteriormente elas foram isoladas também do tecido adiposo (QUIMBY et al., 2011), tecidos fetais e membranas amnióticas (IACONO et al., 2012). No entanto, tem crescido o interesse principalmente pelas CEM derivadas do tecido adiposo (CEM-TA) devido à sua fácil obtenção e à abundância de células isoladas (WEBB; QUIMBY; DOW, 2012). As aplicações de CEM-TA de felinos (CEM-TAF) foram realizadas principalmente em quadros de doenças crônicas que debilitam seriamente a qualidade de vida do animal e para as quais não existem terapias eficientes como doença renal crônica, gengivoestomatite crônica, enteropatia crônica e asma crônica (Figura 1) (WEBB, 2020).

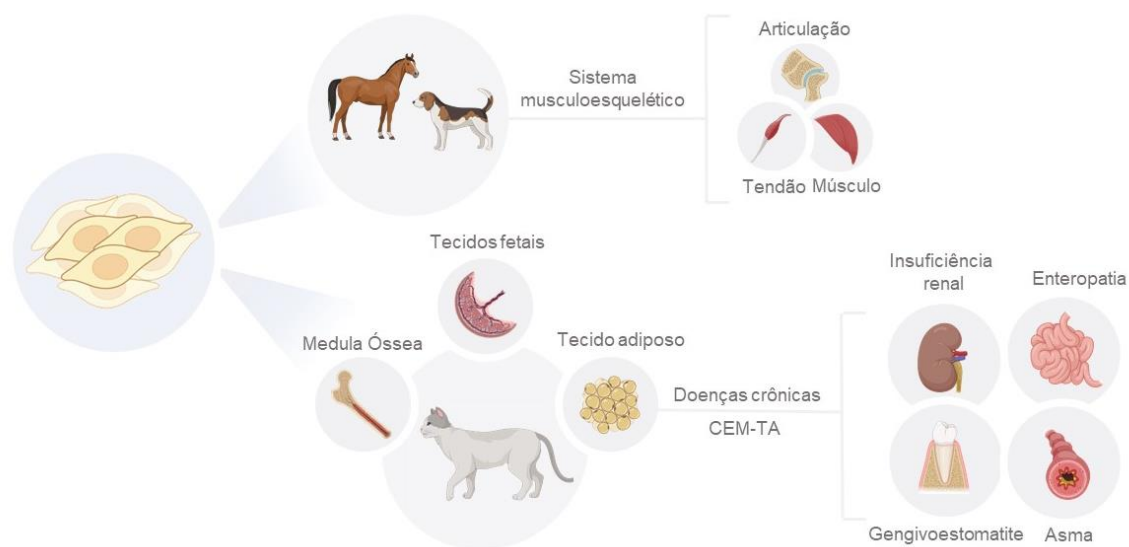
No tratamento de doença renal crônica, foi demonstrado que a aplicação de CEM-TA em felinos resultou em um alívio modesto dos sintomas com melhora na taxa de filtração glomerular e leve diminuição na concentração de creatinina sérica (QUIMBY et al., 2011). Em relação à gengivoestomatite crônica, os dados publicados demonstram que o tratamento com CEM-TA, tanto alogênica quanto autóloga, resultou em remissão clínica completa ou redução da gravidade da doença, e modulação imunológica na maioria dos pacientes tratados (ARZI et al., 2016). Apenas um trabalho publicado reporta o tratamento de enteropatia crônica com CEM-TA, no qual os tutores dos animais relataram melhora (acentuada ou modesta) dos sintomas (WEBB; WEBB, 2015). Os trabalhos relacionados à aplicação de CEM-TA no tratamento de asma crônica avaliaram apenas modelos induzidos experimentalmente demonstrando potencial efeito benéfico com redução dos sintomas da doença (TRZIL et al., 2016).

Embora a terapia utilizando CEM tenha grande potencial no tratamento de doenças felinas, ainda há muitas questões a serem respondidas quanto a logística da sua utilização. Diversos estudos em andamento têm procurado investigar uma via ideal de administração, a melhor fonte de isolamento de CEM-TAF, assim como também conhecer o impacto que o status do doador, como idade, sexo, peso etc.,

possui sobre a funcionalidade das células (QUIMBY; BORJESSON, 2018). Dessa forma, as propriedades dessas células não estão completamente estabelecidas, deixando em aberto a sua determinação (KIM et al., 2017). Além disso, ainda existem vários desafios decorrentes da sua aplicabilidade no tratamento de doenças (DEVIREDDY et al., 2017). Por exemplo, diferentes estudos discordam quanto à existência de efeitos adversos provenientes da aplicação de CEM-TA. Enquanto alguns autores relatam a sua ausência (QUIMBY et al., 2016; THOMSON et al., 2019; WEBB; WEBB, 2015), outros observam a sua presença por meio de vômitos, aumento da frequência respiratória e letargia transitória (PARYS et al., 2016; QUIMBY et al., 2013).

Sendo assim, com esses dados ainda controversos, surge a necessidade de um aprofundamento na pesquisa básica das CEM-TAF, contemplando estudos controlados de suas características e propriedades biológicas de forma a garantir a segurança da sua aplicação e a eficácia do tratamento (MARKOSKI, 2016).

Figura 1. Aplicação clínica das células estromais mesenquimais na medicina veterinária



Fonte: da autora

Na medicina veterinária as CEM surgiram como uma estratégia terapêutica alternativa para o tratamento de uma série de doenças. Atualmente, a sua aplicação clínica tem como foco principalmente os cães e cavalos, focada no tratamento de doenças do sistema musculoesquelético, no qual os resultados tem demonstrado efeito terapêutico positivo. Em felinos, as CEM já foram isoladas de tecidos como medula óssea, tecidos fetais e tecido adiposo. No entanto, tem crescido o

interesse principalmente nas CEM do tecido adiposo (CEM-TA), devido a sua fácil acessibilidade e a abundância de células isoladas. A aplicação clínica de CEM-TA tem como foco o tratamento de doenças crônicas, como insuficiência renal, enteropatia, gengivoestomatite e asma. De fato, o tratamento com CEM-TA nesses quadros clínicos demonstrou redução da gravidade das doenças e, em alguns casos, remissão completa dos sintomas.

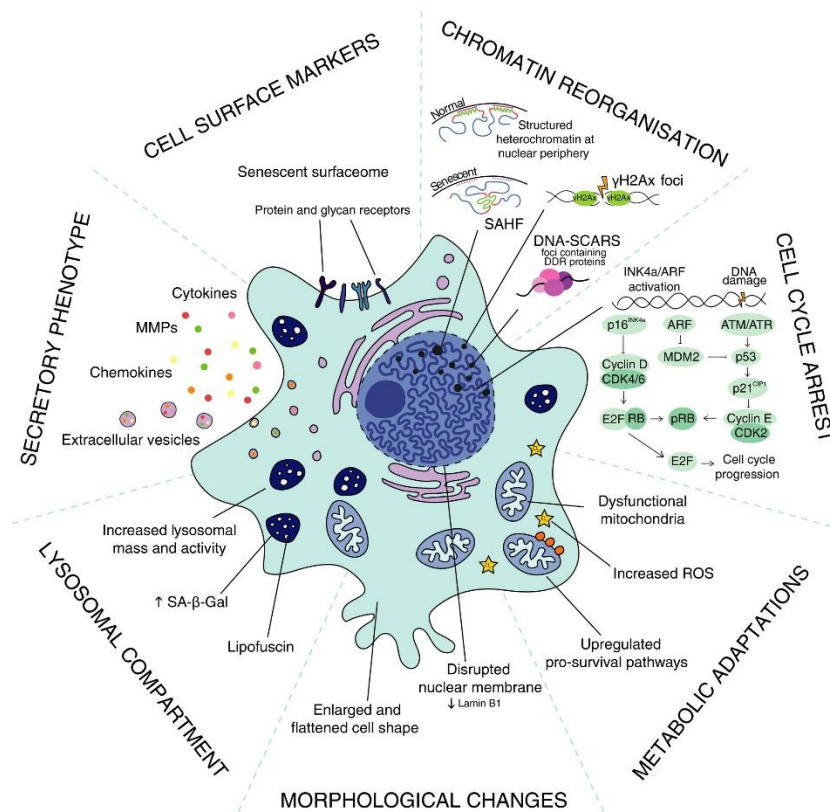
1.4 Senescência replicativa

As CEM são consideradas uma fonte com grande potencial para terapia celular regenerativa devido as suas características e propriedades. Para terapias bem-sucedidas, é necessário um número substancial de células, o qual é obtido por amplificação celular *in vitro*. Entretanto, a capacidade de proliferação das CEM é limitada, e a cultura de longo prazo pode provocar mudanças contínuas nessas células (TURINETTO; VITALE; GIACHINO, 2016).

A disponibilidade de células é alcançada por meio de passagens em série durante a cultura celular, ou seja, de sucessivas divisões celulares, resultando em duplicações da população (LIU et al., 2020). No entanto, embora as CEM tenham alta capacidade de proliferação após múltiplas divisões *in vitro*, estas células podem sofrer com a senescência replicativa (ZHOU et al., 2020). Em geral, esse fenômeno é ocasionado pelo encurtamento dos telômeros e acúmulo de danos ao DNA (LIU et al., 2020), o que compromete a integridade genética e as características das CEM, afetando as suas propriedades regenerativas e a sua segurança terapêutica (LI et al., 2017; LIU et al., 2020).

As CEM senescentes são caracterizadas por uma série de alterações celulares que incluem morfologia hipertrófica e achatada, declínio da capacidade proliferativa e clonogênica e aumento da atividade de β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal). Além disso, o estado senescente é caracterizado principalmente pela parada irreversível do ciclo celular e a expressão de fatores de fenótipo associado a senescência (SASP), que impulsiona respostas que reforçam a senescência de células autônomas e não autônomas (WENG et al., 2022). Além disso, outras características foram descritas, incluindo aumento de espécies reativas, disfunção mitocondrial, danos no DNA etc. (GONZÁLEZ-GUALDA et al., 2021) (Figura 2).

Figura 2. Características de senescência celular



Fonte: GONZÁLEZ-GUALDA et al. (2021)

As células senescentes apresentam uma série de alterações características, que são definidas como as marcas de senescência celular. Dentre essas alterações pode-se citar a parada do ciclo celular, impulsionada pela ação e cooperação das proteínas p16 e p21. Também é possível observar alterações e reorganização da cromatina, aumento do compartimento lisossômico, evidenciado pela superexpressão de SA-β-gal, e alterações morfológicas, demonstrando células hipertróficas e achatadas. Além disso, essas células também sofrem alterações metabólicas, caracterizadas por aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mitocôndrias disfuncionais. Essas células também apresentam uma forte secreção parácrina, denominada de fatores de fenótipo associado a senescência (SASP).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou os efeitos da amplificação *in vitro* prolongada nas CEM-TA de humanos e demonstrou a entrada das células em senescência replicativa em passagens tardias, principalmente a partir da décima quinta passagem. Os dados obtidos demonstraram que as CEM apresentaram capacidade proliferativa reduzida, perda de integridade genética, alterações morfológicas e células positivas para β-galactosidase, um marcador de senescência (DELBEN et al., 2021). Além disso, um trabalho recente também demonstrou diferenças nas propriedades proliferativas das CEM-TA em função de fatores relacionados à senescência cronológica dos felinos, em que animais idosos

apresentaram capacidade proliferativa inicial prejudicada em comparação com gatos jovens (ZAJIC et al., 2017). Esses dados sugerem que existe uma influência da intensa replicação celular na indução do perfil senescente das CEM-TA.

Em felinos, de acordo com a revisão bibliográfica realizada neste trabalho, apenas dois artigos têm como foco a análise do impacto da amplificação *in vitro* nas características das CEM-TA (LEE et al., 2018; PANASOPHONKUL et al., 2017). Os resultados obtidos por Lee et al. (2018) demonstraram que a taxa de proliferação celular, o nível de expressão de marcadores de pluripotência e de marcadores de superfície, e a capacidade de diferenciação em fenótipos mesenquimais diminuíram ao longo das passagens em série em CEM-TAF. Foi observado também um aumento na porcentagem de células com atividade positiva de β -galactosidase ao longo das passagens durante o cultivo celular (LEE et al., 2018). Panasophonkul et al. (2017) observou que, com o aumento do número de passagens, houve uma diminuição da eficiência na formação de colônias das CEM-TAF e também uma diminuição no nível da expressão dos marcadores de superfície (PANASOPHONKUL et al., 2017). Além disso, em alguns resultados preliminares do nosso grupo foi observado que as CEM-TAF proliferam menos e entram em senescência mais rapidamente em comparação com as células de cachorros.

De acordo com os trabalhos apresentados aqui, fica claro que o uso adequado de CEM para aplicação clínica requer uma compreensão geral do seu processo de envelhecimento, sendo necessário estabelecer métodos que permitam a geração de grandes populações de células sem que estes ocasionem alterações nas suas propriedades (LI et al., 2017). No entanto, como relatado, existem poucos estudos e resultados analisando profundamente e especificamente o impacto da amplificação celular *in vitro* prolongada nas propriedades das CEM-TAF. Dessa forma, o foco deste trabalho foi analisar parâmetros de senescência das CEM-TAF durante a amplificação *in vitro*.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da amplificação celular *in vitro* sobre as propriedades e características das CEM-TA.

