



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

Victor Juan de Souza Lima

ANÁLISE DA SENESCÊNCIA REPLICATIVA DURANTE A AMPLIFICAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CANINO

Florianópolis – SC

2024

Victor Juan de Souza Lima

**ANÁLISE DA SENESCÊNCIA REPLICATIVA DURANTE A AMPLIFICAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CANINO**

Dissertação 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 título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

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

Florianópolis – SC

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.  
Dados inseridos pelo próprio autor

DE SOUZA LIMA, Victor Juan

ANÁLISE DA SENESCÊNCIA REPLICATIVA DURANTE A AMPLIFICAÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CANINO / Victor Juan DE SOUZA LIMA ; orientadora, Andréa Gonçalves Trentin, 2024.

63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

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

Victor Juan de Souza Lima

**ANÁLISE DA SENESCÊNCIA REPLICATIVA DURANTE A AMPLIFICAÇÃO *IN VITRO*  
DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSE  
CANINO**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 10 de junho de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

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

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (PPGO)

Prof.(a) Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (PPGBCD)

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 pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Desenvolvimento.

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

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

Orientador(a)

Florianópolis, 2024.



## AGRADECIMENTOS

Foram muitos aqueles que contribuíram de maneira direta ou indireta para a execução deste trabalho. Início agradecendo à minha orientadora, Profa. Andréa Trentin, pela orientação excepcional e por sempre valorizar a independência e incentivar o pensamento crítico em seus orientandos. A professora é parte fundamental para a qualidade dos trabalhos do LACERT e sem dúvida é uma das maiores cientistas que tive a oportunidade de conhecer. Obrigado pelas oportunidades e por ter me adotado como filho científico desde a minha graduação!

Agradeço à minha companheira e colega de trabalho Monique, que contribuiu de maneira essencial. A Monique esteve presente desde a concepção até a finalização deste trabalho, e auxiliou tanto de maneira direta, com experimentos e discussões de resultados, mas também de maneira indireta, através do seu suporte e carinho, que são o motivo de eu tanto te amar. Agradeço pelas conversas, ajudas com experimentos e pela vida que levamos. Você é incrível e te admiro cada dia mais.

Agradeço à Profa. Talita Jeremias por sempre ter sido solícita e me auxiliado com dúvidas, além de sempre trazer questionamentos pertinentes ao trabalho e compartilhar suas experiências que ajudam nós, discentes, a compreender melhor os nossos resultados. Agradeço também ao Prof. Ricardo Garcez, que contribuiu com seu pensamento e questões levantadas durante conversas de corredor, reuniões e seminários do LACERT, bem como a sua disponibilidade para ajudar com todo o necessário.

Aos meus colegas de LACERT: Karynne, Maiara, Nathali, Eduardo, Felipe, Fernanda, Camila, Lucas, Thais, Maria Clara, Lara, Gabriela e Johann. Em especial agradeço à minha coorientanda de iniciação científica, Aline, que vem contribuindo com minhas atividades desde que se juntou ao laboratório e que me dá muito orgulho por conta da sua evolução, tenho certeza que você será uma profissional incrível. Agradeço também aos meus antigos colegas de laboratório, que são muitos para se citar, mas todos moram no meu coração! O LACERT é um ótimo lugar para se estar, compartilhar experiências e exercitar o conhecimento científico e isso é resultado do trabalho de todos vocês.

Às veterinárias Aline, Camila, Flavia e Isabela do hospital veterinário Santa Vida por terem contribuído com a coleta e disponibilização do tecido adiposo canino, processo essencial para este trabalho. Além disso, agradeço às veterinárias Juliana e Thais do hospital veterinário Chubaci por terem se disponibilizado para auxiliar na continuidade dos projetos com as MSCs caninas. Obrigado!

À minha coorientadora da graduação, Bianca Teixeira, que foi o pontapé inicial para a minha jornada na academia e que sem dúvida contribuiu muito para a minha formação como cientista. Este trabalho se baseia no que construímos na época em que fui coorientando e muitas coisas aqui aplicadas eu aprendi diretamente com a Bianca. Agradeço também à Prof. Débora Olsson, que também esteve presente nesta época e auxiliou com dúvidas referentes à escrita do projeto submetido ao CEUA.

Agradeço à Prof. Helena Zomer que confiou a mim, e à Monique, a tarefa de contribuir com a escrita do seu artigo e que sempre foi muito receptiva para oportunidades de colaboração internacional mútua.

Agradeço ao corpo técnico e toda a estrutura do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB). Utilizei as salas do LAMEB incontáveis vezes, e todos os servidores foram sempre muito solícitos, além de me auxiliarem com dúvidas técnicas, treinamentos e visões que eu só poderia ter destes profissionais capacitados.

Aos membros titulares da banca avaliadora, Profa. Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz e Profa. Dra. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, e aos membros suplentes Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni e Profa. Dra. Norma Machado da Silva. Muito obrigado pela disponibilidade para avaliar e contribuir com a elaboração final deste trabalho!

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por me conceder bolsa de pós-graduação durante o período em que estive no mestrado.

Aos cãezinhos doadores de tecido adiposo e seus tutores. A sua contribuição fornecerá base científica que para diversos estudos futuros!

Agradeço aos meus amigos Vinícius, Cláudio, Romulo e Thiago, bem como a minha amiga Savana. Cada um está em um canto de Santa Catarina, mas é sempre muito bom cada vez que eu vejo vocês. Aos meus ex-colegas de casa Arcelo e Emmanuel que estiveram comigo no início do mestrado e compartilharam comigo momentos incríveis que vou levar pro resto da vida.

Também agradeço a todos os meus familiares que são a minha base e que me fornecem tudo, desde apoio financeiro, que foi muitas vezes necessário para a vida em Florianópolis com uma bolsa de pós-graduação, até o suporte emocional. O carinho de saber que eu sempre terei um porto seguro me dá a coragem para realizar as coisas que tenho vontade e me abre oportunidades que reconheço ser um privilégio imenso. Obrigado pai e mãe, por me apoiarem nas minhas escolhas, aceitarem que eu decidi seguir pelo caminho não-convencional ao vir para Florianópolis e por me incentivarem a continuar na jornada sem perder o ânimo e a esperança. Agradeço à minha vó que me recebeu quando eu mais precisei, que me apoia e que continua a

me receber sempre de braços abertos. Ao meu vô Rubens por ter me incentivado em momentos de dificuldade. Agradeço a todos os meus familiares que não estão aqui citados, mas que contribuíram muito com este trabalho, moldaram os meus valores, me formaram como pessoa e compartilham comigo uma ancestralidade de muita luta e suor. Obrigado. Amo muito vocês!

*“In the world through which I travel, I am endlessly creating myself”*

**Frantz Fanon, 1952**

## RESUMO

As Células Estromais Mesenquimais (MSCs, do inglês *Mesenchymal Stromal Cells*) têm sido estudadas para fins regenerativos há anos. Na medicina veterinária, e particularmente em cães, as MSCs derivadas do tecido adiposo canino (cAD-MSCs) possuem potencial para o tratamento de diversas doenças degenerativas. No entanto, poucos estudos avaliam características adquiridas durante a manipulação *in vitro* e expansão celular, como a senescência, que impactam a atividade terapêutica dessas células. Desse modo, este estudo teve como objetivo avaliar as características senescentes de cAD-MSCs durante a amplificação *in vitro*. As cAD-MSCs foram obtidas de cães saudáveis, caracterizadas segundo as diretrizes da *International Society of Cell and Gene Therapy* (ISCT) e então cultivadas até a passagem 7 (P7). Foram avaliados os seguintes parâmetros: morfologia, potencial de autorrenovação e proliferação celular, capacidade de fechamento de ferida *in vitro*, atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -Gal), níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), incidência de apoptose/morte celular e ocorrência de danos nucleares e genéticos. As células obtidas exibiram características mesenquimais e mostraram susceptibilidade à senescência durante a expansão. As cAD-MSCs apresentaram diminuição progressiva da proliferação após P4 e, a partir de P5, reduzida capacidade de autorrenovação, alterações na morfologia, aumento da ocorrência de alterações nucleares do tipo broto e atividade elevada de SA- $\beta$ -Gal. Em P7, foi observado aumento no marcador de quebra de dupla fita de DNA  $\gamma$ -H2AX e nos níveis de EROs, acompanhado de diminuição no potencial de fechamento de feridas. Em conjunto, os resultados evidenciam a progressão do fenótipo de senescência replicativa das cAD-MSCs durante a expansão *in vitro*. Essas descobertas não só fornecem informações cruciais para a aplicação das cAD-MSCs na medicina veterinária, mas também ressaltam a importância de se considerar cuidadosamente as características das passagens celulares a serem utilizadas. Em particular, as passagens iniciais (P1-P3) se apresentam como desejáveis para a manutenção das características mesenquimais das células destinadas à aplicação clínica.

**Palavras-chave:** células-tronco; medicina veterinária; envelhecimento.

## ABSTRACT

Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) have been under study for regenerative purposes for years. In veterinary medicine, canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (cAD-MSCs) hold the potential for treating various degenerative diseases in dogs. However, clinical trials often lack details on cell expansion, hindering the identification of characteristics acquired during *in vitro* manipulation, such as cellular senescence, which can impact their therapeutic activity. Thus, there is a need for a comprehensive characterization of replicative senescence in these cells. Therefore, this study aimed to identify the emergence of senescent characteristics in cAD-MSCs during amplification, constructing a timeline of their *in vitro* lifespan. cAD-MSCs were obtained from healthy dogs, characterized following the International Society of Cell and Gene Therapy (ISCT) guidelines, and then cultured until passage 7 (P7). The following parameters were evaluated: cellular morphology, self-renewal, proliferation, *in vitro* wound closure capacity, senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity (SA- $\beta$ -Gal), reactive oxygen species (ROS) levels, incidence of apoptosis/cell death, and genetic and nuclear damages. The obtained cells exhibited mesenchymal characteristics and showed susceptibility to cellular senescence during expansion. The proliferation rate of cAD-MSCs started to decrease at P4. From P5, cAD-MSCs showed reduced self-renewal capacity, alterations in cell size and morphology, increased occurrence of nuclear buds, and elevated SA- $\beta$ -Gal activity. At the late passage (P7), there was an increase in the  $\gamma$ -H2AX double-strand break marker, an increase in ROS levels, and a decrease in wound closure potential. Collectively, these results demonstrate the progression of the replicative senescence phenotype in cAD-MSCs, specifying when each senescent characteristic arises during *in vitro* expansion. These findings provide crucial information for the application of cAD-MSCs in veterinary medicine and emphasize the importance of carefully considering the characteristics of cell passages. Therefore, early passages (P1-P3) are suggested as desirable for maintaining the mesenchymal characteristics of cells intended for clinical application.