2.1 Objetivos específicos

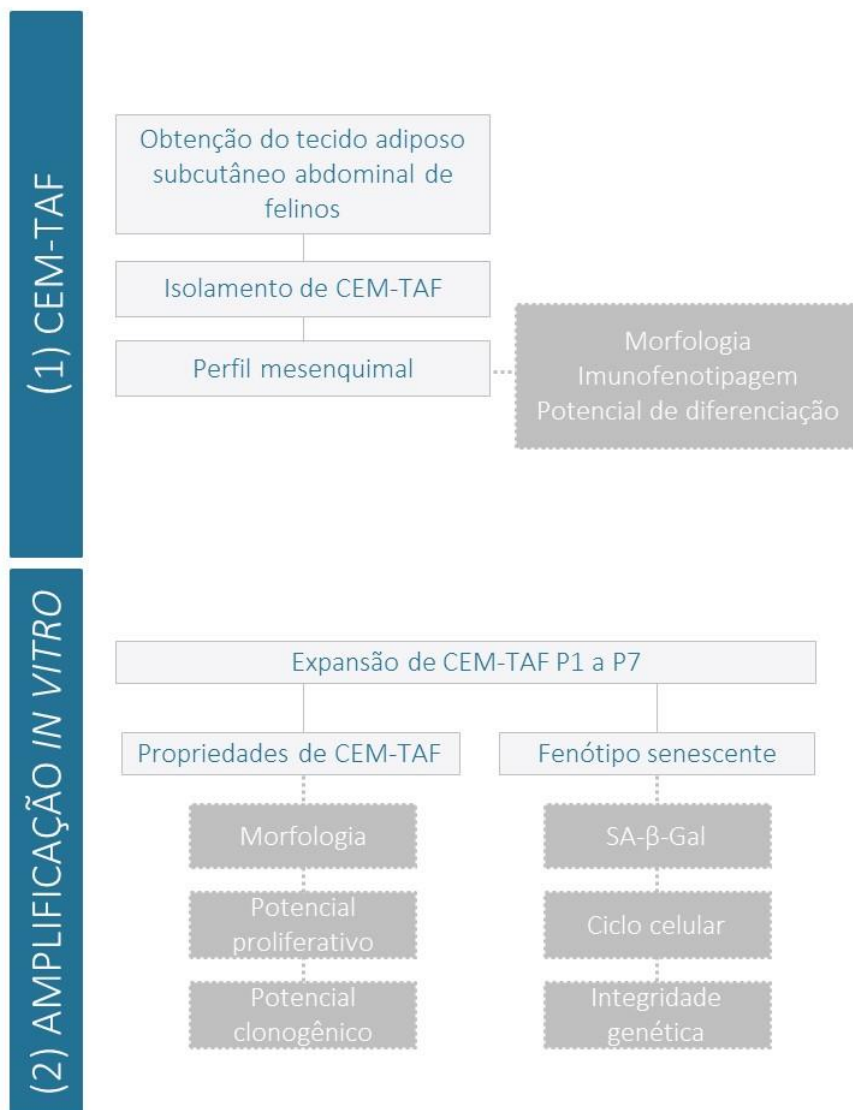
1. Caracterizar as CEM-TAF de felinos quanto ao perfil mesenquimal, analisando características morfológicas, perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais.
2. Avaliar características morfológicas, a capacidade proliferativa e o potencial clonogênico das CEM-TAF durante amplificação celular *in vitro*.
3. Analisar características de senescência replicativa das CEM-TAF durante amplificação celular *in vitro*, avaliando a integridade genética, o ciclo celular e detecção de β -galactosidase associada à senescência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

O desenho experimental foi dividido em duas etapas, conforme esquematizado na Figura 3: (1) Obtenção de CEM-TAF e (2) Processo de amplificação *in vitro*. (1) Foi obtido o tecido adiposo subcutâneo abdominal de felinos, do qual foram isoladas as CEM-TAF (item 3.3). Após isolamento e expansão, as células foram caracterizadas quanto ao seu perfil mesenquimal, por meio de análises de morfologia, imunofenotipagem e potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais (item 3.6.1 e 3.6.2). (2) As CEM-TAF foram submetidas ao processo de amplificação *in vitro*, por meio do seu cultivo de passagem 1 a passagem 7 (item 3.4). Durante as passagens, foi analisado o efeito da amplificação *in vitro* sobre as propriedades de CEM-TAF, por meio da análise de morfologia (item 3.6.1), potencial de proliferação (item 3.8) e potencial clonogênico (item 3.9). Além disso, também foi analisado a ocorrência de um fenótipo senescente, por meio das análises da atividade de SA- β -gal (item 3.10), progressão do ciclo celular por marcação de iodeto de propídeo (item 3.11), e integridade genética por análise de alterações nucleares a nível cromossômico (item 3.12).

Figura 3. Desenho experimental



CEM-TAF: células estromais mesenquimais do tecido adiposo de felinos; P1/P7: passagem 1/passagem 7; SA-β-Gal: β-galactosidase associada à senescência (do inglês *senescence-associated beta-galactosidase*).

3.2 Obtenção das CEM do tecido adiposo felino

Fragments de tecido adiposo da região subcutânea abdominal foram obtidos de cirurgia de castração (ovarioalpingohisterectomia) de 3 doadores fêmeas (9 e 12 meses), sem raça definida (*Felis catus*), coletadas na Diretoria de Bem-estar Animal (DIBEA) e no Hospital Veterinário Santa Vida de Florianópolis mediante apresentação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos tutores dos animais. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por cirurgiã veterinária. Os protocolos

foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), sob o parecer número 1852210519.

Fragments de tecido adiposo com cerca de 1,5g foram lavados em PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) (NaCl, 8 g/L; KCl, 0,09 g/L; KH₂PO₄, 0,4 g/L; Na₂HPO₄, 3 g/L), acrescido de 1% de solução de antibiótico contendo penicilina (200 U/mL) e estreptomicina (10 µg/mL) (PS). A seguir, o tecido foi armazenado em recipiente estéril contendo *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 0,5% de solução de antibiótico e transportado ao Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT/UFSC) para posterior processamento e isolamento das CEM-TA.

3.3 Isolamento e cultivo das CEM-TAF

As CEM-TAF foram isoladas e cultivadas seguindo o protocolo previamente estabelecido para as CEM derivadas do tecido adiposo subcutâneo, com algumas modificações (ZOMER et al., 2019). Inicialmente foi realizada a dissociação mecânica, onde o tecido adiposo foi lavado com PBS e fragmentado manualmente em pedaços menores com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica. A seguir, foi realizada a dissociação enzimática, onde os pequenos fragmentos de tecido foram incubados com Colagenase tipo I (2 mg/mL) por 60 minutos a 37°C, com agitação do conteúdo a cada 10 minutos.

Após o período de incubação, a ação enzimática foi neutralizada pela adição de meio de cultura completo consistindo de DMEM acrescido 0,5% de PS e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Em seguida as células foram centrifugadas a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em meio de cultivo. A suspensão de células foi filtrada em *Cell Strainer* com poros de 40µm, para remover os fragmentos não dissociados. Por fim, as células foram plaqueadas na densidade de 5x10³/cm² em garrafas de cultivo de 25cm², constituindo a passagem 0 (P0).

Após 24 horas o meio de cultura foi descartado para remoção de células não aderentes, e um meio fresco foi adicionado às células. Então, as células foram mantidas em meio de cultura completo sob condições controladas de cultivo em estufa celular a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Foi realizada a troca do meio de cultura a cada 2-3 dias.

3.4 Expansão das CEM-TAF

As culturas foram acompanhadas por meio de microscópio invertido de contraste de fase (Olympus CK40) diariamente até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Ao atingirem a confluência estabelecida, que levou em média uma semana, as células foram expandidas. Para tanto, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas cuidadosamente em PBS. A seguir, as CEM-TAF foram descoladas da placa de cultivo através da incubação com solução de 0,25% de tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37°C. A ação da tripsina foi neutralizada pela adição de meio de cultura completo e as células foram centrifugadas a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em meio de cultura. Uma alíquota de 20 µL da suspensão de células foi corada com corante Azul de Tripán para análise de viabilidade e contadas em câmara de Neubauer. Por fim, as células foram plaqueadas na densidade de $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ em garrafas de cultivo de 25cm^2 , constituindo a passagem 1 (P1).

No dia seguinte ao plaqueamento as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi substituído por um meio fresco. As células aderentes foram mantidas em meio de cultura completo sob condições controladas como descrito no item 1.2. Após nova confluência, o procedimento foi repetido para originar a passagem 2 (P2) e assim sucessivamente até a passagem 7 (P7).

3.5 Criopreservação

As CEM-TAF foram criopreservadas em P0 e P1 para posterior utilização em experimentos. Para tanto, monocamadas de 80% de confluência foram dissociadas utilizando tripsina/EDTA, centrifugadas e as células foram ressuspensionadas em meio de cultura completo, como descrito no item 3.3, e quantificadas com o auxílio de câmara de Neubauer. A seguir, 1×10^6 células foram distribuídas em criotubos contendo meio de congelamento composto de 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), que foram armazenados em caixas térmicas (*CoolCell® Cell Freezing Container*) em ultrafreezer -80°C por 24 horas. Após esse período, os criotubos foram transferidos para nitrogênio líquido e armazenados até a realização dos experimentos.

3.6 Descongelamento das CEM-TAF

Amostras de CEM-TAF criopreservadas em P0 e P1 foram descongeladas em meio de cultura completo e centrifugadas a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em meio de cultura. As CEM-TAF foram coradas com Azul de Tripán e contadas na câmara de Neubauer. A seguir, as células foram plaqueadas na densidade de $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ em garrafas de cultivo de 25cm^2 , ou distribuídas em placas de cultivo de células de 6 ou 24 poços para dar continuidade aos experimentos, como descrito nos próximos itens.

No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultivo foi trocado. As células foram mantidas em meio de cultivo completo sob condições ótimas controladas de cultivo celular, em estufa celular a 37°C , 95% de umidade e 5% de CO_2 .

3.7 Caracterização das CEM-TAF

As CEM-TAF foram caracterizadas segundo os critérios mínimos de caracterização determinados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (DOMINICI et al., 2006), que levam em consideração a capacidade de aderência ao plástico, formação de colônia fibroblastóide, diferenciação de fenótipos mesenquimais e presença de marcadores de superfície mesenquimal.

3.6.1 Morfologia celular e potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais

As culturas celulares foram analisadas quanto à sua morfologia alongada e fusiforme e a sua capacidade de adesão ao plástico da placa de cultivo por meio de microscópio invertido de contraste de fase ao longo de P1-P7 (Olympus CK40).

Para análise do potencial de diferenciação adipogênico, culturas de CEM-TAF em P3 foram cultivadas em placas de 24 poços numa densidade de 4×10^3 células por poço em meio comercial indutivo *StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit* (Thermo Fisher Scientific, A10070-01), conforme as orientações do fabricante. Como controle, as células foram cultivadas em meio completo. As culturas foram mantidas sob condições controladas em estufa celular a 37°C , 95% de umidade e com 5% de CO_2 ,

com troca de meio a cada 4-3 dias. Após 20 dias, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído durante 30 minutos e coradas com *Oil Red O* para visualização de lipídeos e identificação dos adipócitos.

Foi avaliado ainda o potencial de diferenciação osteogênica. Para tanto, culturas de CEM-TAF em P3 foram cultivadas em placas de 24 poços numa densidade de 4×10^3 células por poço em meio comercial indutivo *StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit* (Thermo Fisher Scientific, A10072-01), conforme as orientações do fabricante. Como controle, as células foram cultivadas em meio completo. As culturas foram mantidas sob condições controladas em estufa celular a 37°C, 95% de umidade e com 5% de CO₂, com troca de meio a cada 4-3 dias. Após 20 dias, as células foram então fixadas com 4% de paraformaldeído durante 30 minutos e coradas com *Alizarin Red* para visualização de depósito de cálcio extracelular e identificação dos osteócitos.

3.6.2 Citometria de fluxo

Foi realizado citometria de fluxo para análise de expressão positiva de marcadores de superfície mesenquimal CD90, CD105 e CD73 e expressão negativa de marcadores hematopoiéticos (CD34 e CD45), conforme descrito previamente (JEREMIAS et al., 2014). Para tanto, CEM-TAF em P3 foram cultivadas em placas de 25 cm² até atingirem confluência de 80%. A seguir foram tripsinizadas como descrito no item 3.3 e ressuspensas em solução gelada de PBS acrescido de 10% SFB. As amostras foram transferidas para um tubo de citometria na densidade de 1×10^6 células/mL. As células em suspensão foram incubadas com anticorpos conjugados a diferentes fluoróforos (BD Bioscience) durante 1h a 4°C na ausência de luz, conforme especificado na Tabela 1.

Após a incubação, as células foram lavadas por centrifugação (300 g, 5 minutos) uma vez com solução de PBS acrescido de 10% de SFB e ressuspensas na mesma solução. As células foram então fixadas com 4% de paraformaldeído por 10 minutos e, subsequentemente, lavadas por centrifugação (300g, 5 minutos) e ressuspensas em solução de PBS acrescido de 10% de SFB. Por fim, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Scalibur (BD, Bioscience), disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB, UFSC). Os dados resultantes foram analisados no *software Flowing* (Turku Centre for Biotechnology).

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados na citometria de fluxo

Anticorpo	Imunoglobina	Fluorocromo	Objetivo
Anti-CD45 (BD)	IgG1 de camundongo	FITC	Marcador hematopoiético
Anti-CD34 (BD)	IgG1 de camundongo	PE-Cy5	Marcador hematopoiético
Anti-CD73 (BD)	IgG1 de camundongo	PE-Cy5	Marcador mesenquimal
Anti-CD105 (BD)	IgG1 de camundongo	PerCP	Marcador mesenquimal
Anti-CD90 (BD)	IgG1 de camundongo	FITC	Marcador mesenquimal

Abreviações: FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE-Cy5: ficoeritrina-cianina; PerCP: proteína peridínina-clorofila.

3.8 Potencial clonogênico

A capacidade clonogênica das CEM-TAF foi analisada pelo ensaio de unidades formadoras de colônias (CFU, do inglês *colony-forming unit*) (DELBEN et al., 2021). Para isto, as células (P1-P5) foram cultivadas na densidade de 5×10^2 em placas de 6 poços com meio completo por um período de 14 dias. As células foram mantidas em meio de cultivo completo sob condições controladas em estufa celular a 37°C, 95% de umidade e com 5% de CO₂, com troca de meio a cada 4-3 dias. Após 14 dias, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 30 minutos e coradas com 2% de cristal violeta por 10 minutos. As colônias foram fotografadas em microscópio estereoscópico (Olympus SZ61) em faixa de ampliação de 1,6x, e analisadas quanto ao número de colônias e a área das colônias com o auxílio do Software ImageJ (NIH). A eficiência clonal foi calculada pela proporção do número de colônias geradas em relação ao número de células plaqueadas.

3.9 *Cumulative population doubling level (CPDL) e tempo de duplicação (CDT) das CEM-TAF*

O potencial de proliferação das CEM-TAF foi analisado pelo cálculo de CPDL, para avaliar o número de vezes que a população inicial dobrou em cada dia de cultivo, conforme descrito anteriormente com algumas modificações (BAHN et al., 2012). Para isso, as CEM-TAF (P1-P7) foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células por poço em uma placa de 24 poços, em meio de cultivo completo. A cada 24 horas as células foram tripsinizadas de dois poços de forma independente e, em seguida, foram quantificadas utilizando a câmara de Neubauer. O número de células por poço foi contado diariamente, até o período de 120 horas. O CDT e o CPDL foram calculados de acordo com as equações

$$CDT = \frac{T \times \log(2)}{\log(Nf) \times \log(Ni)} \quad (\text{ROTH, 2006}),$$

$$CPDL = PDL0 + 3,32 \times (\log Nf - \log Ni)$$

(CORIELL INSTITUTE, 2021).

Onde:

T = tempo de cultivo

Nf = número final de células (120 horas)

Ni = número inicial de células (24 horas)

PDL0 = PDL da população inicial

3.10 **Detecção de SA-β-gal**

O ensaio de SA-β-gal foi utilizado para avaliar células em senescência. Para tanto, as CEM-TAF foram cultivadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^3 células por poço (P1, P3, P5 e P7), e mantidas em meio de cultura completo até atingirem uma confluência de 60%. Após atingirem a confluência determinada, as células foram analisadas para presença de β-galactosidase (β-gal) utilizando o *beta Galactosidase Staining Kit* (Abcam, ab102534), de acordo com as instruções do

fabricante. Para isso, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS. A seguir, as CEM-TAF foram fixadas com solução fixadora por 10 minutos, lavadas com PBS novamente e incubadas com solução de coloração para β -gal por 24h em estufa úmida a 37°C. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas em PBS e fotografadas em microscópio invertido de contraste de fase (Olympus IX83), disponível no LAMEB. O número de células positivas para β -gal em pelo menos 100 células foi contado em campos aleatórios em cada um dos poços em duplicata.

3.10 Análise de ciclo celular

Durante o ciclo celular é possível identificar quatro fases diferentes: G1, S, G2 e M, as quais podem ser distinguidas pelo conteúdo de DNA, com exceção de M e G2, que possuem a mesma quantidade. Sendo assim, para avaliar as fases do ciclo celular ao longo das passagens (P1, P3, P5 e P7) foi utilizado a marcação de iodeto de propídeo, um composto capaz de se ligar ao DNA da célula. Por meio dessa análise é possível analisar o conteúdo de DNA e sua distribuição nas fases do ciclo celular. O ensaio de ciclo celular com iodeto de propídeo foi analisado utilizando o kit FxCycle PI/RNase (Abcam - ab113851), conforme as instruções do fabricante. Para realização deste ensaio, CEM-TAF foram cultivadas em placas de 25 cm² até atingirem confluência de 80%, a seguir foram tripsinizadas como descrito no item 1.3 e ressuspensas em meio de cultura completo. As células então foram transferidas para um tubo de citometria na densidade de 2×10^5 e lavadas por centrifugação (300g, 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado e fixado em 70% de etanol por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas por centrifugação (300g, 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado em solução de iodeto de propídeo com RNase por 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. Após o tempo de incubação, as amostras foram lavadas por centrifugação (300g, 5 minutos) e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACS Scalibur (BD, Bioscience), disponível no LAMEB. A fluorescência gerada pelo iodeto de propídeo é proporcional a quantidade de DNA nas células, determinando assim a sua fase no ciclo celular. Os dados resultantes foram analisados no *software Flowing* (Turku Centre for Biotechnology).

3.11 Ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese

Para avaliar a estabilidade nuclear das células ao longo das passagens, foram analisadas alterações nucleares por meio do ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN, do inglês *cytokinesis-block micronucleus*), segundo o protocolo previamente estabelecido (CORNÉLIO et al., 2014). Para isso, as CEM-TAF foram semeadas em placas de 25 cm² na densidade de 8x10⁴ células (P1-P7) e cultivadas em meio de cultura completo até atingirem a confluência de 80%. Em seguida, o meio de cultivo foi descartado e um meio de cultivo fresco contendo 4µg/mL de citocalasina B foi adicionado às células por 24 horas.

Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS, e as monocamadas de células foram dissociadas com tripsina/EDTA. As células, juntamente com o meio de cultura contendo citocalasina B e o PBS utilizado para lavagem das placas, foram coletadas e centrifugadas a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido, deixando apenas 100µL sobre o pellet celular, no qual foi ressuspensionado. Então, as CEM-TAF foram incubadas em solução hipotônica em temperatura ambiente (0,075M KCl e solução de 9 água destilada: 1 SFB) por 3 minutos. A seguir, a hipotonização foi interrompida pela adição de solução fixadora (9 metanol:1 ácido acético) gelada a -20°C, e o material foi centrifugado a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido, e o pellet foi ressuspensionado em 2 mL de solução fixadora.

A seguir, as CEM-TAF foram centrifugadas novamente a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensionadas em 100µL da solução fixadora. Por fim, 25µL dessa suspensão celular foram distribuídas em lâminas histológicas, mantidas em vapor de água (40°C) por 10s e levadas para estufa de calor seco (60°C) por 30 minutos. As lâminas foram coradas com Giemsa 0,05% por um período de 8 minutos. O ensaio foi realizado em triplicatas técnicas para cada animal e foram analisadas com o auxílio de um microscópio de campo claro (Olympus BX41). Foram quantificadas 600 células binucleadas por lâmina, totalizando 1800 células por doadora. As células foram analisadas quanto à presença das seguintes alterações nucleares: ponte nucleoplasmática, alteração nuclear associada ao reparo incorreto da fita de DNA e/ou fusão das extremidades dos telômeros; broto nuclear, um marcador de amplificação gênica e/ou eliminação dos complexos de reparo do

DNA; micronúcleo, uma indicação de quebra ou perda de cromossomos; e células apoptóticas.

3.12 Análises estatísticas

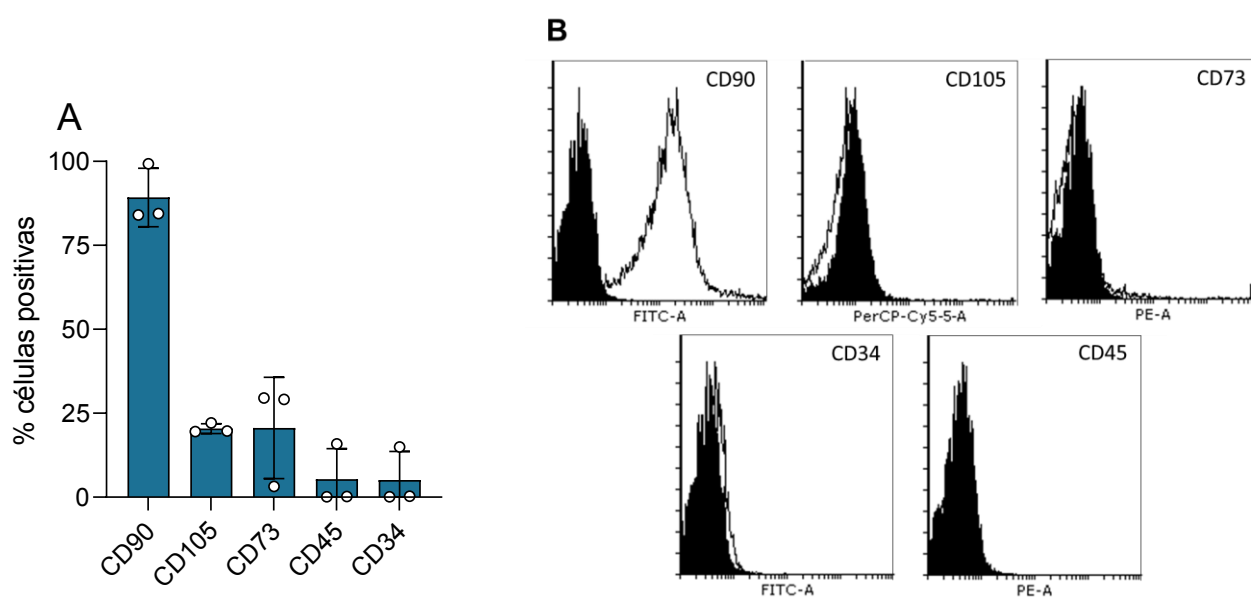
As análises estatísticas foram realizadas por meio do Software *GraphPad Prism*® 9. A normalidade dos dados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk. Os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão. Dados paramétricos foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni, para múltiplas comparações. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do perfil mesenquimal das CEM-TAF

As CEM-TAF foram caracterizadas de acordo com os critérios estabelecidos pela ISCT (DOMINICI et al., 2006). Para isso, as células em P3 foram analisadas quanto a capacidade de aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide (Figura 6), ao perfil de marcadores de superfície celular (Figura 4A e 4B) e o potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais *in vitro* (Figura 4). As análises de microscopia de contraste de fase demonstraram que as CEM-TAF são aderentes à superfície plástica em condições de cultivo padrão e apresentaram morfologia fusiforme e alongada, semelhante a fibroblastos (P1-P3) (Figura 6). Os resultados de imunofenotipagem revelaram que 89,27% das CEM-TAF foram positivas para o marcador mesenquimal CD90. Em contrapartida, os marcadores de superfície mesenquimal CD105 e CD73 demonstraram baixa porcentagem de expressão, com valores de 20,45% e 20,64%, respectivamente. Além disso, foi constatado apenas 5% de células positivas para os marcadores hematopoiéticos CD45 e CD34 (Figura 4A e 4B).

Figura 4. Caracterização do perfil mesenquimal de CEM-TAF.



(A) Gráfico de porcentagem do perfil imunofenotípico das CEM-TAF e (B) histogramas representativos, demonstrando marcadores de superfície de CEM (CD90, CD105 e CD73) e de

células hematopoiéticas (CD45 e CD34). Pico preto: Emissão de amostras não tratadas com fluorocromo. Pico branco: Emissão de amostras tratadas com fluorocromo (FITC, PE e PerCP-Cy5).

O potencial de diferenciação para fenótipos mesenquimal das CEM-TAF foi analisado por meio da sua indução à adipogênese e osteogênese. Como demonstrado na Figura 5A, quando cultivadas em meio indutivo adipogênico, as células apresentaram acúmulo de vesículas lipídicas, visualizado pelas gotas lipídicas coradas em vermelho. As CEM-TAF também apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica quando cultivadas em meio indutivo osteogênico, evidenciado pela presença de matriz extracelular calcificada (Figura 5B). Em conjunto, esses resultados demonstram que as células isoladas do tecido adiposo de felinos apresentaram características fenotípicas básicas de CEM como estabelecido pela ISCT.