**Keywords:** stem cells; veterinary medicine; ageing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental.....	23
Figura 2. As células isoladas apresentam morfologia de MSC.....	32
Figura 3. As células isoladas apresentam perfil imunofenotípico de MSC.....	32
Figura 4. As células isoladas apresentam potencial de diferenciação de MSC.....	33
Figura 5. Capacidade clonogênica das cAD-MSCs amplificadas.....	35
Figura 6. Perfil proliferativo de cAD-MSCs amplificadas <i>in vitro</i> .....	36
Figura 7. CPDL dos diferentes cultivos de cAD-MSCs.....	36
Figura 8. Potencial de fechamento de ferida <i>in vitro</i> das cAD-MSCs.....	37
Figura 9. Alterações morfológicas das cAD-MSCs ao longo das passagens celulares.....	39
Figura 10. Análise morfométrica das cAD-MSCs.....	40
Figura 11. Quantificação de células positivas para SA- $\beta$ -gal.....	41
Figura 12. Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio.....	42
Figura 13. Incidência de $\gamma$ -H2AX nas cAD-MSCs amplificadas <i>in vitro</i> .....	43
Figura 14. Ensaio de bloqueio da citocinese.....	44
Figura 15. Linha do tempo da senescência replicativa das cAD-MSCs.....	55
Figura 16. Resumo gráfico.....	56

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Dados dos doadores de tecido adiposo.....	24
---	----

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Anticorpos utilizados para a imunofenotipagem das cAD-MSCs. ....	26
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina Monofosfato
cAD-MSC	Célula Estromal Mesenquimal derivada do Tecido Adiposo Canino
cBM-MSC	Célula Estromal Mesenquimal derivada da Medula Óssea Canino
CDT	Cell Doubling Time
CFU	Colony Forming Units
cMSC	Célula Estromal Mesenquimal canina
CPDL	Cumulative Population Doubling Level
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSB	Quebra de Dupla-fita de DNA
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
hMSC	Célula Estromal Mesenquimal Humana
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica
LACERT	Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual
MSC	Célula Estromal Mesenquimal
SA- $\beta$ -Gal	$\beta$ -Galactosidase Associada à Senescência
SASP	Fenótipo Secretório Associado à Senescência
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDL	Population Doubling Level
PS	Penicilina-Estreptomicina
tBHP	terc-Butil Hidroperóxido

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1	CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS .....	18
<b>1.1.1</b>	<b>Fontes de Obtenção</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Potencial clínico e atividade fisiológica das MSCs</b> .....	<b>19</b>
1.2	MSCS NA MEDICINA VETERINÁRIA .....	19
<b>1.2.1</b>	<b>MSCs Caninas</b> .....	<b>20</b>
1.3	SENESCÊNCIA CELULAR.....	20
<b>1.3.1</b>	<b>Senescência replicativa em cMSCs</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>21</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL .....	22
3.2	DOADORES DE TECIDO ADIPOSEO CANINO.....	23
3.3	OBTENÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO E ISOLAMENTO DE CAD-MSCS .....	24
3.4	CULTIVO E AMPLIFICAÇÃO DE CAD-MSCS .....	25
3.5	CRIOPRESERVAÇÃO.....	25
3.6	CARACTERIZAÇÃO MESENQUIMAL .....	25
<b>3.6.1</b>	<b>Morfologia celular</b> .....	<b>26</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Perfil imunofenotípico</b> .....	<b>26</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Diferenciação Celular</b> .....	<b>27</b>
3.7	ANÁLISE DO FENÓTIPO SENESCENTE.....	27
<b>3.7.1</b>	<b>Capacidade clonogênica</b> .....	<b>27</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Potencial proliferativo</b> .....	<b>28</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Ensaio de fechamento de ferida <i>in vitro</i></b> .....	<b>29</b>
<b>3.7.4</b>	<b>Análise morfológica</b> .....	<b>29</b>
<b>3.7.5</b>	<b>Deteção da atividade da SA-<math>\beta</math>-Gal</b> .....	<b>29</b>
<b>3.7.6</b>	<b>Quantificação de EROs</b> .....	<b>29</b>
<b>3.7.7</b>	<b>Análise da isoforma fosforilada da histona H2A (<math>\gamma</math>-H2AX)</b> .....	<b>30</b>
<b>3.7.8</b>	<b>Análise de alterações nucleares e identificação de morte celular</b> .....	<b>30</b>
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO MESENQUIMAL .....	31

4.1.1	<b>Análise morfológica</b> .....	<b>31</b>
4.1.2	<b>Perfil imunofenotípico</b> .....	<b>32</b>
4.1.3	<b>Análise do potencial de diferenciação mesenquimal</b> .....	<b>33</b>
4.2	<b>EVOLUÇÃO DO FENÓTIPO SENESCENTE EM CAD-MSCS AMPLIFICADAS</b>	<b>34</b>
4.2.1	<b>Capacidade clonogênica de cAD-MSCs</b> .....	<b>34</b>
4.2.2	<b>Potencial proliferativo das cAD-MSCs</b> .....	<b>35</b>
4.2.2.1	Perfil proliferativo dos diferentes cultivos de cAD-MSCs.....	36
4.2.3	<b>Potencial de fechamento de ferida <i>in vitro</i> de cAD-MSCs</b> .....	<b>37</b>
4.2.4	<b>Análise morfométrica de cAD-MSCs amplificadas</b> .....	<b>38</b>
4.2.5	<b>Atividade de SA-<math>\beta</math>-gal em cAD-MSCs</b> .....	<b>40</b>
4.2.6	<b>Avaliação dos níveis de EROs nas cAD-MSCs</b> .....	<b>41</b>
4.2.7	<b>Avaliação da incidência de <math>\gamma</math>-H2AX nas cAD-MSCs</b> .....	<b>42</b>
4.2.8	<b>Avaliação das alterações nucleares e de apoptose me cAD-MSCs</b> .....	<b>44</b>
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
5.1	O TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO COMO UMA FONTE DE CAD-MSCS ...	45
5.2	PARTICULARIDADES DO PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DE CAD-MSCS.....	46
5.3	IMPACTOS DA AMPLIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i> NAS CARACTERÍSTICAS DE CAD-MSCS	47
5.3.1	<b>A capacidade clonogênica das cAD-MSCs é afetada pela amplificação <i>in vitro</i></b> ...	<b>47</b>
5.3.2	<b>O potencial proliferativo das cAD-MSCs é reduzido com a amplificação <i>in vitro</i></b>	<b>48</b>
5.3.3	<b>cAD-MSCs amplificadas apresentam redução do potencial de fechamento de ferida <i>in vitro</i></b> .....	<b>48</b>
5.3.4	<b>cAD-MSCs sofrem alterações morfológicas com o aumento de passagens</b> .....	<b>49</b>
5.3.5	<b>cAD-MSCs apresentam aumento progressivo da atividade de SA-<math>\beta</math>-Gal</b> .....	<b>50</b>
5.3.6	<b>cAD-MSCs apresentam aumento da ocorrência de danos genéticos e EROs em passagem tardia</b> .....	<b>51</b>
5.3.7	<b>A amplificação <i>in vitro</i> reduz a proporção de cAD-MSCs em apoptose</b> .....	<b>52</b>
5.4	CAD-MSCS COMO UM MODELO PARA O ESTUDO DA SENESCÊNCIA CELULAR.....	53
5.5	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>
	<b>APÊNDICE A – TCLE TUTORES/PROPRIETÁRIOS</b> .....	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Células Estromais Mesenquimais

O uso do acrônimo MSCs (do inglês, *Mesenchymal Stromal Cells*) foi popularizado pelo trabalho de Caplan (1991) (CAPLAN, 1991), que as descreveu como “Células-tronco Mesenquimais” devido ao potencial de diferenciação osteogênico e condrogênico de células fibroblastóides obtidas da medula óssea. Contudo, havia sido Friedenstein e colaboradores (1970) os primeiros a isolar e identificar populações de células derivadas desse tecido com características de MSC: células aderentes com capacidade clonogênica e alto potencial proliferativo *in vitro*, bem como multipotencialidade mesenquimal (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970).

Mais tarde, o potencial terapêutico das MSCs foi identificado e, de modo a contribuir para a qualidade dos trabalhos publicados, a Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (ISCT, do inglês *International Society of Cell and gene Therapy*) elaborou, em 2006, um tratado definindo os critérios mínimos para a caracterização destas células (DOMINICI et al., 2006). Desse modo, as MSCs devem possuir: morfologia alongada e fusiforme, capacidade de aderência ao plástico em cultura; perfil imunofenotípico com positividade para marcadores de mesenquimais (CD73, CD90 e CD105) e negatividade para os hematopoiéticos (CD14 ou CD11b, CD34, CD45, CD79 $\alpha$  ou CD19 e HLA-DR) e potencial de diferenciação para osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI et al., 2006). Estes critérios contribuíram para a identificação de diferentes tipos de MSCs e conseqüentemente para o aumento da reprodutibilidade dos trabalhos publicados. Contudo, Renesme e colaboradores (2022) afirmam que são ainda poucos os estudos pré-clínicos e clínicos reportando a aplicação dos critérios da ISCT, revelando a necessidade de pesquisas mais criteriosas e transparentes neste ramo da medicina regenerativa (RENESME et al., 2022).

#### 1.1.1 Fontes de Obtenção

As MSCs podem ser obtidas a partir de diversos tecidos, incluindo medula óssea, tecido dentário, fluido amniótico, cordão umbilical, fígado, tendões, tecido cardíaco e tecido adiposo (COSTELA-RUIZ et al., 2022). Essa grande diversidade de nichos se reflete na heterogeneidade entre MSCs de fontes teciduais distintas particularmente em relação ao potencial proliferativo, terapêutico e de diferenciação celular, e no perfil imunofenotípico, clonogenicidade e rendimento celular por grama de tecido (COSTELA-RUIZ et al., 2022; DELBEN et al., 2021; HUMENIK et al., 2022). Atualmente, as fontes teciduais mais utilizadas

são a medula óssea, o cordão umbilical e o tecido adiposo, por conta da disponibilidade tecidual e porque são eficazes para a obtenção de MSCs com características que se adequam aos critérios mínimos da ISCT e que podem ser expandidas de maneira mais eficiente em laboratório (JOVIC et al., 2022).

### 1.1.2 Potencial clínico e atividade fisiológica das MSCs

Nos organismos vivos, as MSCs contribuem para a manutenção da homeostase tecidual, restaurando os nichos de células-tronco e regulando o processo de regeneração de órgãos e tecidos (SAGARADZE et al., 2020). Acredita-se que as MSCs, além de participar diretamente da regeneração via diferenciação celular, dão suporte ao microambiente onde estão inseridas pela secreção de fatores que controlam a proliferação de células responsáveis pelo nicho de células-tronco local. Além disso, podem secretar componentes de matriz extracelular que fornecem apoio e sustentação para a angiogênese (PITTENGER et al., 2019; SAGARADZE et al., 2020; ZOMER; TRENTIN, 2018). As MSCs podem ainda se diferenciar em outros fenótipos recompondo tecidos danificados; são capazes de migrar para sítios de lesão por quimiotaxia; secretam uma série de moléculas com ação parácrina pró-reparo tecidual; e possuem potencial imunomodulatório, atenuando a resposta inflamatória de maneira direta, via contato célula-célula ou através da secreção de fatores imunossupressores, tornando-as promissoras para aplicações terapêuticas na medicina regenerativa (AYALA-CUELLAR et al., 2019; BAUCHE et al., 2023).