Figura 5. Potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais de CEM-TAF

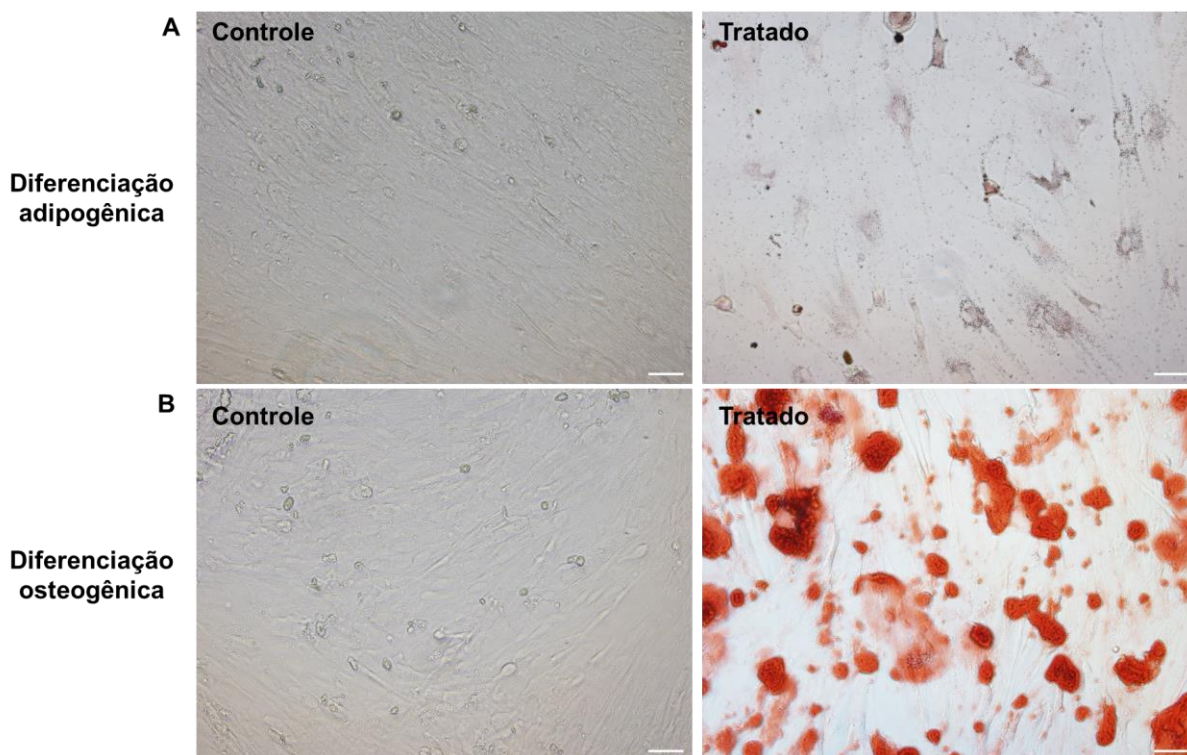


Imagem representativa de microscopia de contraste de fase demonstrando (A) diferenciação adipogênica visualizada pela coloração de gotículas lipídicas com *Oil red*, e (B) diferenciação

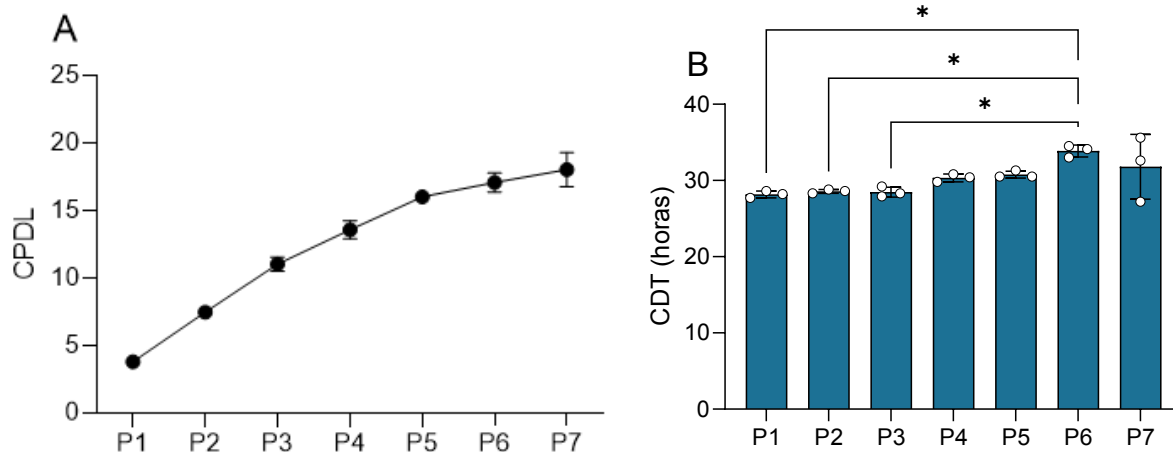
osteogênica visualizada pela coloração de matriz extracelular de cálcio com *Alizarin red*. Escala: 50 μm

4.2 Avaliação das características de CEM-TAF durante amplificação celular *in vitro*.

A seguir, foi avaliado o efeito da amplificação celular *in vitro* sobre as características das CEM-TAF. Para tanto, as células foram cultivadas de P1 a P7 e analisadas quanto a capacidade proliferativa e clonogênica. A capacidade proliferativa das CEM-TAF foi avaliada por meio do índice cumulativo de duplicação da população (CPDL, do inglês *cumulative population doubling level*) e tempo de duplicação da população (CDT, do inglês *cumulative doubling time*) (Figura 6A e 6B).

Como observado pela Figura 6A, a curva de CPDL das CEM-TAF revelou uma tendência de diminuição na taxa de proliferação acompanhada do aumento de passagens a partir de P5. De P5 para P6 e P7 houve um aumento pequeno no CPDL quando comparada ao aumento das passagens anteriores. Os valores individuais de CPDL para cada passagem foram: P1 ($3,80 \pm 0,23$), P2 ($7,49 \pm 0,15$), P3 ($11,02 \pm 0,53$), P4 ($13,56 \pm 0,68$), P5 ($16,01 \pm 0,50$), P6 ($17,07 \pm 0,70$) e P7 ($18,03 \pm 1,27$). Em concordância com os resultados de CPDL, os valores CDT apresentam uma tendência a aumentar a partir de P4, com aumento significativo em P6 ($36,86 \pm 0,77\text{h}$) em comparação com P1 ($28,16 \pm 0,45\text{h}$), P2 ($28,56 \pm 0,25\text{h}$) e P3 ($28,46 \pm 0,66\text{h}$) (Figura 6B). Esses resultados sugerem que as CEM-TAF começam a perder o seu potencial proliferativo em P4 ou P5, indicando que o cultivo de longo prazo resulta em uma baixa atividade proliferativa.

Figura 6. Potencial de proliferação de CEM-TAF cultivada de P1 a P7.

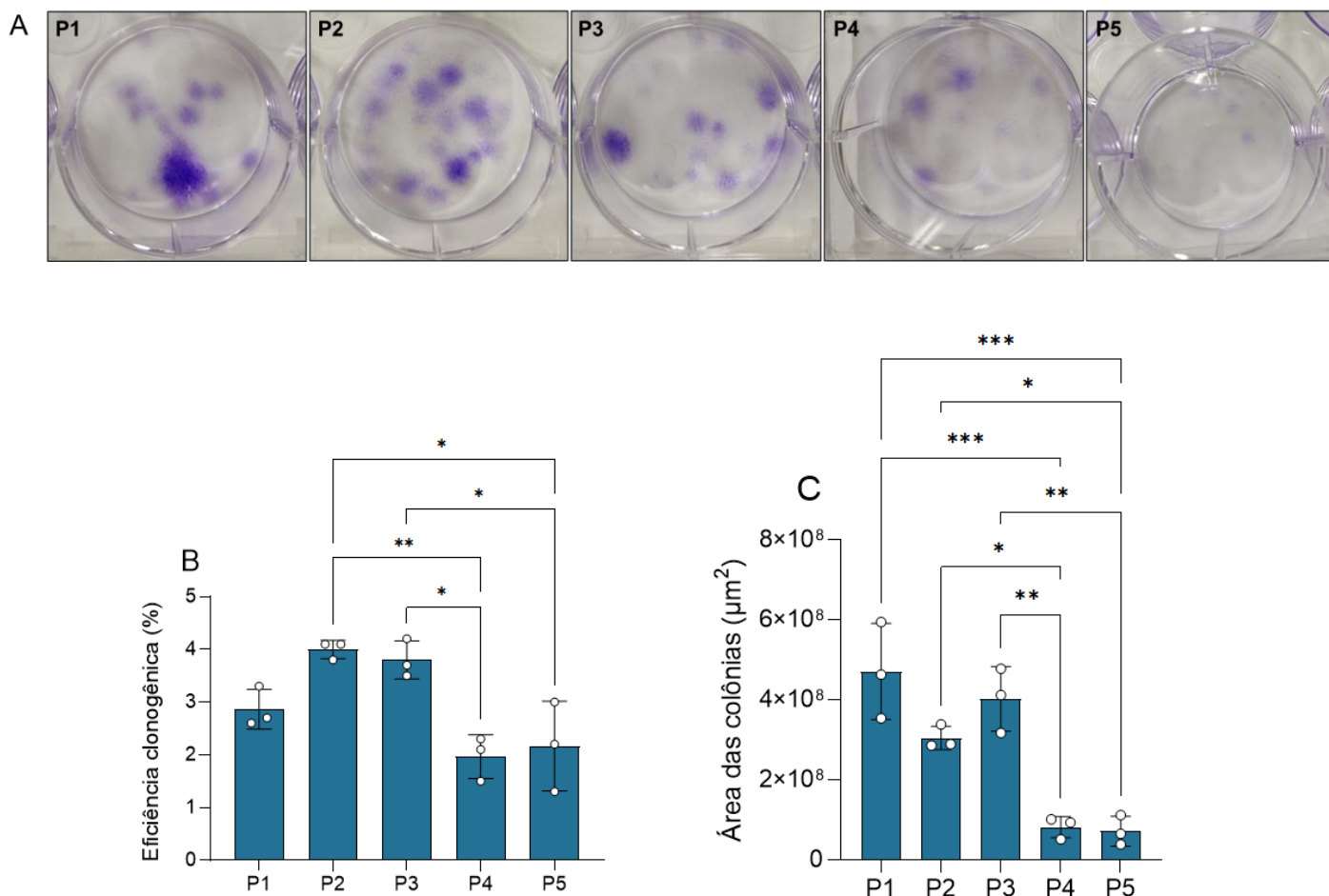


(A) Índice cumulativo do nível de duplicação da população (CPDL, do inglês *cumulative population doubling level*) (B) Tempo de duplicação da população (CDT, do inglês *cell doubling time*). A comparação entre as passagens foi analisada por ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni. As barras representam média \pm desvio padrão de triplicata biológica e duplicata técnica.

Os efeitos da amplificação celular *in vitro* sobre a proliferação celular e autorrenovação das CEM-TAF também foram analisados por meio da sua capacidade clonogênica, que investiga a capacidade das células de formarem colônias (Figura 7). Em P1 os resultados demonstraram células com eficiência clonal em crescimento, de 2,8% em P1, 4% e 3,8% em P2 e P3, respectivamente. Em contrapartida, em passagens subsequentes as células apresentaram decaimento na eficiência clonal quando comparado a P2 e P3, sendo a porcentagem de eficiência clonal de 1,9% em P4 e 2,1% em P5 (Figura 7A e 7B).

Em concordância com esses resultados, também foi observado diminuição na área das colônias em P4 e P5 em comparação a P1, P2 e P3 (Figura 7C). Enquanto em P1, P2 e P3 as colônias de células apresentaram área de $4,7 \times 10^8 \mu\text{m}^2$, $3 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ e $4 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ respectivamente, em P4 a área observada foi de $0,8 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ e em P5 de $0,7 \times 10^8 \mu\text{m}^2$. Além disso, qualitativamente também foi observado mais colônias com menor densidade de células ao longo das passagens, como demonstrado na Figura 7A. Esses dados demonstram que o cultivo de CEM-TAF por longos períodos reduz a capacidade de formação e o tamanho das colônias, dados indicativos de envelhecimento celular.

Figura 7. Eficiência clonal de CEM-TAF durante amplificação celular *in vitro*.



(A) Imagem representativa do ensaio clonogênico na placa de cultivo celular durante as passagens P1 a P5. Os aglomerados corados em roxo representam colônias celulares. (B) Relação entre o número de células semeadas e o número de colônias observadas, relatando a eficiência clonal das CEM-TAF. (C) Quantificação da área (μm^2) das colônias formadas. A comparação entre as passagens foi analisada por ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). As barras representam média \pm desvio padrão de triplicata biológica e técnica.

4.3 Avaliação de parâmetros senescentes de CEM-TAF durante amplificação celular *in vitro*.

Devido ao indício de características senescentes observado nas CEM-TAF pela redução da capacidade proliferativa e da capacidade de formação de colônias, a seguir foi analisado o efeito da amplificação celular *in vitro* sobre parâmetros senescentes.