## 1.2 MSCs na Medicina Veterinária

Pesquisas recentes na medicina veterinária têm apresentado resultados positivos quanto à segurança e eficácia da terapia celular com MSCs, especialmente no tratamento de condições do sistema locomotor de caninos e equinos, como osteoartrite, lesões ligamentares e degeneração do disco intervertebral (EL-HUSSEINY et al., 2022; MOCCHI et al., 2020). Neste sentido, animais de companhia têm sido amplamente utilizados como modelo pré-clínico, porém o uso de MSCs em ensaios clínicos na área veterinária contribui também para a medicina humana uma vez que muitas das condições observadas em animais de estimação são análogas às humanas (DIAS et al., 2019; HOFFMAN; DOW, 2016). Sendo assim, uma análise mais detalhada das características das MSCs derivadas de animais de companhia deve ser considerada.

### 1.2.1 MSCs Caninas

A terapia celular com MSCs caninas (cMSCs), já demonstrou ser segura e eficaz para o tratamento de cães com osteoartrite (BRONDEEL et al., 2021; OLSSON et al., 2021), doença inflamatória intestinal (PÉREZ-MERINO et al., 2015), lesão de disco intervertebral (KIM et al., 2016; SARMENTO et al., 2014) e outras doenças imunomediadas (DIAS et al., 2019) e do sistema musculoesquelético (PRZĄDKA et al., 2021). No entanto, tal como na medicina humana, a terapia celular canina também apresenta resultados complexos e divergentes (KANG; PARK, 2020), destacando a importância de avaliar as características das células aplicadas, bem como o melhor protocolo de isolamento, cultivo e expansão para as diferentes fontes de MSCs e condições a serem tratadas.

As MSCs derivadas do tecido adiposo canino (cAD-MSCs, do inglês *canine Adipose Tissue Derived-Mesenchymal Stromal Cells*), vêm se estabelecendo como uma alternativa para ensaios pré-clínicos e clínicos, uma vez que podem ser mais facilmente obtidas em comparação com outras fontes teciduais (RUSSELL et al., 2016; ZHAN et al., 2019). As cAD-MSCs apresentam características comuns às MSCs de outras fontes caninas, porém possuem um alto potencial proliferativo (RUSSELL et al., 2016), o que viabiliza a sua expansão *in vitro* e conseqüentemente o seu uso na medicina regenerativa, visto que o procedimento de terapia celular exige uma grande quantidade de células para aplicação (CHERIAN et al., 2020). Contudo, mesmo com a alta capacidade de proliferação dessas células, a amplificação *in vitro* pode impactar nas características celulares, prejudicando a sua atividade terapêutica (MICLAU et al., 2023). Neste sentido, a senescência das cAD-MSCs expandidas *in vitro* é um obstáculo a ser superado.

### 1.3 Senescência Celular

A senescência celular é um estado de parada do ciclo celular que pode ocorrer após a exposição a agentes estressores bem como em fenômenos fisiológicos como na cicatrização de feridas, desenvolvimento embrionário, supressão de tumores e envelhecimento, ou patológicos como diabetes *mellitus* e determinados processos de tumorigênese (HUANG et al., 2022; KUMARI; JAT, 2021). A senescência resulta na incapacidade de proliferação e na estagnação do ciclo celular em G1 ou G2, acompanhada por diversas alterações celulares e metabólicas associadas ao envelhecimento (DI MICCO et al., 2021; GIRE; DULIĆ, 2015; GONZÁLEZ-GUALDA et al., 2021).

Dentre os vários tipos de senescência, a replicativa foi a primeira e a mais bem descrita, estando associada à exaustão proliferativa resultante da redução dos telômeros após sucessivas divisões celulares (VICTORELLI; PASSOS, 2017). Neste sentido, as MSCs, embora possuam capacidade de autorrenovação, são susceptíveis à senescência replicativa, e com o envelhecimento *in vivo* ou a expansão *in vitro* por um longo período de tempo, desenvolvem alterações associadas à senescência (WENG et al., 2022). Esses fatores contribuem, tanto para as questões que surgem com o envelhecimento, como para a alteração da função regenerativa dessas células.

### 1.3.1 Senescência replicativa em cMSCs

As cMSCs senescentes apresentam muitas características que também são identificáveis nas MSCs humanas (hMSCs). Além da parada no ciclo celular e perda da capacidade proliferativa, a senescência replicativa resulta em alterações morfológicas como achatamento e hipertrofia celular, aumento da atividade da beta-galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -Gal, do inglês *Senescence Associated  $\beta$ -Galactosidase*), presença do fenótipo secretório associado à senescência (SASP, do inglês *Senescence Associated Secretory Phenotype*), reorganização da cromatina, aumento de quebras de dupla fita de DNA (DSBs, do inglês *Double-Strand Breaks*), de níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da expressão de fatores associados à inibição da progressão do ciclo celular, como p21 e p53 (GONZÁLEZ-GUALDA et al., 2021). No entanto, os estudos com cAD-MSCs não descrevem adequadamente o desenvolvimento das características senescentes ao longo do cultivo celular, limitando-se a comparar células em passagem inicial com células em passagem tardia. Isso torna difícil identificar quando exatamente cada parâmetro é alterado. Portanto, uma abordagem mais abrangente que busque traçar uma linha do tempo da senescência replicativa em cAD-MSCs pode ser bastante útil para o desenvolvimento de procedimentos mais eficazes na manipulação dessas células. Desta maneira, este trabalho buscou identificar o surgimento das características senescentes nas cAD-MSCs ao longo da expansão *in vitro*.

## 2 OBJETIVO GERAL

Analisar o desenvolvimento do fenótipo senescente durante a amplificação *in vitro* de Células Estromais Mesenquimais derivadas do tecido adiposo canino (cAD-MSCs).

## 2.1 Objetivos Específicos

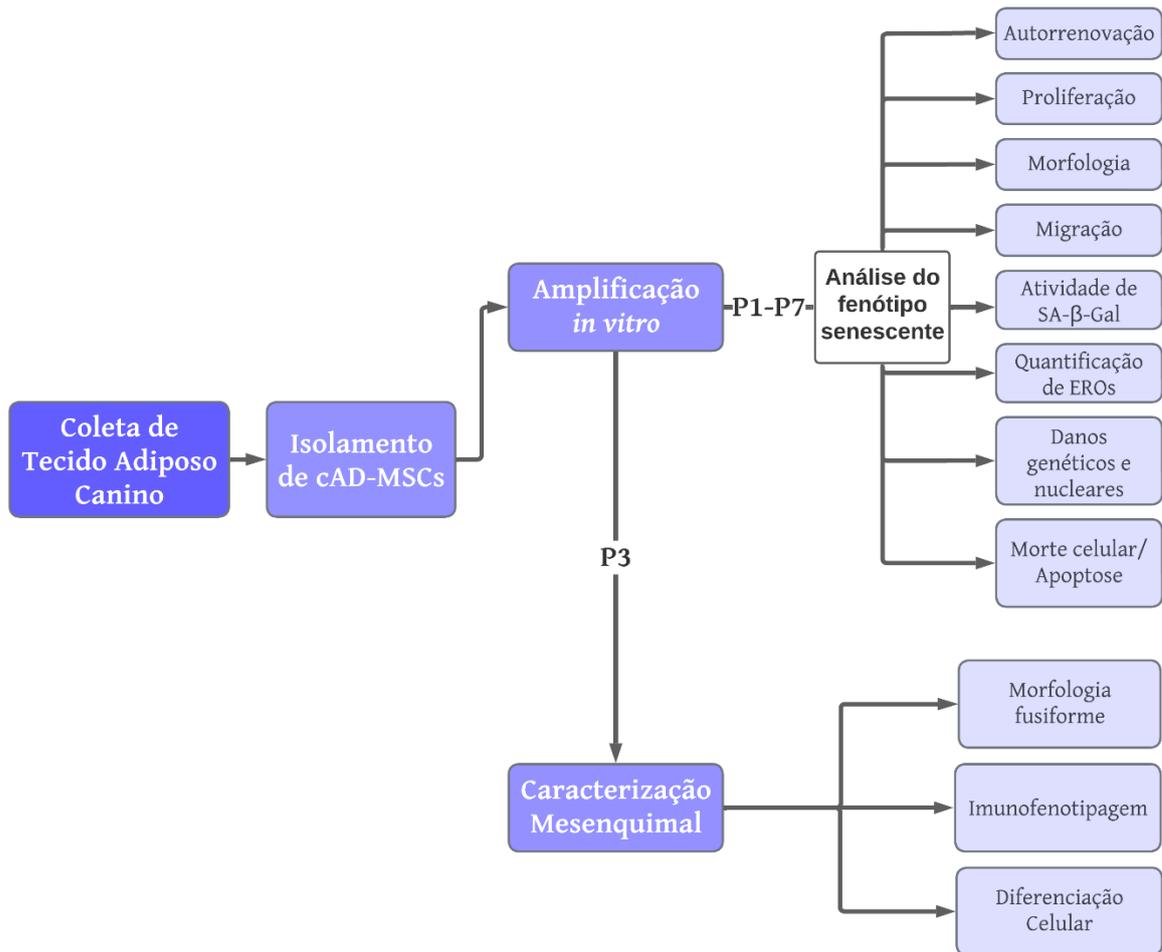
- I. Obter, cultivar e expandir cAD-MSCs a partir do tecido adiposo subcutâneo canino;
- II. Caracterizar as cAD-MSCs quanto às suas características mesenquimais, avaliando:
  - a. morfologia fusiforme/fibroblastóide;
  - b. potencial de diferenciação celular;
  - c. perfil imunofenotípico.
- III. Avaliar a evolução do fenótipo de senescência replicativa através de alterações no(a):
  - a. potencial proliferativo e de autorrenovação;
  - b. morfologia celular;
  - c. migração celular;
  - d. expressão de SA-b-Gal;
  - e. quantidade de espécies reativas de oxigênio;
  - f. ocorrência de morte celular, danos genéticos e nucleares.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Desenho experimental

O trabalho aqui apresentado dividiu-se em três etapas, representadas na Figura 1: (1) Isolamento de cAD-MSCs a partir do tecido adiposo subcutâneo abdominal; (2) caracterização do fenótipo mesenquimal; e (3) amplificação *in vitro* das cAD-MSCs, acompanhada das análises relacionadas à cinética celular e características senescentes ao longo das passagens celulares.

**Figura 1. Desenho experimental.**



cAD-MSCs: Células Estromais Mesenquimais derivadas do Tecido Adiposo canino; EROs: Espécies Reativas de Oxigênio; SA-β-Gal: Beta-Galactosidase Associada à Senescência. Fonte: do autor.

### 3.2 Doadores de tecido adiposo canino

Foram coletados fragmentos de tecido adiposo subcutâneo a partir de cirurgias eletivas de castração em centros de cirurgia veterinária parceiros, na região da grande Florianópolis. Os procedimentos utilizados foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais da UFSC (CEUA-UFSC) sob o número de protocolo 6827240523. O quadro 1 apresenta os dados dos cultivos primários realizados. Para este estudo foram cultivadas cAD-MSCs provenientes de 5 doadores caninos saudáveis (4 fêmeas e 1 macho) com média de idade de 1 ano e 5 meses (DP±11,9 meses) das raças Shih-tzu, Golden Retriever, Spitz Alemão e Akita Americano.