Alterações morfológicas são aspectos característicos do fenótipo senescente. Como observado na Figura 8, as CEM-TAF mantiveram um tamanho uniforme até P3, apresentando células com morfologia alongada e fusiforme típica de CEM. No entanto, a partir da P4 foi observado alterações na estrutura das células, que passaram a apresentar uma morfologia hipertrófica e achatada, característica que se manteve nas passagens subsequentes (P5, P6 e P7). Além disso, foi observado uma menor confluência celular a partir de P5, dados que corroboram com a diminuição do perfil proliferativo e do potencial clonogênico (Figura 8).

Figura 8. Alteração morfológica em CEM-TAF submetidas à amplificação *in vitro*.

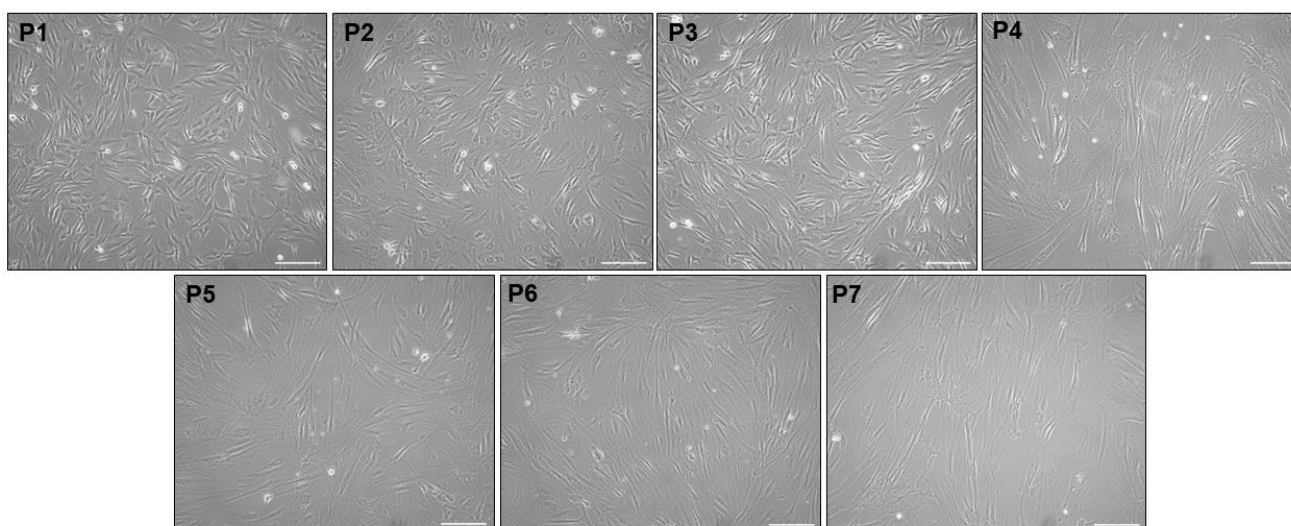


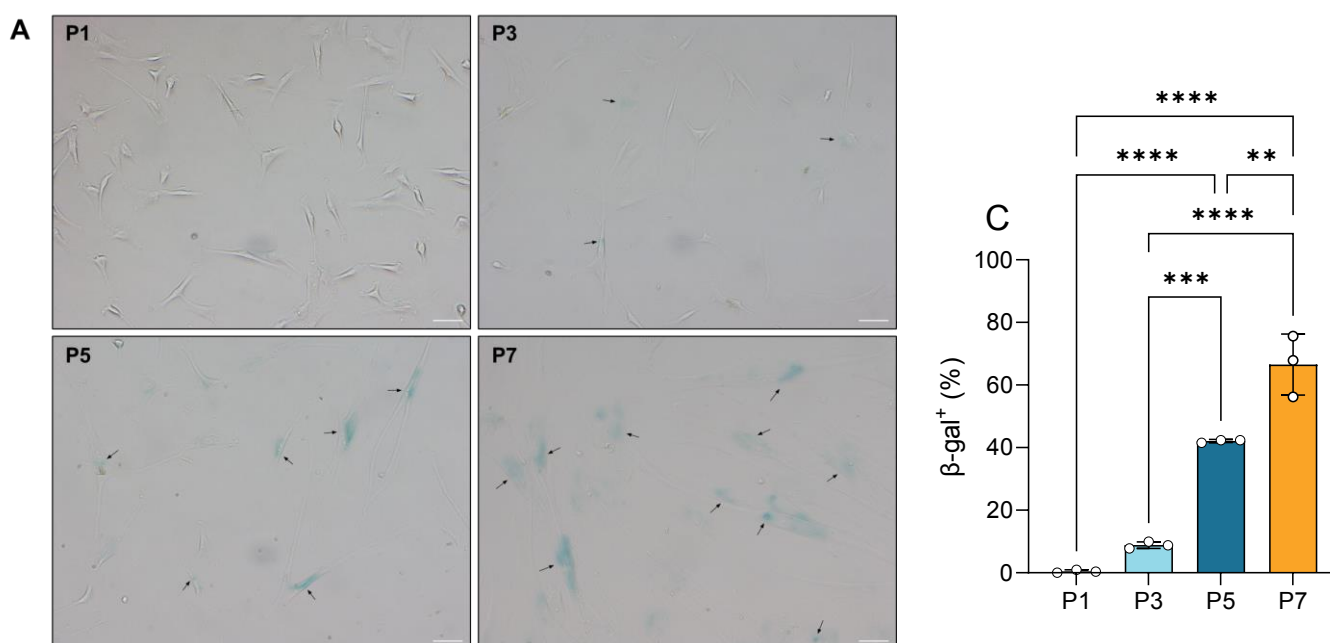
Imagem representativa de contraste de fase das CEM-TAF, evidenciando as alterações morfológicas das células ao longo do cultivo celular. Escala: 200 μ m

Para avaliar mais a fundo a senescência das CEM-TAF, foram quantificadas células positivamente coradas para β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal, do inglês *senescence-associated beta-galactosidase*), um biomarcador de senescência celular (Figura 9). Os resultados demonstraram que houve aumento na porcentagem de células positivas para coloração azulada de SA- β -gal ao longo das passagens. Nas passagens P1 e P3 foi observado uma baixa porcentagem de células que exibiram coloração para SA- β -gal, de $0,44 \pm 0,5\%$ e $8,83 \pm 1,0\%$ respectivamente. Por outro lado, nas passagens subsequentes é possível observar um aumento significativo na porcentagem de células positivas para SA- β -gal, de $42,09 \pm 0,5\%$ em P5 e $66,58 \pm 9,7\%$ em P7. Em comparação a P1 esse aumento foi de aproximadamente 95,6 vezes em P5 e 151,31 vezes em P7. Quando comparado a

P3 temos um aumento de 4,7 vezes e 7,5 vezes em P5 e P7, respectivamente. Por sua vez, houve também aumento significativo de 1,5 vezes de P5 em comparação a P7 (Figura 9A e 9B).

Em conjunto, esses resultados sugerem que as CEM-TAF gradualmente sofrem senescência replicativa durante o tempo de cultivo, apresentando alteração na morfologia celular e promovendo o acúmulo do marcador de senescência SA- β -gal ao longo das passagens.

Figura 9. Acúmulo de SA- β -gal em CEM-TAF durante o cultivo de longo prazo.



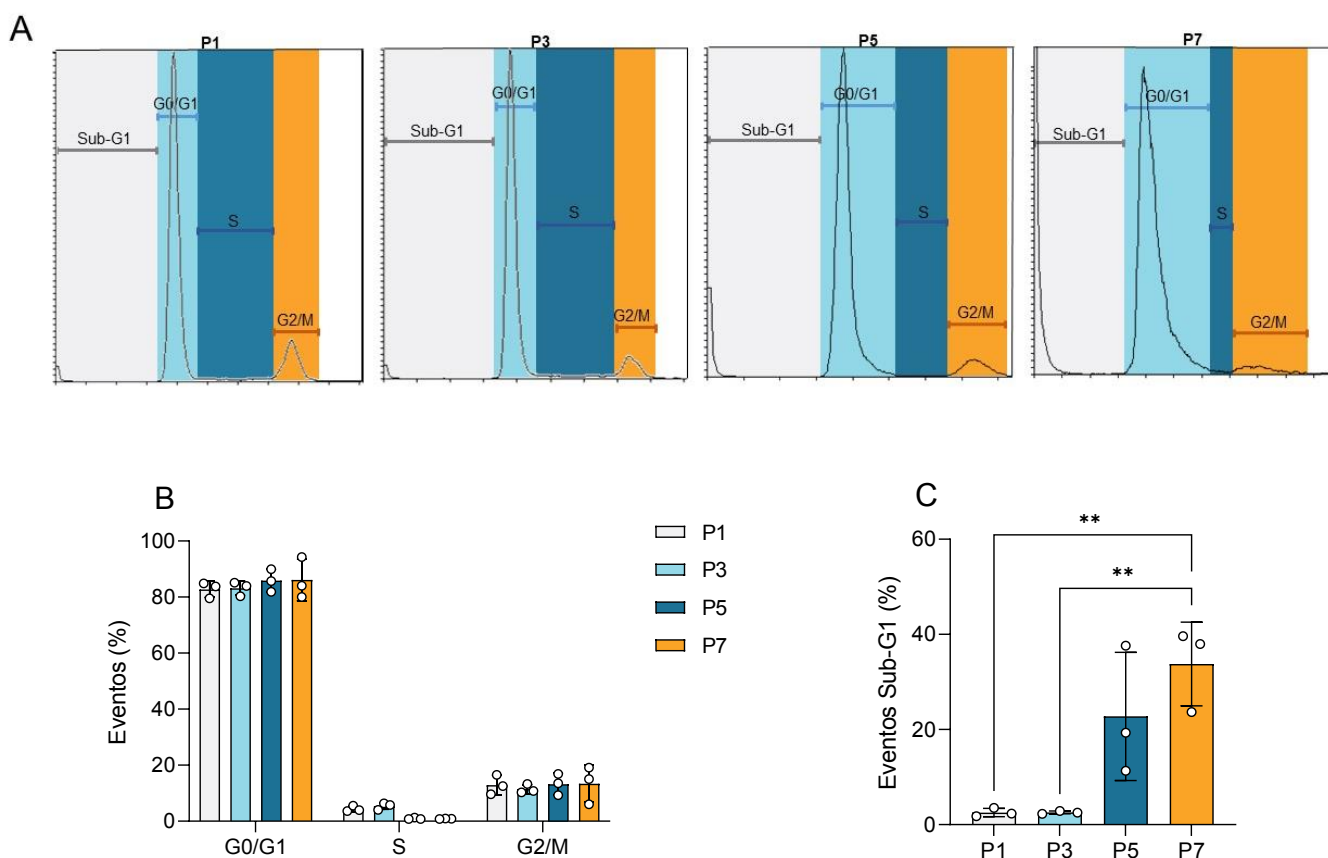
(A) Imagem representativa de células coradas para SA- β -gal em diferentes tempos de cultivo (B) Gráfico representativo do percentual de células coradas para SA- β -gal. A comparação entre as passagens foi analisada por ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$). As barras representam média \pm desvio padrão de triplicatas biológica e duplicata técnica. Setas pretas: células positivas para coloração azulada de SA- β -gal. Escala: 50 μ m.

Uma das características que define a senescência é a parada irreversível do ciclo celular de modo a limitar a replicação de células danificadas. Assim, foi avaliado a progressão do ciclo celular das CEM-TAF submetidas à amplificação *in vitro*. Como demonstrado na Figura 10B, a proporção de células nas três fases do ciclo celular foi similar em P1 e P3, com 82,74% e 83,15% de células em G0/G1, 4,36% e 5,39% na fase S e 12,89% e 11,45% nas fases G2/M, respectivamente. Apesar de não significativo, é possível observar uma tendência no aumento de células na fase G0/G1

em P5 (85,83%) e P7 (86,12%) e uma diminuição de células na fase S, de 1,27% e 0,89%, respectivamente, em comparação com as outras passagens. Na fase G2/M, os resultados demonstraram que ambas as passagens demonstraram resultados similares na porcentagem de células (Figura 10A e 10B).

Além disso, em P7 é possível observar um aumento nas células em Sub-G1 quando comparado a P1 e P3, um indicativo de DNA fragmentado que evidencia células apoptóticas (Figura 10C). A partir desses resultados sugere-se que passagens tardias podem afetar o ciclo celular das CEM-TAF, indicando uma tendência de parada do ciclo celular na fase G0/G1 e aumento da proporção de células em apoptose.

Figura 10. Perfil das fases do ciclo celular de CEM-TAF submetidas à amplificação in vitro.



(A) Histogramas representativos, demonstrando a marcação de iodeto de propídio nas diferentes fases do ciclo celular (B) Percentual de células nas fases G1/G0, S e G2/M do ciclo celular em P1, P3, P5 e P7. (C) Gráfico representativo do percentual de células em Sub-G1 em comparação ao número de eventos totais, evidenciando células apoptóticas. A comparação entre as passagens nas fases G1/G0, S e G2/M foi analisada por ANOVA de duas vias e de Sub-G1 por ANOVA de uma via,

ambas análises seguidas de pós-teste de Bonferroni (** $p < 0,01$). As barras representam média \pm desvio padrão de triplicata biológica e técnica.