**Quadro 1. Dados dos doadores de tecido adiposo.**

<b>Código do cultivo</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Raça</b>
<b>CV01M</b>	1 ano e 8 meses	Macho	Golden Retriever
<b>CV02F</b>	8 meses	Fêmea	Spitz Alemão
<b>CV03F</b>	3 anos	Fêmea	Shih-tzu
<b>CV04F</b>	1 ano e 7 meses	Fêmea	Shih-tzu
<b>CV05F</b>	6 meses	Fêmea	Akita Americano

### 3.3 Obtenção do tecido adiposo e isolamento de cAD-MSCs

Para o procedimento de obtenção, realizou-se uma secção cirúrgica, por médico veterinário capacitado, na região abdominal dos doadores, onde coletou-se um fragmento de tecido adiposo de cerca de 1-2 cm de diâmetro. Os animais passaram por anestesia compatível com o procedimento cirúrgico de histerectomia ou orquiectomia e tiveram a doação de tecido devidamente autorizada por seus tutores através da assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

Após coleta, os tecidos foram processados no centro cirúrgico, com PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) suplementado com penicilina-estreptomicina (PS) a 1%, e os fragmentos obtidos foram transportados em gelo até o Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) com meio de cultura DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 1% de PS

No LACERT, os tecidos foram submetidos à dissociação mecânica com tesoura e/ou lâmina cirúrgica de bisturi, em placas de 35 mm com cerca de 2 mL de PBS. Os fragmentos obtidos foram então transferidos para tubos de centrifugação (Falcon) de 15 mL onde prosseguiu-se à dissociação enzimática. Nesta etapa, os tecidos foram incubados com 2 mL de colagenase tipo I [2mg/mL] (Sigma-Aldrich – SCR103) por 60 minutos a 37 °C, com agitação a cada 10 minutos. A ação enzimática foi então neutralizada em DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e a suspensão centrifugada (300 g, 5 minutos). O sobrenadante obtido foi descartado, o *pellet* celular ressuspense em 2mL de meio completo (DMEM-10% SFB) e filtrado em membrana de poros de 40 µm (*CellStrainer*, BD Falcon). O volume da fração filtrada foi completado para 8 mL com meio completo e as células distribuídas em duas garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (T25) constituindo a passagem celular (P0). Após 24 horas foi realizada a lavagem da cultura com PBS, seguida pela troca de meio.

### 3.4 Cultivo e amplificação de cAD-MSCs

As culturas de cAD-MSCs foram mantidas em incubadora a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade constante com troca de meio a cada 2-3 dias, até cerca de 80% de confluência. As monocamadas foram então lavadas 2 vezes com PBS e submetidas à tripsinização. A tripsina é uma enzima protease capaz de realizar a quebra de proteínas de adesão celular, possibilitando que as células se soltem da superfície plástica. Para tanto, as células foram incubadas por 5 minutos com solução de tripsina-EDTA a 0,25% e 37 °C. A ação enzimática foi então neutralizada em meio completo e as células obtidas centrifugadas (300 g, 5 minutos). A seguir, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio completo e contadas em Câmara de Neubauer. Por fim, as células foram semeadas na densidade de 5 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> em novos recipientes de cultivo, constituindo passagem 1 (P1), e crescidas até confluência de 80%. O procedimento foi repetido até P7.

### 3.5 Criopreservação

Monocamadas de MSCs em P1 foram coletadas por tripsinização como descrito acima (tópico 3.4) e ressuspensas em meio de congelamento composto por 90% de SFB e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO). Após, 1 x 10<sup>6</sup> células/mL foram acondicionadas em criotubos, devidamente identificados, e mantidas em recipiente *CoolCell® Cell Freezing Container* a -80 °C por 24 horas. A seguir, os criotubos foram transferidos para containers de nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenados até o uso.

Para o descongelamento, 1 mL de meio completo em temperatura ambiente foi adicionado ao conteúdo dos criotubos e homogeneizado com o auxílio de micropipeta. A seguir, a suspensão celular foi transferida para tubo de centrifugação, completada para 8 mL em meio completo e centrifugada (300 g, 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspenso em 2 mL de meio completo. Uma alíquota de 10 µL foi corada com azul de Tripán a 0,4%, as células viáveis foram contabilizadas em Câmara de Neubauer e semeadas na densidade de 5 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>. Foram mantidas as condições de cultivo descritas anteriormente (tópico 3.4).

### 3.6 Caracterização Mesenquimal

A caracterização do fenótipo mesenquimal foi realizada em P3 conforme o preconizado pela ISCT (DOMINICI et al., 2006) no cultivo CV01M. Avaliou-se a morfologia, perfil imunofenotípico e capacidade de diferenciação mesenquimal.

### 3.6.1 Morfologia celular

A morfologia mesenquimal fusiforme/fibroblastóide característica foi avaliada em microscópio invertido de contraste de fase CK40® (Olympus) após 3-5 dias de cultivo. As imagens foram capturadas em sistema de captura de imagens OptiCam nos aumentos de 100 e 200x.

### 3.6.2 Perfil imunofenotípico

Foi avaliado por citometria de fluxo a presença dos marcadores mesenquimais CD73, CD90 e CD105 e ausência dos marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45. Para isso, as MSCs foram obtidas por tripsinização e acondicionadas em tubos de citometria na densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL. Em seguida, foram incubadas (1 hora, 4 °C) com os anticorpos específicos para cada marcador conjugados a diferentes fluorocromos (Tabela 1). A leitura foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD, Bioscience) com laser de excitação 458 nm com filtros na faixa de emissão do FITC (515-545 nm), PE (564-606 nm) e PerCP-Cy5.5 (670-735 nm). Os dados da citometria foram obtidos com o padrão de 10.000 eventos e analisados com o *Flowing software* 2.0 (Turku Centre for Biotechnology).

**Tabela 1. Anticorpos utilizados para a imunofenotipagem das cAD-MSCs.**

Anticorpo	Diluição	Fluorocromo
Anti-CD34 (BD Pharmingen™ - 555822)	1:50	PE
Anti-CD45 (BD Pharmingen™ - 555482)	1:50	FITC
Anti-CD73 (BD Pharmingen™ - 550257)	1:50	PE
Anti-CD90 (BD Pharmingen™ - 555595)	1:100	FITC
Anti-CD105 (BD Pharmingen™ - 560819)	1:50	PerCP-Cy5.5

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP-Cy5.5: proteína clorofila peridina-cianina5.5.

### 3.6.3 Diferenciação Celular

A avaliação da capacidade de diferenciação mesenquimal de cMSCs foi realizada após cultivo com os meios de indução Gibco *Stempro Adipogenesis*, *Osteogenesis* e *Chondrogenesis differentiation kit* (Thermo Fisher Scientific) com adaptações ao protocolo do fabricante. Para a diferenciação adipogênica e osteogênica as células foram plaqueadas na densidade de  $4 \times 10^3$  células por poço em placas de 24 poços e cultivadas por 21 dias no meio indutivo específico. As células foram então fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos. Como controle negativo foi utilizado o cultivo com meio DMEM-10% SFB. A diferenciação adipogênica foi observada pela presença de gotículas lipídicas após coloração com *Oil Red O*, por 20 minutos. Já a diferenciação osteogênica foi visualizada pela presença dos depósitos de matriz extracelular calcificada após coloração com *Alizarin Red S*, por 30 minutos.

Uma vez que a diferenciação condrogênica exige uma densidade celular alta para que ocorra de maneira adequada,  $8 \times 10^4$  células foram plaqueadas com 5  $\mu$ L de meio de cultura completo em gota no centro de cada poço de placas de 24 poços e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após esse período de adesão, 500  $\mu$ L de meio de diferenciação condrogênica foram adicionados cuidadosamente. As células foram então cultivadas por 21 dias, com troca de meio a cada 2-3 dias. Após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (30 minutos) e coradas com *Alcian Blue* 1% (30 minutos) evidenciando o acúmulo da matriz extracelular condrogênica. As imagens foram obtidas em sistema de captura do microscópio invertido IX83® Olympus.

## 3.7 Análise do fenótipo senescente

A evolução do fenótipo senescente das cAD-MSC foi detectada por alterações na morfologia, capacidade clonogênica, proliferação e migração celular; e presença de características relacionadas à senescência como o aumento da atividade de SA- $\beta$ -Gal, produção de EROs e ocorrência de danos genéticos e nucleares entre P1-P7.

### 3.7.1 Capacidade clonogênica

As cAD-MSC foram semeadas em baixa densidade ( $6 \times 10^2$  células/poço) em placas de 6 poços e mantidas por 14 dias em condições padrões de cultivo (tópico 3.4). A seguir, as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e coradas com cristal violeta 0,5% por 15 minutos. As culturas foram analisadas em estereomicroscópio SZX16® (Olympus) e as imagens capturadas em câmera DP73® (Olympus) via sistema de captura CellSens

Dimension. A eficiência clonal foi calculada pelo percentual de unidades formadoras de colônias (CFU, do inglês *Colony Forming Units*) visualizadas em relação ao número de células plaqueadas. A área das colônias foi medida pelo *software* ImageJ (NIH) para avaliação do tamanho das colônias. O ensaio foi realizado em triplicata experimental em P1, P3, P5 e P7.

### 3.7.2 Potencial proliferativo

O potencial de proliferação celular foi avaliado pela construção da curva do *Cumulative Population Doubling Level* (CPDL) e do *Cell Doubling Time* (CDT). O PDL (do inglês, *Population Doubling Level*) estima o número de vezes que uma população celular duplicou em um determinado intervalo de tempo, desta forma a construção da curva de CPDL, o PDL cumulativo, pode representar quantas vezes determinada população duplicou ao longo das passagens analisadas. Já o CDT avalia o tempo estimado de duplicação celular e pode contribuir para uma melhor compreensão da cinética de crescimento populacional. Para este ensaio,  $1 \times 10^4$  células foram semeadas em poços de placas de 24 poços e contabilizadas após 24 e 120 horas de cultivo em condição padrão. Para a obtenção das células cultivadas utilizou-se o método de tripsinização, descrito no tópico 3.4. Os resultados foram obtidos através das fórmulas (CORIELL INSTITUTE, 2021; ROTH,2006):

$$\mathbf{CPDL} = \mathbf{PDL0} + 3,32 \times (\log N_f - \log N_i)$$

Onde:

CPDL = Nível cumulativo de duplicação da população

PDL0 = Nível de duplicação inicial/anterior da população

Ni = Número inicial de células

Nf = Número final de células

$$\mathbf{CDT} = \frac{t \times \log(2)}{\log(N_f) \times \log(N_i)}$$

Onde:

CDT = Tempo de duplicação celular

Ni = Número inicial de células

Nf = Número final de células

t = Tempo de cultivo

### 3.7.3 Ensaio de fechamento de ferida *in vitro*

A capacidade migratória das cAD-MSC foi verificada pelo ensaio de fechamento de ferida *in vitro* (*Scratch assay*). Para isso,  $2 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de 24 poços e, após confluência de 100%, foi realizada uma lesão mecânica na monocamada de células com uma ponteira descartável de 100 $\mu$ L. As culturas foram então incubadas por 2 horas com mitomicina [20 $\mu$ g/mL] (Sigma-Aldrich – M4287). A seguir, os poços foram lavados com PBS e fotografados em microscópio invertido de contraste de fase Olympus CK40® (100x). A área da lesão foi medida imediatamente, 24 e 48 horas após o procedimento com auxílio do *software* ImageJ para o cálculo do percentual de fechamento.

### 3.7.4 Análise morfológica

A morfologia das cAD-MSCs em P1, P3, P5 e P7 foi analisada por microscopia de contraste de fase, três dias após as semeaduras. As imagens de 10-20 campos aleatórios de cada cultivo em expansão foram capturadas em aumento de 100x. Foi realizada então a análise morfométrica com auxílio do *software* ImageJ (NIH) com a quantificação da área, comprimento e largura de 50 células por cultivo. Foi calculado o quociente entre o maior eixo (comprimento) pelo menor eixo (largura).

### 3.7.5 Detecção da atividade da SA- $\beta$ -Gal

A detecção da atividade da enzima SA- $\beta$ -Gal foi realizada utilizando-se o *beta Galactosidase Detection Kit* (Abcam – ab102534) com pequenas alterações ao protocolo do fabricante. Para isso, foram semeadas  $4 \times 10^3$  células por poço em placas de 24 poços. As cAD-MSC foram mantidas em condições padrões de cultivo e analisadas no quinto dia após o plaqueamento. As culturas foram então fixadas e incubadas durante 24 horas (37° C) com o mix de X-Gal fornecido pelo kit. Após 24 horas, a solução foi substituída por PBS e as culturas analisadas em microscópio invertido para a quantificação das células positivas para SA- $\beta$ -Gal. Foram analisados 10 campos aleatórios por poço de placas de 24 poços em P1, P3, P5 e P7 no aumento de 100x. O ensaio foi realizado em triplicata técnica.

### 3.7.6 Quantificação de EROs

Foi realizada por espectrofotometria de fluorescência com o uso do kit *Cellular ROS Assay* - DCFDA/H2DCFDA (Abcam – ab113851) com adaptações ao protocolo do fabricante.

Resumidamente,  $2,5 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de 96 poços e cultivadas por 24 horas. As cAD-MSCs foram então incubadas por 45 minutos com DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína)  $20\mu\text{M}$  e em seguida analisadas na multileitora de microplacas Infinite M200 (Tecan) no modo de fluorescência pontual em comprimento de onda de 485nm de excitação e 535nm de emissão. A quantificação de EROs foi realizada pela obtenção dos valores de *fold change*, quociente que representa a intensidade de fluorescência nos poços tratados com relação ao controle não-tratado com DCFDA. Como controle positivo, foram utilizadas cAD-MSCs tratadas por 4 horas com tBHP (Terc-Butil Hidroperóxido)  $110\mu\text{M}$ , um indutor de EROs. Os ensaios foram realizados em triplicata experimental.

### 3.7.7 Análise da isoforma fosforilada da histona H2A ( $\gamma$ -H2AX)

Os danos de quebra de dupla fita foram avaliados pela identificação de focos de  $\gamma$ -H2AX no núcleo das células. Para este fim,  $5 \times 10^3$  cAD-MSCs foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas em condições padrões de cultivo. Após 5 dias, as células foram fixadas por 30 minutos com paraformaldeído 4% e permeabilizadas com PBS-Triton a 0,25%, por 30 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com SFB 5% por 40 minutos e as células incubadas com o anticorpo primário (*Anti-p-histone H2A, clone JBW301 ZooMAb® Mouse Monoclonal - IgG1*) (1:500) por 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período, as cAD-MSCs foram lavadas com PBS-Tween a 0,05% e incubadas com o anticorpo secundário (*Anti-mouse IgG1 - FITC*) (1:250) por 1 hora, protegido da luz. Por fim, as células foram lavadas com PBS e os núcleos corados com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), por 30 segundos. A presença de focos de  $\gamma$ -H2AX foi avaliada por microscópio invertido de fluorescência IX83® Olympus (Ex = 450-490nm/Em = 500-550nm). Foram fotografados 10 campos aleatórios de cada replicata, onde avaliou-se a proporção de células  $\gamma$ -H2AX positivas com auxílio do *software* ImageJ. As análises foram realizadas em duplicata experimental.

### 3.7.8 Análise de alterações nucleares e identificação de morte celular

Para tanto, as cAD-MSCs foram cultivadas em garrafas de cultivo T25 em condições padrão até confluência de 70%. A seguir, as culturas foram incubadas por 24 horas com citocalasina-B (Sigma-Aldrich - C6762) [ $4\mu\text{g/mL}$ ] para bloqueio da citocinese. As células foram então tripsinizadas, como descrito anteriormente (tópico 3.4), e fixadas com metanol-ácido acético (9:1) gelado. A seguir, as cAD-MSCs foram aplicadas em lâminas de histologia (em triplicata) e coradas com Giemsa por 8 minutos. As células foram analisadas em

microscópio óptico Olympus BX41 e as imagens capturadas em *scanner* de lâminas Axio Scan (Zeiss) em aumento de 200x. Foram quantificadas 600 células binucleadas em cada replicata e verificada a ocorrência das alterações nucleares dos tipos: micronúcleos, brotos nucleares, pontes nucleoplasmáticas e de células com núcleos picnóticos ou corpos apoptóticos (morte celular).

### 3.8 Análise estatística

Diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. Os valores foram expressos em média  $\pm$  DP e a significância considerada quando  $p < 0,05$ . Quando aplicável, foi utilizado a identificação de *outliers* por ROUT ( $Q = 1\%$ ). As análises foram realizadas com auxílio do *software* GraphPad Prism 9.

## 4 RESULTADOS

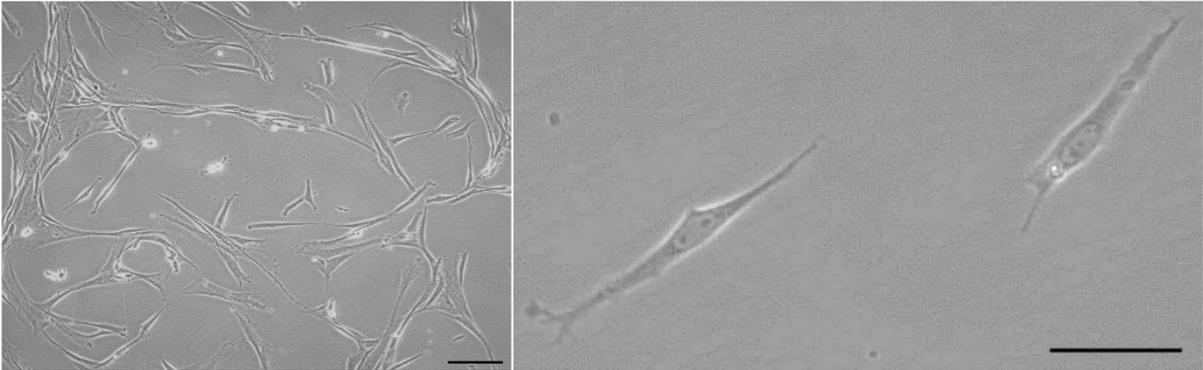
### 4.1 Caracterização do fenótipo mesenquimal

Inicialmente foi verificado se as células isoladas e cultivadas apresentavam o fenótipo mesenquimal conforme parâmetros estabelecidos pela ISCT pela avaliação da morfologia, perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação celular. A análise foi realizada com o primeiro cultivo obtido (CV01M) em P3, a fim de validar a efetividade dos protocolos de obtenção e cultivo de cAD-MSCs.

#### 4.1.1 Análise morfológica

A análise da morfologia celular revelou que a grande maioria das células possuíam capacidade de adesão ao plástico e o formato fusiforme/fibroblastóide característico das MSCs (Figura 2).

**Figura 2. As células isoladas apresentam morfologia de MSC.**

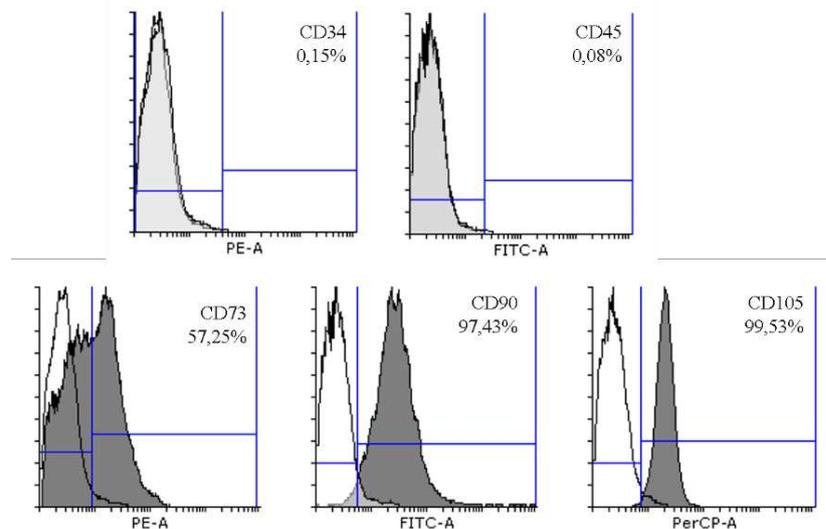


Imagens representativas obtidas por microscopia de contraste de fase das células obtidas em P3, no terceiro dia de cultivo celular. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.2 Perfil imunofenotípico

A análise de citometria de fluxo dos marcadores de superfície celular demonstrou compatibilidade do perfil imunofenotípico das células isoladas com o de MSCs. Foi encontrado positividade para os marcadores mesenquimais CD90 (= 97,43%) e CD105 (= 99,53%) e negatividade para os marcadores hematopoiéticos CD34 (= 0,15%) e CD45 (= 0,08%). O marcador mesenquimal CD73 foi expresso em 57,25% das cAD-MSCs. A figura 3 ilustra os gráficos e a proporção de células positivas para os marcadores analisados.