A parada no ciclo celular observado em células senescentes é tipicamente em resposta a danos no DNA. Então, um dos principais problemas que podem surgir durante a amplificação *in vitro* é a possibilidade de instabilidade genética. Sendo assim, a seguir foram realizadas análises para investigar a integridade genética das CEM-TAF durante o cultivo de longo prazo por meio do ensaio de CBMN. Para essa análise, foram observadas CEM-TAF binucleadas com alterações nucleares como pontes núcleo-citoplasmáticas, brotos nucleares e micronúcleo (Figura 11).

As células apresentaram baixas porcentagens de alterações nucleares do tipo micronúcleo em todas as passagens analisadas (Figura 11A). Por outro lado, houve um aumento significativo na frequência de formação de pontes núcleo-citoplasmáticas e brotos nucleares em P7. Em particular, houve um aumento de 0,27% em P1 para 0,67% em P7 na frequência de pontes núcleo-citoplasmáticas (Figura 11B), e aumento significativo de brotos nucleares em P7 (1,11%) quando comparados a P1 (0,10%), P3 (0,10%) e P5 (0,12%) (Figura 11C). Através do experimento de CBMN também é possível observar a frequência de células em apoptose. Em concordância com os resultados de ciclo celular, demonstrando aumento de células em Sub-G1, as análises de apoptose por CBMN demonstraram um aumento significativo na frequência de células apoptóticas em P7 (1,28%) em comparação com P1 (0,46%) (Figura 11D).

Em conjunto, esses dados indicam que CEM-TAF submetidas a um maior número de passagens tendem a aumentar o número de alterações nucleares e, por consequência, podem apresentar maior instabilidade genética.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, nos dedicamos a avaliar as alterações fenotípicas e características senescentes de CEM-TAF durante a amplificação celular *in vitro*. Em resumo, os resultados demonstraram que as CEM-TAF apresentam redução no potencial proliferativo a partir de P6-P7, assim como também diminuição na capacidade de formação de colônias, quando comparado a passagens iniciais (P4-P5). Além disso, também foram observadas características senescentes em passagens em P5-P7, como alterações morfológicas, aumento de células positivas para SA- β -gal, alterações no ciclo celular e indicativo de instabilidade genética.

5.1 As células isoladas do tecido adiposo de felinos apresentam características de células estromais mesenquimais.

As CEM-TAF utilizadas nesse estudo apresentaram características de CEM de acordo com os critérios estabelecidos pela ISCT (DOMINICI et al., 2006), como morfologia fibroblastóide, alongada e fusiforme, capacidade de aderência ao plástico (Figura 6) e potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais (Figura 5). Estes dados foram semelhantes aos demonstrados em estudos de caracterização de CEM-TAF (VOGA; KOVAČ; MAJDIC, 2021), assim como também de CEM de outras fontes teciduais, como da medula óssea (MARTIN et al., 2002), da geléia de Wharton (SEO et al., 2021) e do fluído amniótico (SEO et al., 2021).

Além disso, análises de imunofenotipagem das CEM-TAF demonstraram alta proporção do marcador de superfície mesenquimal CD90, e baixa proporção de marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 (Figura 4). No entanto, ao contrário do esperado, também observamos uma baixa proporção de células positivas para os marcadores mesenquimais CD105 e CD73. Nossos resultados demonstram expressão de cerca de 20,45% do marcador CD105, porém outros trabalhos na literatura demonstram mais de 80% na expressão deste marcador em CEM-TAF (FUJIMOTO et al., 2020; KIM et al., 2017; PANASOPHONKUL et al., 2017; ZHANG; DIETRICH; LOPEZ, 2014). Por outro lado, a expressão de CD73 também não foi detectada em outros trabalhos utilizando tanto CEM-TAF (GÓMEZ et al., 2015) quanto CEM do fluído e de membranas fetais felinas (IACONO et al., 2012).

A falta de expressão de ambos os marcadores mesenquimais pode ser explicada pela falta de especificidade do anticorpo com as CEM de felinos, já que os anticorpos comerciais utilizados neste trabalho foram produzidos contra CD105 e CD73 humanos. De fato, a ausência e baixa expressão de CD73 e CD105 também foi observada em CEM de cães de diferentes fontes teciduais, também demonstrando baixa expressão especificamente de CEM-TA marcadas para CD73 (RASHID et al., 2021; WAGNER et al., 2005; WANG et al., 2020). Dessa forma, o baixo reconhecimento de ambos os anticorpos pode ser devido a diferenças no tipo de epítipo do antígeno ou nas isoformas reconhecidas pelo anticorpo entre humanos e felinos (GÓMEZ et al., 2015). No entanto, o anticorpo CD90 utilizado nesse trabalho também foi produzido contra antígenos humanos e, ainda assim, apresentou uma alta expressão em CEM-TAF. Esse resultado sugere que o CD90 de humanos parece ter uma maior similaridade com o CD90 de gatos, quando comparado a CD105 e CD73. Além disso, a expressão de CD73 também foi analisada a nível de gene por outros trabalhos, por meio de RT-PCR, mostrando resultados controversos. Rutigliano et al. (2013) relatou a não expressão de CD73 em células epiteliais amnióticas semelhantes a progenitoras multipotentes, isoladas de tecido de âmnio de felinos (RUTIGLIANO et al., 2013). Por outro lado, um estudo utilizando CEM do tecido adiposo subcutâneo e de órgãos reprodutivos de felinos relatou que as células apresentaram alta expressão desse marcador (WYSONG et al., 2021). Tendo em vista esses resultados, a baixa expressão dos marcadores mesenquimais CD73 e CD105 encontradas nesse trabalho também podem estar relacionados com a heterogeneidade na expressão de marcadores de superfícies mesenquimais específicas da espécie.

5.2 O potencial de proliferação e a capacidade clonogênica são reduzidos durante amplificação celular *in vitro*

Milhões de células são requeridas para a terapia celular, o que pode ser alcançado através de extensa amplificação *in vitro*. Nesse sentido, o potencial de proliferação das CEM é um parâmetro extremamente importante, uma vez que essa característica é necessária para atingir uma quantidade elevada de células (HASSAN et al., 2020). No entanto, sabe-se que as células submetidas ao cultivo de longa duração podem sofrer alterações no seu potencial proliferativo, dentre outras alterações, resultando na redução das suas propriedades regenerativas e na

segurança terapêutica (LI et al., 2017). Portanto, no presente trabalho, analisamos o potencial de proliferação e a capacidade de formação de colônias das CEM-TAF durante amplificação *in vitro*.

Os nossos resultados demonstraram que a taxa de proliferação das CEM-TAF diminuiu gradualmente de P5 para P6 e P7 quando comparado ao aumento observado de P1 para P2, P3, P4 e P5 (Figura 6A). Em concordância com esses dados, observamos diminuição significativa no CDT da população em P6, mas não em P7 (Figura 6B). Porém, a ausência do aumento significativo do CDT em P7 pode ser devido a dispersão dos dados encontrados entre as doadoras nessa passagem. A taxa de proliferação das CEM-TAF está em concordância com o trabalho de Kim et al. (2017) e Lee et al. (2018), que confirmaram a diminuição do potencial proliferativo das células a partir de P5 e diminuição do CDT a partir de P4 ou P5 (KIM et al., 2017). Conforme nossos resultados, um trabalho recente analisando CEM-TAF demonstrou um aumento significativo do CDT somente em P8, indicando que o aumento de CDT pode ocorrer em passagens mais tardias (VOGA; KOVAČ; MAJDIC, 2021). Por outro lado, CEM de felinos derivadas da geleia de Wharton apresentaram maior potencial proliferativo, demonstrando uma taxa de crescimento crescente até P16 (SEO et al., 2021). Esses dados indicam o comprometimento do potencial proliferativo das CEM-TAF ao longo das passagens já a partir de P6-P7, e corroboram com a premissa que CEM de diferentes fontes teciduais apresentam diferentes propriedades biológicas.

Além disso, em comparação com outras espécies, as CEM-TAF demonstraram baixo potencial de proliferação. Em cães e porcos as CEM-TA mantêm o seu potencial de proliferação até P10 e P15, respectivamente (KANG et al., 2012; TANG et al., 2012). Resultados preliminares do nosso grupo demonstraram que as CEM-TA de cães são qualitativamente mais proliferativas do que a de felinos, como observado pelo menor intervalo de tempo para atingir a confluência e pelo maior número de passagem ao qual essas células podem ser submetidas sem apresentarem perda acentuada na capacidade proliferativa. Então, a diferença observada entre o potencial proliferativo pode estar associada à entrada mais tardia em senescência das CEM-TA de cães quando comparada à de felinos. Dessa forma, quando o foco da utilização de CEM-TAF for a aplicação terapêutica é necessário preparar essas células em passagens mais iniciais.

O potencial de proliferação e de autorrenovação das CEM-TAF também foi analisado por meio da capacidade de formação de colônias. Os nossos dados

sugerem que as CEM-TAF atingem o pico de proliferação entre P2 e P3, e a partir de P4 ocorre uma redução no potencial proliferativo e capacidade clonogênica, resultando na formação de um menor número de colônias e colônias muito menores e menos densas em quantidade de células (Figura 7). Nossos resultados são similares aos de Panasophonkul et al. (2017), que também demonstraram a diminuição na eficiência clonal em CEM-TAF ao longo das passagens celulares (PANASOPHONKUL et al., 2017). Esses achados indicam que as CEM-TAF perdem a capacidade de gerar colônias ao longo das passagens, o que sugere que elas possuem a sua capacidade de autorrenovação e potencial proliferativo gradualmente reduzido durante o cultivo prolongado, como também observado pelo ensaio de CPDL. Além disso, a capacidade de formação de colônias parece ser uma das primeiras propriedades afetadas durante o cultivo de longo prazo, já que o decaimento clonogênico das CEM-TAF foi significativo a partir de P4, antes da diminuição do potencial proliferativo por CPDL, que iniciou em P6.

Em comparação com espécies como cães e porcos, o decaimento do potencial clonogênico em felinos acontece em passagens posteriores. No presente trabalho foi observado decaimento clonogênico das CEM-TAF a partir de P4, enquanto que em cães e porcos os trabalhos demonstraram decaimento em P2 e P3, respectivamente (GUERCIO et al., 2013; TANG et al., 2012). Esses achados estão de acordo com a hipótese de que a observação do comprometimento da capacidade de formação de colônias ocorre antes do comprometimento do potencial proliferativo, pois, como discutido anteriormente, CEM de cães e porcos mantêm o potencial de proliferação por mais tempo que as CEM de felinos. Esses resultados sugerem que o ensaio de unidades formadoras de colônia pode ser um bom método para detectar alterações iniciais de senescência nas propriedades das CEM-TA.

5.3 A amplificação *in vitro* resulta em alterações morfológicas em CEM-TAF ao longo das passagens

Alterações morfológicas são características de fenótipo senescente, que podem limitar a eficiência funcional das células. Existe uma série de alterações morfológicas características de senescência celular, dentre elas podem ser destacadas o tamanho celular aumentado e irregular e o aumento na quantidade e tamanho de lisossomos (ZHANG et al., 2020). Dessa forma, no presente trabalho

analisamos o efeito da amplificação *in vitro* sobre a morfologia das CEM-TAF e a atividade de SA- β -gal, uma enzima lisossômica associada à senescência.

Nossos resultados demonstraram que, em passagens iniciais, as CEM-TAF apresentaram morfologia típica de CEM, com células fusiformes e alongadas (P1-P3). No entanto, em P4 é possível observar o início de mudanças na morfologia dessas células. As células começam a apresentar irregularidades em sua estrutura, com aumento na área celular e células achatadas, que se intensificam ao longo das passagens subsequentes (Figura 8). Além disso, através das imagens da Figura 8, que foram fotografadas todas no quinto dia de cultivo, foi possível observar que, a partir de P4, ocorre um decaimento na confluência das células na garrafa de cultivo. Apesar das células estarem cobrindo o fundo da garrafa de cultura, foi observado que esse fator não se deve ao número de células, mas sim ao tamanho aumentado das células ao longo das passagens. Esses resultados estão de acordo com a diminuição do potencial proliferativo observado neste trabalho, pois o aumento da massa e da quantidade de organelas celulares, durante o processo de divisão celular, de uma célula que não prossegue com a mitose resulta em hipertrofia (OGRODNIK et al., 2019). Ainda, vale mencionar que, durante o cultivo das células foi possível observar diferenças no tempo de confluência e potencial proliferativo entre os três doadores analisados. Um doador, em específico, apresentou células que se proliferaram mais rapidamente e, conseqüentemente, atingiu a confluência de maneira mais rápida que os outros doadores. Apesar disso, todos os doadores apresentaram alterações morfológicas a partir de P4 e decaimento no tempo de confluência.