**Figura 3. As células isoladas apresentam perfil imunofenotípico de MSC.**

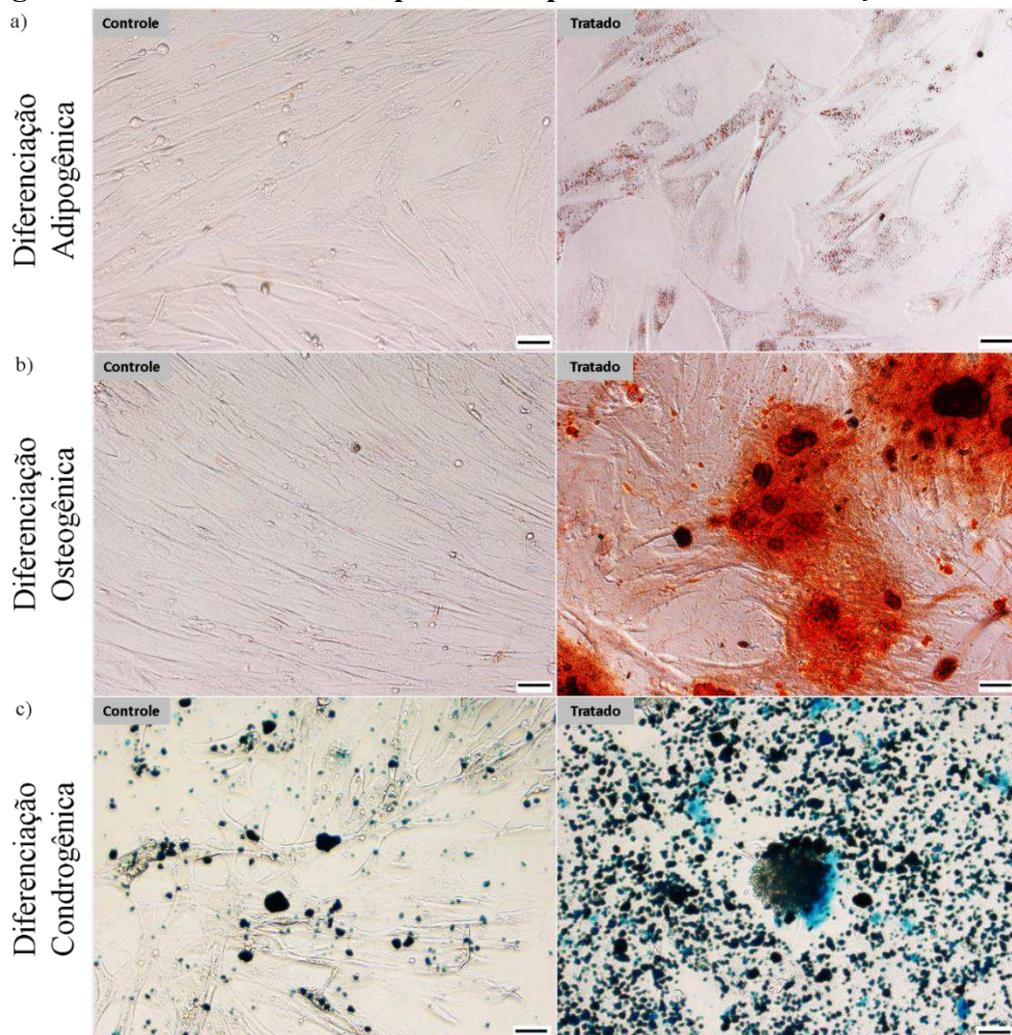


Histogramas representativos obtidos por citometria de fluxo demonstrando a porcentagem de positividade de marcadores de superfície. Os gráficos apresentam a intensidade de emissão de fluorescência (eixo X) pelo número de eventos (eixo Y). Histograma branco = amostras não tratadas com os anticorpos conjugados aos fluorocromos. Histograma cinza = amostras tratadas com os anticorpos conjugados aos fluorocromos (PE, FITC e PerCP-Cy5.5).

#### 4.1.3 Análise do potencial de diferenciação mesenquimal

O ensaio de diferenciação celular revelou que as células isoladas apresentam potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, conforme parâmetros da ISCT para MSCs. As células cultivadas em condições indutivas adipogênicas apresentaram gotículas lipídicas evidenciadas pela coloração em vermelho sugerindo processo de adipogênese (Figura 4a). Além disso, pôde-se observar a deposição de matriz extracelular calcificada corada em vermelho, sugerindo processo de osteogênese nas culturas em condições osteogênicas (Figura 4b) e o acúmulo de proteoglicanos de matriz extracelular (em azul) no aglomerado celular em condrogênese nas culturas em condições condrogênicas (Figura 4c).

**Figura 4.** As células isoladas apresentam potencial de diferenciação de MSC.



a) Diferenciação adipogênica de cAD-MSCs. As gotículas lipídicas estão coradas em vermelho com *Oil Red O*.

b) Diferenciação osteogênica de cAD-MSCs. A matriz extracelular foi marcada com *Allizarin Red S*. c)

Diferenciação condrogênica de cAD-MSCs. Acúmulos de proteoglicanos de matriz extracelular evidenciados

por *Alcian Blue*. Controle = cAD-MSCs não-tratadas com meio de indução de diferenciação; Tratado = cAD-MSCs tratadas com meio de indução de diferenciação. As imagens representam o ensaio de diferenciação realizado com uma replicata biológica, em triplicata técnica. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

Em conjunto, os resultados acima demonstram que as células isoladas de tecido adiposo canino e cultivadas nas condições utilizadas apresentam capacidade de adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide, perfil imunofenotípico e capacidade de diferenciação para fenótipos mesenquimais. Desse modo, atendem aos critérios estabelecidos pela ISCT para serem consideradas MSCs e serão chamadas neste estudo de MSC derivadas do tecido adiposo canino (cAD-MSCs).

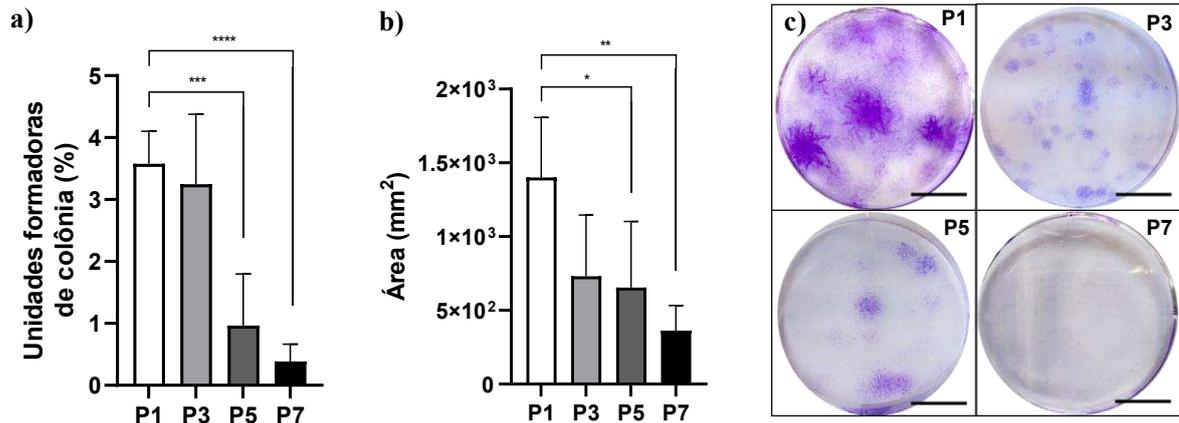
## 4.2 Evolução do fenótipo senescente em cAD-MSCs amplificadas

### 4.2.1 Capacidade clonogênica de cAD-MSCs

O potencial proliferativo e de autorrenovação é uma característica intrínseca das células-tronco (ITO; SUDA, 2014) podendo ser inferidos pela avaliação da capacidade de formação de colônias (CHAN; NG; YEUNG, 2011) e influenciado pela senescência e expansão *in vitro* (WENG et al., 2022).

O resultado do ensaio de unidades formadoras de colônias revelou uma redução da eficiência clonal de cAD-MSCs em P5 ( $0,96 \pm 0,83\%$ ) ( $p < 0,0005$ ) e P7 ( $0,39 \pm 0,28\%$ ) ( $p < 0,0001$ ), em comparação à P1 ( $3,58 \pm 0,53\%$ ) (Figura 5a). A área das colônias formadas seguiu a mesma tendência, com redução a partir de P5 ( $654,22 \pm 447,66 \text{mm}^2$ ) ( $p < 0,05$ ), intensificando-se em P7 ( $362,05 \pm 170,35 \text{mm}^2$ ) ( $p < 0,01$ ), em comparação com P1 ( $1400,07 \pm 406,8 \text{mm}^2$ ) (Figura 5b). A área das colônias em P3 ( $730,67 \pm 415,36 \text{mm}^2$ ) apresentou uma tendência à redução do tamanho, porém não foi constatada diferença estatística em comparação à P1 ( $p = 0,0551$ ). A Figura 5c apresenta imagens representativas do potencial clonogênico das cAD-MSCs nas passagens avaliadas.

**Figura 5. Capacidade clonogênica das cAD-MSCs amplificadas.**



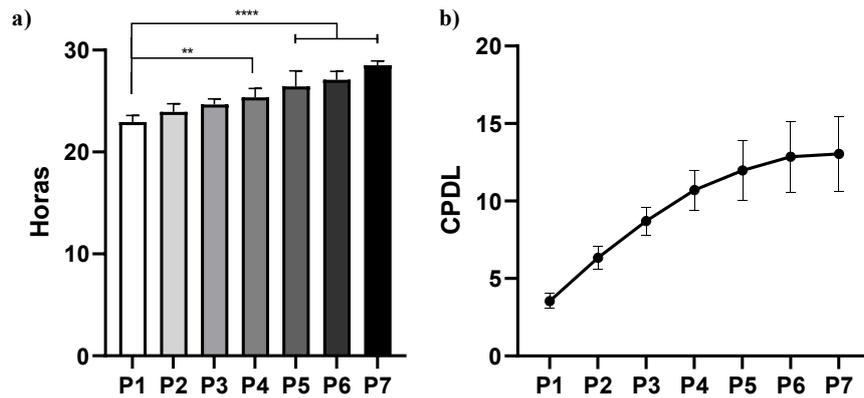
a) Porcentagem de unidades formadoras de colônia (CFU) de cAD-MSCs nas passagens analisadas; b) Área média das colônias analisadas. Valores expressos em mm<sup>2</sup>. c) Imagem representativa das CFUs em cada passagem analisada. Os dados representam média±DP de 5 replicatas biológicas (n=5) em triplicata técnica. A comparação entre passagens foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001. Barra de escala = 10 mm.

#### 4.2.2 Potencial proliferativo das cAD-MSCs

A análise da capacidade proliferativa é uma maneira eficiente de identificar populações que podem estar entrando em um processo de senescência associado ao alcance do limite de Hayflick (DELBEN et al., 2021; HAYFLICK; MOORHEAD, 1961).

A análise do perfil proliferativo, revelou que as cAD-MSCs amplificadas começam a apresentar diminuição da sua capacidade de proliferação a partir de P4, se acentuando em P5 e nas passagens seguintes, verificado pelo aumento do tempo de duplicação celular (CDT) em comparação com as passagens anteriores (Figura 6a). Com base na quantificação do CPDL ao longo das passagens, foi possível construir a curva de crescimento das cAD-MSCs que demonstra redução progressiva no potencial proliferativo a partir de P4 atingindo um *plateau* em P6 (CPDL = 13,04±2,4) (Figura 6b).

**Figura 6. Perfil proliferativo de cAD-MSCs amplificadas *in vitro*.**

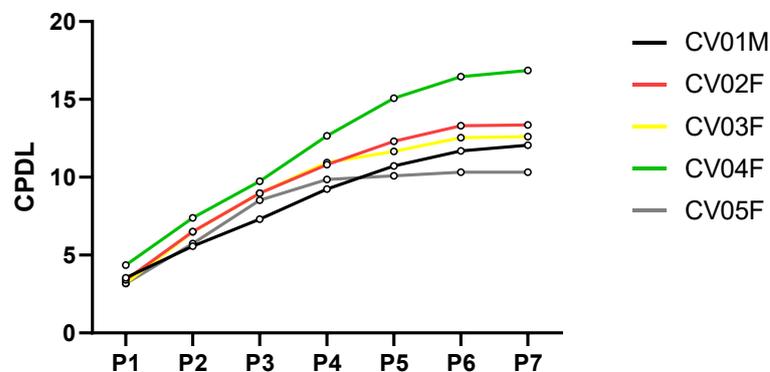


a) Tempo de duplicação celular (CDT, do inglês *Cell Doubling Time*) expresso em horas; b) Índice cumulativo do nível de duplicação da população (CPDL, do inglês *Cumulative Population Doubling Level*). Os pontos representam o CPDL médio de cada passagem celular. Os dados representam a média±DP de 5 replicatas biológicas (n=5) em duplicata técnica. A comparação entre passagens foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001.

#### 4.2.2.1 Perfil proliferativo dos diferentes cultivos de cAD-MSCs

Apesar das cAD-MSCs de diferentes doadores apresentarem perfil de crescimento celular semelhante, a intensidade proliferativa variou. As células CV04F, cultivo mais proliferativo, registraram um CPDL 1,6x maior em P7 (16,85) do que as CV05F (10,33), cultivo menos proliferativo. A figura 7 ilustra a curva de PDL cumulativo dos diferentes cultivos.

**Figura 7. CPDL dos diferentes cultivos de cAD-MSCs**

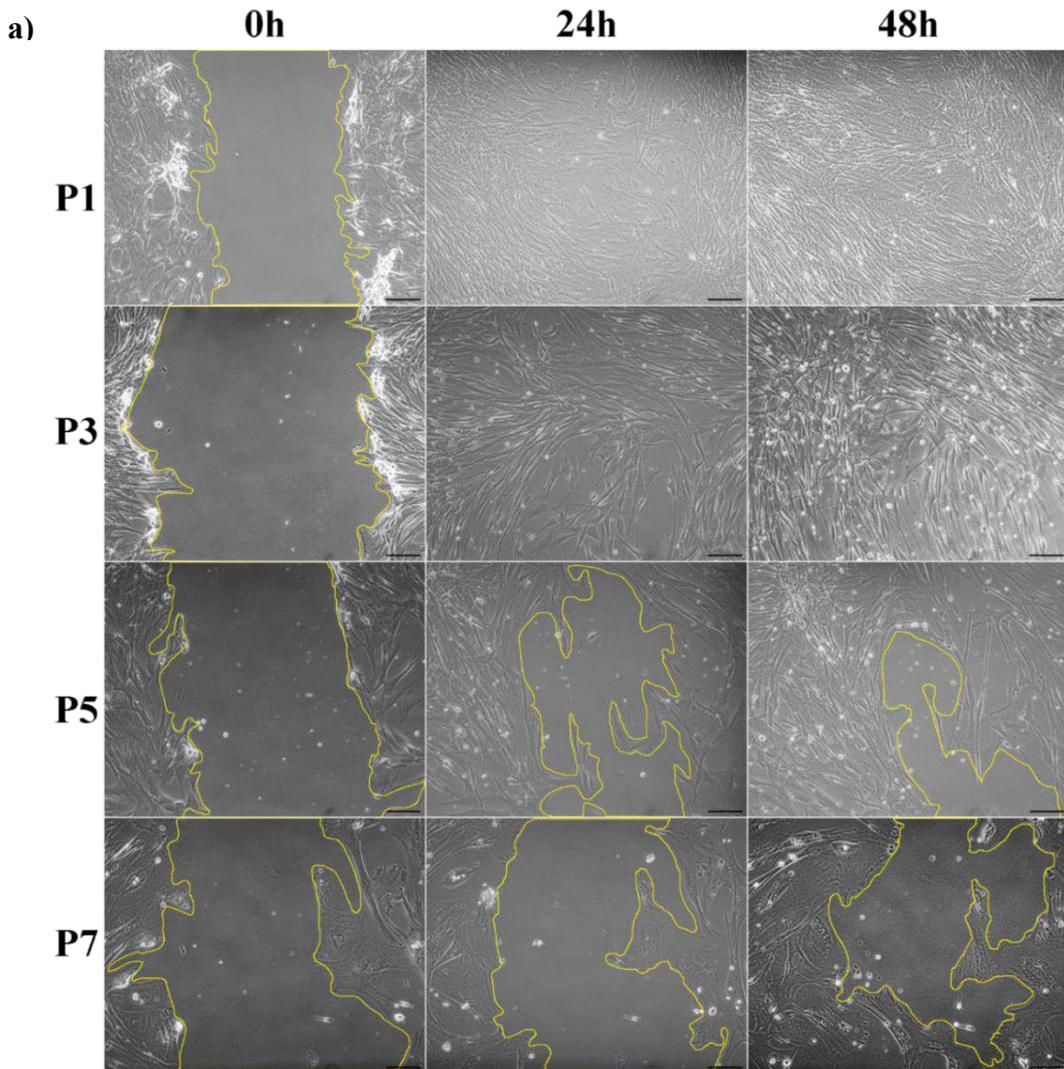


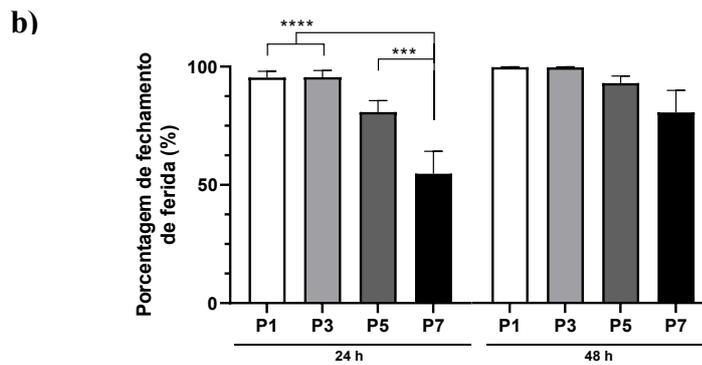
Os pontos representam os valores de CPDL (*Cumulative Population Doubling Level*) de cada replicata biológica nas passagens analisadas. Cada cultivo foi obtido de um doador diferente conforme descrito em materiais e métodos.

#### 4.2.3 Potencial de fechamento de ferida *in vitro* de cAD-MSCs

O *Cell Scratch Assay* é um ensaio utilizado para análise migratória e de capacidade de fechamento de ferida *in vitro* (JUSTUS et al., 2014). Com este método verificou-se que cAD-MSCs em P7 apresentam redução significativa da capacidade de fechamento de ferida, 24 horas após a lesão comparado a P1 e P3 (ambos  $p < 0,0001$ ) e P5 ( $p < 0,001$ ) (Figura 8b). Estes resultados indicam diminuição da capacidade migratória das cAD-MSCs expandidas *in vitro*. A figura 8a ilustra o fechamento de ferida *in vitro* ao longo do período analisado, nas diferentes passagens.

Figura 8. Potencial de fechamento de ferida *in vitro* das cAD-MSCs.



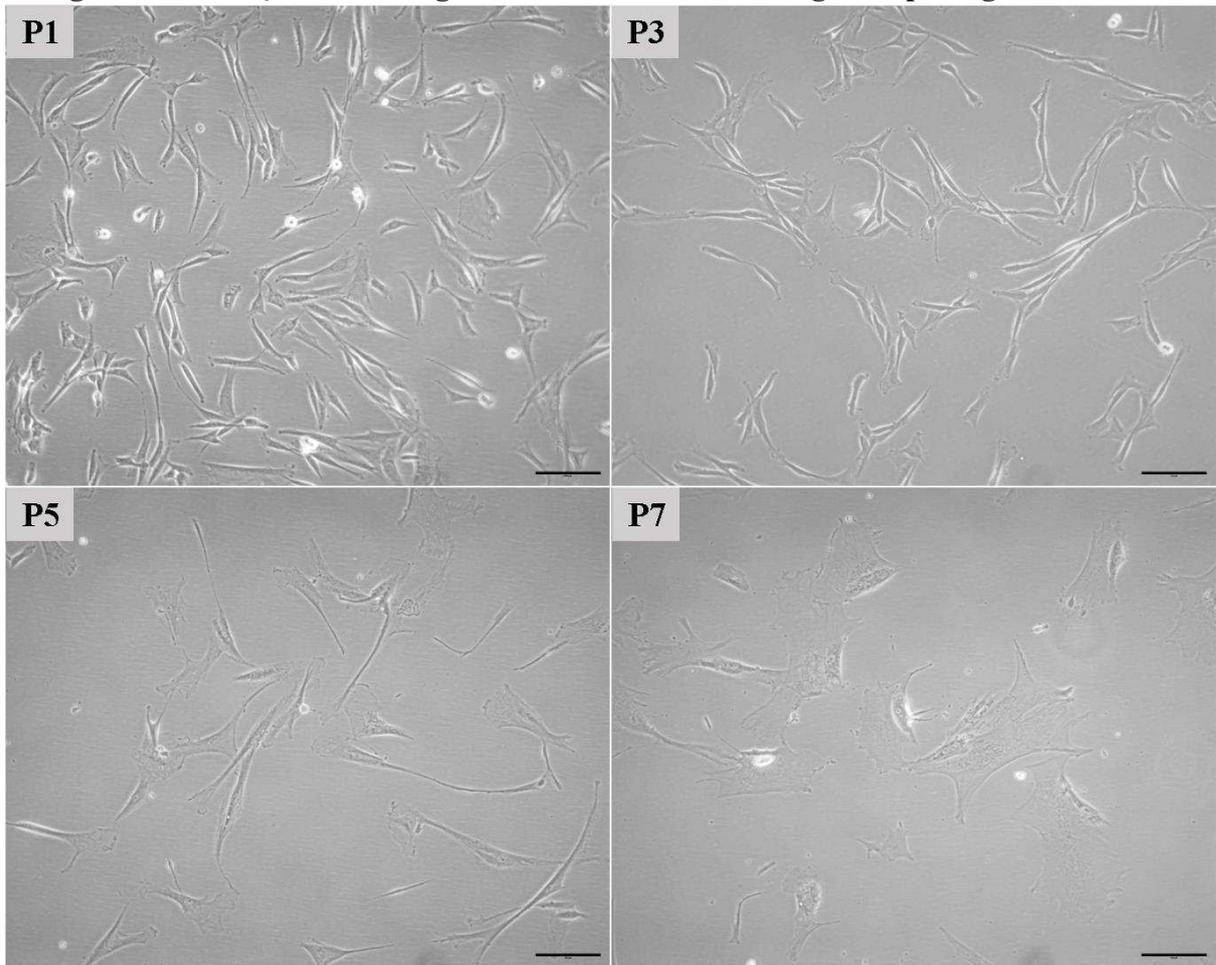


a) Micrografias representativas do *Cell Scratch Assay*, nas passagens e nos períodos analisados. b) Avaliação quantitativa do potencial de fechamento de ferida nas diferentes passagens celulares. Os dados representam média±DP de 5 replicatas biológicas em triplicata técnica. A comparação entre passagens foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.4 Análise morfométrica de cAD-MSCs amplificadas

Uma das principais características que pode ser constatada visualmente quanto ao fenótipo senescente é a hipertrofia e o achatamento celular (WENG et al., 2022). Este parâmetro pode ser facilmente avaliado por microscopia de contraste de fase das células durante o seu cultivo. Aqui, as cAD-MSCs amplificadas *in vitro* apresentaram alterações morfológicas, como aumento da área e achatamento celular como resultado do aumento no número de passagens (Figura 9).