Resultados similares aos nossos foram encontrados por Kim et al. (2017) que observou alterações na morfologia e diminuição na confluência de CEM-TAF a partir de P4. Além disso, Panasophonkul et al. (2017) também demonstrou aumento no tempo das CEM-TAF para atingir a confluência a partir de P5, porém não observou alterações morfológicas nas células cultivadas até P10. Essa diferença observada no tempo de confluência e morfologia celular encontrada entre os trabalhos utilizando CEM-TAF pode estar relacionada à heterogeneidade dessas células ou a diferentes condições de cultura. Além disso, alterações morfológicas ao longo das passagens também foram observadas em cães, na qual a presença de células maiores e achatadas e a diminuição na confluência começam a ser vistos a partir de P3 (LIU et al., 2018). Em humanos também são observadas alterações morfológicas ao longo das passagens, porém essas alterações são vistas em passagens mais tardias (P15)

em comparação a felinos (JIN et al., 2021). Essa diferença ocorre porque as CEM-TAF expandidas em condições de cultura padrão não proliferam de forma robusta após passagem 5 ou 6, enquanto que as CEM de humanos apresentam potencial proliferativo até P15 (DELBEN et al., 2021; JIN et al., 2021). Dessa forma, esses resultados sugerem que, apesar das diferenças entre espécies, após longo tempo de cultivo as CEM aumentam de tamanho e perdem a capacidade proliferativa.

Uma das características de células senescentes é o aumento da massa lisossômica como uma consequência do maior nível de biogênese lisossomal nessas células. Similarmente, ocorre o aumento na atividade da enzima SA- β -gal, sendo o acúmulo dessa utilizado como biomarcador de senescência celular (DEBACQ-CHAINIAUX et al., 2009). Dessa forma, no presente trabalho analisamos o acúmulo de SA- β -gal em CEM-TAF submetidas à amplificação *in vitro*. Nossos resultados demonstraram aumento gradual no acúmulo de SA- β -gal ao longo das passagens. Em P5 e P7 houve um aumento acentuado na proporção de células positivas para SA- β -gal, como pode ser observado pelo maior número de células com coloração azul na Figura 9A. Em P7 mais de 65% das células apresentaram acúmulo de SA- β -gal, contrastando a praticamente nenhuma célula corada em P1. Apenas o trabalho de Lee et al. (2018) analisou parâmetros de SA- β -gal em CEM-TAF, mostrando resultados similares aos encontrados neste estudo, com aumento gradual na porcentagem de células coradas para essa enzima. Esses resultados sugerem que a cultura de longo prazo promove gradualmente o acúmulo de SA- β -gal em CEM-TAF.

No entanto, é importante ressaltar que os resultados obtidos por Lee et al. (2018) demonstraram uma porcentagem de células coradas com SA- β -gal muito menor que os experimentos realizados em nosso laboratório. Enquanto eles encontraram porcentagem de 0,7%, 2,8% e 5% em P3, P5 e P7, respectivamente, nós obtivemos porcentagens de 8,8% em P3, 42% em P5 e 66,5% em P7. Apesar disso, o aumento entre as passagens foi similar entre nossos resultados e o deles, com aumento de cerca de 4x de P3-P5 e 7x de P3-P7, e aumento de aproximadamente 1,5x de P5 para P7. As diferenças encontradas entre os dois trabalhos podem ser devido a heterogeneidade das células no que diz respeito ao potencial proliferativo, resultando em células que se proliferam mais e, conseqüentemente, apresentam características de senescência mais acentuadas. Essas diferenças em potencial proliferativo podem ser devido a diversos fatores como métodos de cultivo e expansão, diferentes características do doador, fontes teciduais

entre outros. Como observado em nossos resultados (Figura 9B), em P7 houve uma maior dispersão dos dados e, através de observações durante o cultivo das células, foi possível constatar que isso estava intimamente ligado com a capacidade proliferativa das mesmas. O doador que apresentou visualmente a menor capacidade de proliferação teve uma menor proporção de células coradas com SA- β -gal, enquanto o doador mais proliferativo apresentou a maior média de células coradas. Essas análises acentuam a necessidade do estabelecimento de protocolos universais de cultivo e manuseamento de CEM, de modo a obter resultados com maior taxa de homogeneidade entre os doadores.

Além disso, CEM de outras espécies também demonstram aumento na proporção de células positivas para SA- β -gal ao longo das passagens. Em cães, células positivas para SA- β -gal foram encontradas a partir de P3, sendo que em P5 quase todas as células cultivadas apresentaram coloração positiva para essa enzima (LIU et al., 2018). Esses dados então em concordância com os nossos dados, que demonstram proporção elevada de células coradas com SA- β -gal em passagens mais tardias. Em CEM de humanos também foi possível observar o aumento na proporção de células positivas para SA- β -gal ao longo das passagens, de maneira semelhante aos resultados obtidos em felinos em cães, porém esse aumento ocorreu em P10 e P15 (JIN et al., 2021). Esses resultados indicam que as análises de SA- β -gal ao longo das passagens são bastante homogêneas entre as espécies, indicando que esse biomarcador pode ser um ótimo método para analisar senescência.

As alterações morfológicas e na atividade de SA- β -gal observadas entre P4 e P5 neste trabalho, também estão de acordo com os nossos resultados de diminuição da capacidade clonogênica e potencial proliferativo. Esses resultados sugerem que as CEM-TAF mantêm as suas propriedades e funcionalidades até P3, e iniciam as alterações relacionadas à senescência entre P4 e P5 como alterações morfológicas, diminuição no potencial proliferativo e acúmulo de SA- β -gal.

5.4 As CEM-TAF submetidas à cultura de longo prazo apresentam alterações na fase do ciclo celular

Uma das características definidoras de senescência celular é a parada irreversível do ciclo celular em resposta ao estresse, de modo a prevenir a propagação de células disfuncionais. Dessa forma, para estimar a senescência

celular replicativa, medimos o conteúdo de DNA por meio de marcação com iodeto de propídio em CEM-TAF submetidas à cultura de longo prazo, a fim de fornecer informações sobre a posição das células no ciclo celular.

As CEM são células de ciclo celular lento, caracterizadas pela maioria das células em estágio de repouso na fase G0/G1, que está relacionado com a sua multipotência celular (ZHAO et al., 2017). Neste estudo, as análises de ciclo celular das CEM-TAF por citometria de fluxo demonstraram resultados similares ao esperado. Foi possível observar que as CEM-TAF estavam principalmente na fase G0/G1 do ciclo celular, com pequenas proporções de células na fase S e G2/M (Figura 10A e 10B). Além disso, apesar de não significativo, foi possível observar uma tendência de aumento na proporção de células na fase G0/G1 do ciclo e diminuição na fase S em P5 e P7. Esses resultados podem indicar uma parada do ciclo celular na fase G0/G1, evento característico de células senescentes. Outros trabalhos na literatura já reportaram que as CEM senescentes apresentam parada do ciclo celular em G0/G1 em diferentes espécies, como cavalos (ALICKA et al., 2020), humanos (JIN et al., 2021), porcos (JEON; KWACK; RHO, 2011) e ratos (GUERCIO et al., 2013). No entanto, este é o primeiro trabalho a analisar o efeito da amplificação *in vitro* no ciclo celular nas CEM de felinos.

Embora não tenhamos observado alterações significativas no ciclo celular das CEM-TAF, deve-se levar em conta que a senescência celular é multifatorial, por isso é importante observar os outros resultados que corroboram com a hipótese de parada do ciclo celular em G0/G1. Embora a parada do ciclo celular seja um mecanismo preventivo para evitar propagação de mutações, uma parada prolongada do ciclo celular em células-tronco leva à senescência. Por isso, uma série de mecanismos é responsável por regular o equilíbrio entre a proliferação e a progressão do ciclo celular. Como apresentado anteriormente, nossos resultados demonstraram diminuição no potencial proliferativo e clonogênico das células, reforçando a hipótese de parada do ciclo celular e o perfil senescente das CEM-TAF em passagens tardias.

Além disso, um trabalho forneceu evidências da correlação entre a hipertrofia e a parada do ciclo celular. Neurohr et al. (2019) demonstraram que a indução temporária da parada do ciclo celular em células em G1 resultou no aumento do volume celular e que, após a retomada do ciclo celular, a grande maioria das células apresentou uma incapacidade de prosseguir com a proliferação, contribuindo para senescência (NEUROHR et al., 2019). Levando isso em conta, é importante ressaltar

novamente que nossos resultados demonstraram aumento no tamanho das CEM-TAF ao longo das passagens, o que pode estar correlacionado com a tendência na parada do ciclo celular em G0/G1 dessas células.

A parada do ciclo celular em G0/G1 fornece uma oportunidade para as células passarem por mecanismos de reparo ou de seguirem para a via apoptótica. Levando isso em conta, através das análises de ciclo celular avaliamos também a proporção de células em Sub-G1 ao longo das passagens, que indicam fragmentos de DNA, evidenciando início de apoptose. Os dados obtidos demonstraram aumento significativo na proporção de células em sub-G1 em P7. Em P5 houve uma tendência de aumento, porém devido a dispersão dos dados não houve significância (Figura 10C).

Juntos, esses dados sugerem fortemente uma entrada em senescência das CEM-TAF em passagens tardias por parada do ciclo celular e aumento do número de células em apoptose. A realização de experimentos adicionais seria interessante para confirmar o perfil do ciclo celular ao longo das passagens em CEM-TAF, além do aumento no número amostral. Experimento de análise da expressão de inibidores do ciclo celular, como p16 e p21, e tamanho dos telômeros poderiam fornecer informações adicionais sobre a senescência replicativa em CEM-TAF.

5.5 As CEM-TAF submetidas à cultura de longo prazo apresentam instabilidade genética em passagens tardias.

A senescência replicativa está associada ao acúmulo de danos no DNA e comprometimento da integridade genética das células. Para analisar a integridade genética das CEM-TAF durante o cultivo de longo prazo, erros mitóticos foram analisados por meio do ensaio de CBMN. Esta metodologia analisa a presença de micronúcleo, pontes núcleo-plasmáticas e brotos nucleares em células binucleadas que foram impedidas de completar a citocinese por conta do tratamento com citocalasina-B (CORNÉLIO et al., 2014). Alterações nucleares nas CEM de felinos ainda não foram analisadas ao longo da amplificação *in vitro*, esse é o primeiro trabalho na literatura que investiga esse parâmetro. Neste trabalho, os resultados demonstraram proporções similares de alterações nucleares em CEM-TAF de P1 a P5. Em contrapartida, em P7 houve um aumento significativo na proporção de células

com pontes núcleo-plasmáticas, brotos nucleares e das células em apoptose (Figura 11).

Delben et al. (2021) analisou a proporção de alterações nucleares em CEM-TA faciais e abdominais de humanos em P5 e P25. Os resultados demonstraram que a cultura de longo prazo resultou no aumento da proporção de brotos nucleares e pontes núcleo-plasmáticas (DELBEN et al., 2021). Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos nesse trabalho, que demonstraram aumento na proporção de pontes núcleo-plasmáticas em passagens tardias em CEM-TAF. Além disso, foi possível observar proporções similares de células com pontes núcleo-plasmáticas em passagem inicial entre as duas espécies, felinos e humanos, em CEM da mesma fonte tecidual. Por outro lado, as CEM de humanos derivadas da medula óssea, por exemplo, demonstraram proporção menor de células com pontes núcleo-plasmáticas em passagem inicial quando comparada a CEM-TAF (CORNÉLIO et al., 2014).

As análises de broto nuclear demonstraram diferentes resultados entre as passagens nas CEM de humanos e de felinos. Enquanto observamos que houve um aumento em P7 na proporção de células com brotos nucleares, Delben et al. (2021) observou uma diminuição na proporção de CEM-TA de humanos com essa alteração em passagem tardia (P25). As CEM-TAF também apresentaram uma proporção menor de brotos nucleares em passagem inicial quando comparado a CEM-TA abdominais de humanos. Além disso, as CEM-TAF apresentaram uma proporção maior de células com brotos nucleares em comparação a CEM da medula óssea (CORNÉLIO et al., 2014). A diferença observada entre a proporção de células com brotos nucleares entre as CEM de humanos e de felinos pode ser um indicativo de que as CEM-TAF possuem mecanismos de reparo de brotos nucleares menos eficientes do que as CEM da medula óssea de humanos, porém mais eficientes do que as CEM do tecido adiposo de humanos.

Além disso, esses resultados evidenciam a diferença entre as CEM de diferentes fontes e espécies, enfatizando a importância de estudos e pesquisas específicas para cada fonte celular. Não apenas entre diferentes espécies e fontes teciduais, mas é possível observar que as CEM-TAF apresentaram diferenças nos resultados de CBMN entre os doadores. Doadores de CEM-TAF com maior atividade proliferativa apresentaram maior proporção de células com pontes núcleo-plasmáticas, brotos nucleares e micronúcleo, indicando que quanto maior o número de divisões celulares maior a incidência de alterações nucleares. Isso fortalece a

hipótese de que quanto mais passagens as células são submetidas, maior será a sua instabilidade genética.

Não houve alterações significativas na proporção de células com micronúcleo, as quais demonstraram baixa incidência nas CEM-TAF em todas as passagens. A baixa incidência de micronúcleo também foi observada em CEM da medula óssea de humanos, indicando que ambas as CEM provavelmente possuem mecanismos para evitar um alto nível de quebras cromossômicas (CORNÉLIO et al., 2014).

Além disso, com as análises de CBMN também foi possível observar a proporção de células apoptóticas, as quais apresentaram uma tendência de aumento gradual ao longo das passagens, sendo este significativo em P7 quando comparado a P1. Esses dados estão de acordo com as análises de ciclo celular, que demonstram aumento na porcentagem de células apoptóticas durante a cultura de longo prazo. Em conjunto com os dados anteriores, esse resultado sugere que as CEM-TAF perdem a capacidade proliferativa, bloqueando o ciclo celular e entrando em apoptose.

De maneira geral, esses resultados indicam que a cultura de longo prazo afeta a integridade genética das CEM-TAF, o que pode prejudicar os seus efeitos terapêuticos e levanta questões de segurança para aplicação clínica dessas células. Sendo assim, seria interessante incluir mais testes genéticos para avaliar a integridade genética dessas células antes do tratamento envolvendo a terapia celular.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou a tendência das CEM-TAF sofrerem senescência replicativa durante a cultura de longo prazo, como evidenciado pela alteração na curva de proliferação e na capacidade clonogênica, morfologia alterada, tendência de parada do ciclo celular em G0/G1, aumento da atividade de SA- β -gal e de alterações nucleares em passagens tardias, os quais são conhecidos como marcadores de senescência.

Esses resultados forneceram fortes evidências de que a amplificação celular *in vitro* afeta negativamente as características das CEM-TAF, o que pode comprometer seriamente a segurança e eficácia da utilização dessas células na medicina veterinária regenerativa. Sendo assim, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, nós recomendamos o uso de CEM-TAF em passagens iniciais, particularmente aquelas antes de P5, para aplicação terapêutica em felinos. Indicamos que seja utilizado CEM-TAF para aplicação clínica preferencialmente em P3, pois foi a passagem que observamos os melhores resultados em suas propriedades biológicas.

Além disso, nossas descobertas irão aprimorar o conhecimento da biologia das CEM-TAF, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na senescência das CEM. Além disso, esses resultados facilitarão a seleção de CEM a partir de números de passagens específicas para uso em terapia, o que otimizará sua aplicação na medicina veterinária regenerativa. Nossas descobertas podem abrir caminhos para novas pesquisas em protocolos de subcultura de CEM, com foco na busca de alternativas para atingir o número de células necessárias para aplicação terapêutica e fornecer estratégias promissoras para expansão de CEM em escala industrial, com grande potencial para terapia celular e biotecnologia.

Como perspectivas futuras de trabalho, são encorajados estudos para melhor compreender como a amplificação *in vitro* afeta a biologia das CEM-TAF, como por meio da análise dos componentes do secretoma dessas células durante a cultura de longo prazo.

7. REFERÊNCIAS

ALICKA, M. et al. Age-dependent impairment of adipose-derived stem cells isolated from horses. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, p. 4, 3 jan. 2020.

ARZI, B. et al. Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 5, n. 1, p. 75–86, 1 jan. 2016.

BAHN, J.-J. et al. Suitability of autologous serum for expanding rabbit adipose-derived stem cell populations. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 4, p. 413–417, dez. 2012.

CORIELL INSTITUTE. Disponível em: <https://www.coriell.org/0/sections/support/global/Passage_VS_PDL.aspx?PgId=577>. Acesso em: 25 set. 2022.

CORNÉLIO, D. A. et al. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Adapted for Analyzing Genomic Instability of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 8, p. 823–838, 15 abr. 2014.

DEBACQ-CHAINIAUX, F. et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. **Nature Protocols**, v. 4, n. 12, p. 1798–1806, dez. 2009.

DELBEN, P. B. et al. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells from face and abdomen undergo replicative senescence and loss of genetic integrity after long-term culture. **Experimental Cell Research**, v. 406, n. 1, p. 112740, set. 2021.

DEVIREDDY, L. R. et al. Questions and Challenges in the Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Based Therapies in Veterinary Medicine. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 23, n. 5, p. 462–470, out. 2017.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

FUJIMOTO, Y. et al. Basic fibroblast growth factor enhances proliferation and hepatocyte growth factor expression of feline mesenchymal stem cells. **Regenerative Therapy**, v. 15, p. 10–17, dez. 2020.

GATTEGNO-HO, D.; ARGYLE, S.-A.; ARGYLE, D. J. Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug

discovery. **The Veterinary Journal**, v. 191, n. 1, p. 19–27, jan. 2012.

GÓMEZ, M. C. et al. Characterization and Multilineage Differentiation of Domestic and Black-Footed Cat Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Abdominal and Subcutaneous Adipose Tissue. **Cellular Reprogramming**, v. 17, n. 5, p. 376–392, out. 2015.

GONZÁLEZ-GUALDA, E. et al. A guide to assessing cellular senescence *in vitro* and *in vivo*. **The FEBS Journal**, v. 288, n. 1, p. 56–80, jan. 2021.

GUERCIO, A. et al. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site: Adipose-derived mesenchymal stem cells in dog. **Cell Biology International**, v. 37, n. 8, p. 789–798, ago. 2013.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 15 maio 2008.

HASSAN, M. N. F. B. et al. Large-Scale Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2020, p. 1–17, 15 jul. 2020.

HUANG, G. T.-J.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 9, p. 792–806, set. 2009.

IACONO, E. et al. Could fetal fluid and membranes be an alternative source for Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in the feline species? A preliminary study. **Veterinary Research Communications**, v. 36, n. 2, p. 107–118, jun. 2012.

JEON, B.-G.; KWACK, D.-O.; RHO, G.-J. Variation of Telomerase Activity and Morphology in Porcine Mesenchymal Stem Cells and Fibroblasts during Prolonged *in vitro* Culture. **Animal Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 197–210, out. 2011.

JEREMIAS, T. DA S. et al. Dermal Substitutes Support the Growth of Human Skin-Derived Mesenchymal Stromal Cells: Potential Tool for Skin Regeneration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89542, 26 fev. 2014.

JIN, L. et al. Altered properties of human adipose-derived mesenchymal stromal cell during continuous *in vitro* cultivation. **Cytotechnology**, v. 73, n. 4, p. 657–667, ago. 2021.

KANG, B.-J. et al. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, p. 299–310, set. 2012.

- KIM, H.-R. et al. Extensive characterization of feline intra-abdominal adipose-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, p. 299, 2017.
- LEE, B.-Y. et al. Altered properties of feline adipose-derived mesenchymal stem cells during continuous *in vitro* cultivation. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 6, p. 930–938, 2018.
- LI, Y. et al. Senescence of mesenchymal stem cells (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, n. 4, p. 775–782, abr. 2017.
- LIU, J. et al. Senescence in Mesenchymal Stem Cells: Functional Alterations, Molecular Mechanisms, and Rejuvenation Strategies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 258, 5 maio 2020.
- LIU, Z. et al. Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Serum-Free Medium. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 24, n. 7, p. 399–411, jul. 2018.
- MARKOSKI, M. M. Advances in the Use of Stem Cells in Veterinary Medicine: From Basic Research to Clinical Practice. **Scientifica**, v. 2016, p. 4516920, 2016.
- MARTIN, D. R. et al. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 8, p. 879–886, ago. 2002.
- MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; BEYER NARDI, N. Adipose-Derived Stem Cells in Veterinary Medicine: Characterization and Therapeutic Applications. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 7, p. 803–813, abr. 2015.
- NEUROHR, G. E. et al. Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. **Cell**, v. 176, n. 5, p. 1083- 1097.e18, fev. 2019.
- OGRODNIK, M. et al. Expansion and Cell-Cycle Arrest: Common Denominators of Cellular Senescence. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 44, n. 12, p. 996–1008, dez. 2019.
- PANASOPHONKUL, S. et al. Phenotypic characteristics of feline adipose-derived stem cells affected by cell passage number. p. 11, 2017.
- PARYS, M. et al. Safety of Intraperitoneal Injection of Adipose Tissue-Derived Autologous Mesenchymal Stem Cells in Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 1, p. 157–163, jan. 2016.
- QUIMBY, J. M. et al. Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: A pilot study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 6, p. 418–426, jun. 2011.

QUIMBY, J. M. et al. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 2, p. 48, 30 abr. 2013.

QUIMBY, J. M. et al. Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 2, p. 165–171, fev. 2016.

QUIMBY, J. M.; BORJESSON, D. L. Mesenchymal stem cell therapy in cats: Current knowledge and future potential. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, n. 3, p. 208–216, mar. 2018.

RASHID, U. et al. Characterization and differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from multiple canine adipose tissue sources. **BMC Veterinary Research**, v. 17, p. 388, 18 dez. 2021.

ROTH, V. **Doubling Time Computing**. Disponível em: <<https://www.doubling-time.com/compute.php>>. Acesso em: 25 set. 2022.

RUTIGLIANO, L. et al. Molecular characterization and in vitro differentiation of feline progenitor-like amniotic epithelial cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 5, p. 133, dez. 2013.

SALEHINEJAD, P.; MOSHREFI, M.; ESLAMINEJAD, T. An Overview on Mesenchymal Stem Cells Derived from Extraembryonic Tissues: Supplement Sources and Isolation Methods. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v. 13, p. 57–65, 7 jul. 2020.

SEO, M.-S. et al. Isolation and Characterization of Feline Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 2, p. 24, 7 fev. 2021.

TANG, L. et al. Proliferative Capacity and Pluripotent Characteristics of Porcine Adult Stem Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow. **Cellular Reprogramming**, v. 14, n. 4, p. 342–352, ago. 2012.

THOMSON, A. L. et al. Intra-arterial renal infusion of autologous mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: Phase I clinical trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 3, p. 1353–1361, maio 2019.

TRZIL, J. E. et al. Intravenous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for the treatment of feline asthma: a pilot study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 12, p. 981–990, dez. 2016.

GONZÁLEZ-GUALDA, E. et al. A guide to assessing cellular senescence *in vitro* and *in vivo*. **The FEBS Journal**, v. 288, n. 1, p. 56–80, jan. 2021.

TURINETTO, V.; VITALE, E.; GIACHINO, C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1164, 19 jul. 2016.

WENG, Z. et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 11, n. 4, p. 356–371, 5 mar. 2022.

UDER, C. et al. Mammalian MSC from selected species: Features and applications: Cross-species MSC. **Cytometry Part A**, v. 93, n. 1, p. 32–49, jan. 2018.

VIKARTOVSKA, Z. et al. Adult Stem Cells Based Therapies in Veterinary Medicine. **Archives of Veterinary Science and Medicine**, v. 03, n. 02, 2020.

VOGA, M.; KOVAČ, V.; MAJDIC, G. Comparison of Canine and Feline Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells/Medicinal Signaling Cells With Regard to Cell Surface Marker Expression, Viability, Proliferation, and Differentiation Potential. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 610240, 13 jan. 2021.

WAGNER, W. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 11, p. 1402–1416, nov. 2005.

WANG, W. et al. Characteristic comparison between canine and human dental mesenchymal stem cells for periodontal regeneration research in preclinical animal studies. **Tissue and Cell**, v. 67, p. 101405, dez. 2020.

WEBB, T. L. Stem Cell Therapy and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 50, n. 5, p. 955–971, set. 2020.

WEBB, T. L.; QUIMBY, J. M.; DOW, S. W. In vitro comparison of feline bone marrow-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 2, p. 165–168, fev. 2012.

WEBB, T. L.; WEBB, C. B. Stem cell therapy in cats with chronic enteropathy: a proof-of-concept study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, n. 10, p. 901–908, out. 2015.

WENG, Z. et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 11, n. 4, p. 356–371, 5 mar. 2022.

WYSONG, A. et al. Viability, yield and expansion capability of feline MSCs obtained

from subcutaneous and reproductive organ adipose depots. **BMC Veterinary Research**, v. 17, p. 244, 15 jul. 2021.

ZAJIC, L. B. et al. Comparison of proliferative and immunomodulatory potential of adipose-derived mesenchymal stem cells from young and geriatric cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 10, p. 1096–1102, out. 2017.

ZHANG, M. et al. A simple microfluidic strategy for cell migration assay in an in vitro wound-healing model: Microfluidic approach for cell migration. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 6, p. 897–903, nov. 2013.

ZHANG, N.; DIETRICH, M. A.; LOPEZ, M. J. Therapeutic Doses of Multipotent Stromal Cells from Minimal Adipose Tissue. **Stem Cell Reviews**, v. 10, n. 4, p. 600–611, 2014.

ZHANG, Y. et al. Cell Senescence: A Nonnegligible Cell State under Survival Stress in Pathology of Intervertebral Disc Degeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–12, 31 ago. 2020.

ZHAO, Y. et al. Age-Related Changes in Nucleus Pulposus Mesenchymal Stem Cells: An In Vitro Study in Rats. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 6761572, 2017.

ZHOU, X. et al. Mesenchymal Stem Cell Senescence and Rejuvenation: Current Status and Challenges. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 364, 3 jun. 2020.

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