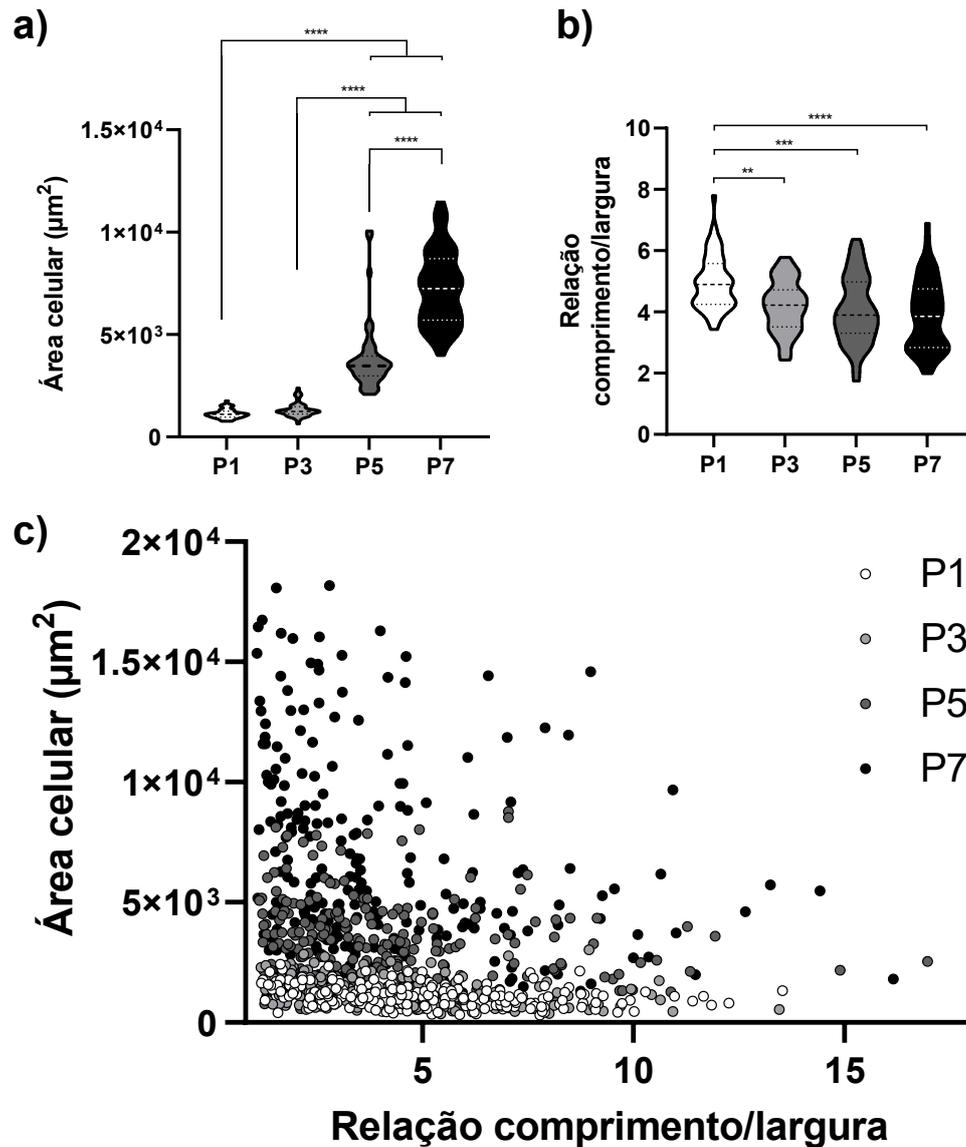
**Figura 9. Alterações morfológicas das cAD-MSCs ao longo das passagens celulares.**



Fotografias representativas da morfologia celular das cAD-MSCs em microscopia de contraste de fase, em diferentes passagens. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

A análise morfométrica revelou aumento progressivo na área das cAD-MSCs a partir de P5 (Figura 10a), bem como redução da relação comprimento/largura a partir de P3 (Figura 10b). A área média em P5 ( $3815 \pm 1622 \mu\text{m}^2$ ) e P7 ( $7281 \pm 1820 \mu\text{m}^2$ ) foi cerca de 3,1 e 5,9 vezes maior do que em P1 ( $1228 \pm 222,9 \mu\text{m}^2$ ), respectivamente ( $p < 0,0001$ ). Além disso, a relação comprimento/largura das cAD-MSCs reduziu a partir de P3 ( $4,18 \pm 2,16$ ) em comparação a P1 ( $4,95 \pm 2,41$ ) ( $p < 0,01$ ), progredindo em P5 ( $4,05 \pm 2,53$ ) ( $p < 0,001$ ) e em P7 ( $3,90 \pm 2,67$ ) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 10b), indicativo de achatamento celular com as passagens. A área e a relação comprimento/largura das células individualizadas está representado na figura 10c, após remoção de *outliers*.

Figura 10. Análise morfométrica das cAD-MSCs.



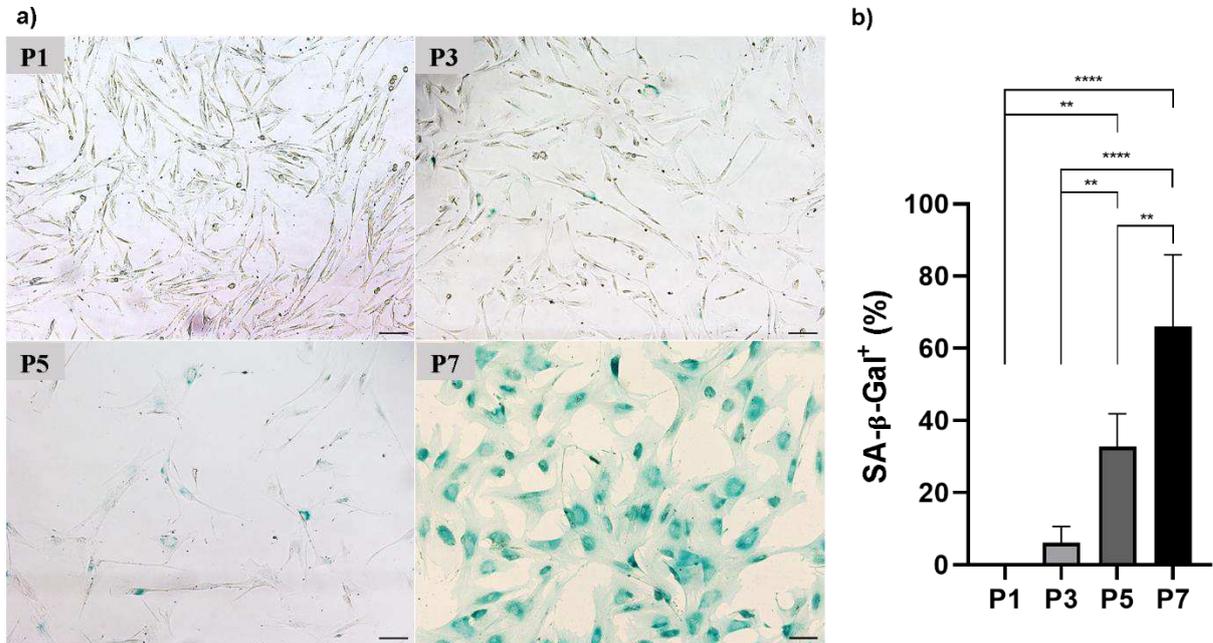
a) Quantificação da área celular (em  $\mu\text{m}^2$ ) e da b) Relação comprimento/largura de cAD-MSCs amplificadas *in vitro*. c) *Dot plot* da área celular e da relação comprimento/largura das cAD-MSCs analisadas; *outliers* foram identificados e removidos por ROUT (Q = 1%). Os valores representam a média  $\pm$  DP dos dados morfológicos de 50 células individualizadas por passagem de 5 replicatas biológicas (n=5). Foi avaliado um total de 1000 células (250 células por passagem celular). A comparação entre passagens foi realizada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

#### 4.2.5 Atividade de SA- $\beta$ -gal em cAD-MSCs

A atividade da SA- $\beta$ -gal é uma das características de células senescentes (DEBACQ-CHAINIAUX et al., 2009; GONZÁLEZ-GUALDA et al., 2021). Aqui, foi observado um aumento progressivo no percentual de células positivas para a atividade de SA- $\beta$ -gal, em relação ao número total de células com as passagens (Figura 11a). Os valores expressivos foram

detectados a partir de P5 onde  $32,72 \pm 9,14\%$  das cAD-MSCs avaliadas apresentaram positividade para a atividade de SA- $\beta$ -gal ( $p < 0,01$ ), em comparação a P1 ( $0,12 \pm 0,18\%$ ) e P3 ( $6,11 \pm 4,48\%$ ) se acentuando em P7 com  $66,08 \pm 19,88\%$  das células positivas (Figura 11b).

**Figura 11. Quantificação de células positivas para SA- $\beta$ -gal.**



a) Fotografias representativas da presença de atividade de SA- $\beta$ -gal ( $\beta$ -Galactosidase Associada à Senescência) nas diferentes passagens por microscopia óptica de luz (aumento de 100x). b) Quantificação da porcentagem de células positivas para atividade de SA- $\beta$ -gal nas passagens avaliadas. Os dados representam média $\pm$ DP de 5 replicatas biológicas em triplicata técnica. A comparação entre passagens foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Barra de escala = 100  $\mu$ m.

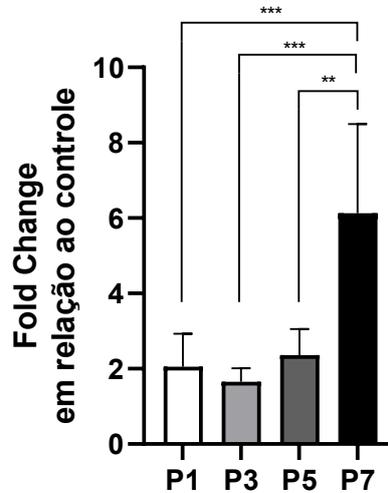
#### 4.2.6 Avaliação dos níveis de EROs nas cAD-MSCs

Estresse oxidativo e senescência celular são processos intimamente correlacionados uma vez que a senescência replicativa pode resultar no aumento de EROs e assim prejudicar as propriedades terapêuticas das MSCs (ZHONG et al., 2021). Neste sentido, a quantificação de EROs, por meio da intensidade de fluorescência resultante da oxidação do DCFDA, apresenta-se como um ensaio com relativa sensibilidade que pode ser empregado para identificar o estresse oxidativo na cultura celular de MSCs.

Os resultados da quantificação de EROs demonstraram aumento significativo em P7 (Figura 12), em comparação com as passagens anteriores, não havendo diferença entre estas. Os valores de *fold change*, que representam a intensidade de fluorescência com relação ao controle, foram quantificados e, em P7 ( $6,12 \pm 2,37$ ), foram maiores do que P1 ( $2,05 \pm 0,87$ )

( $p < 0,001$ ), P3 ( $1,65 \pm 0,36$ ) ( $p < 0,001$ ) e P5 ( $2,36 \pm 0,69$ ) ( $p < 0,01$ ), indicando um aumento de EROs com o cultivo celular após longo período e amplificação.

**Figura 12. Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio**



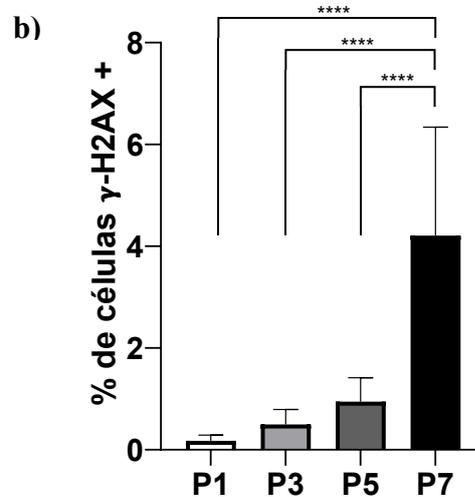
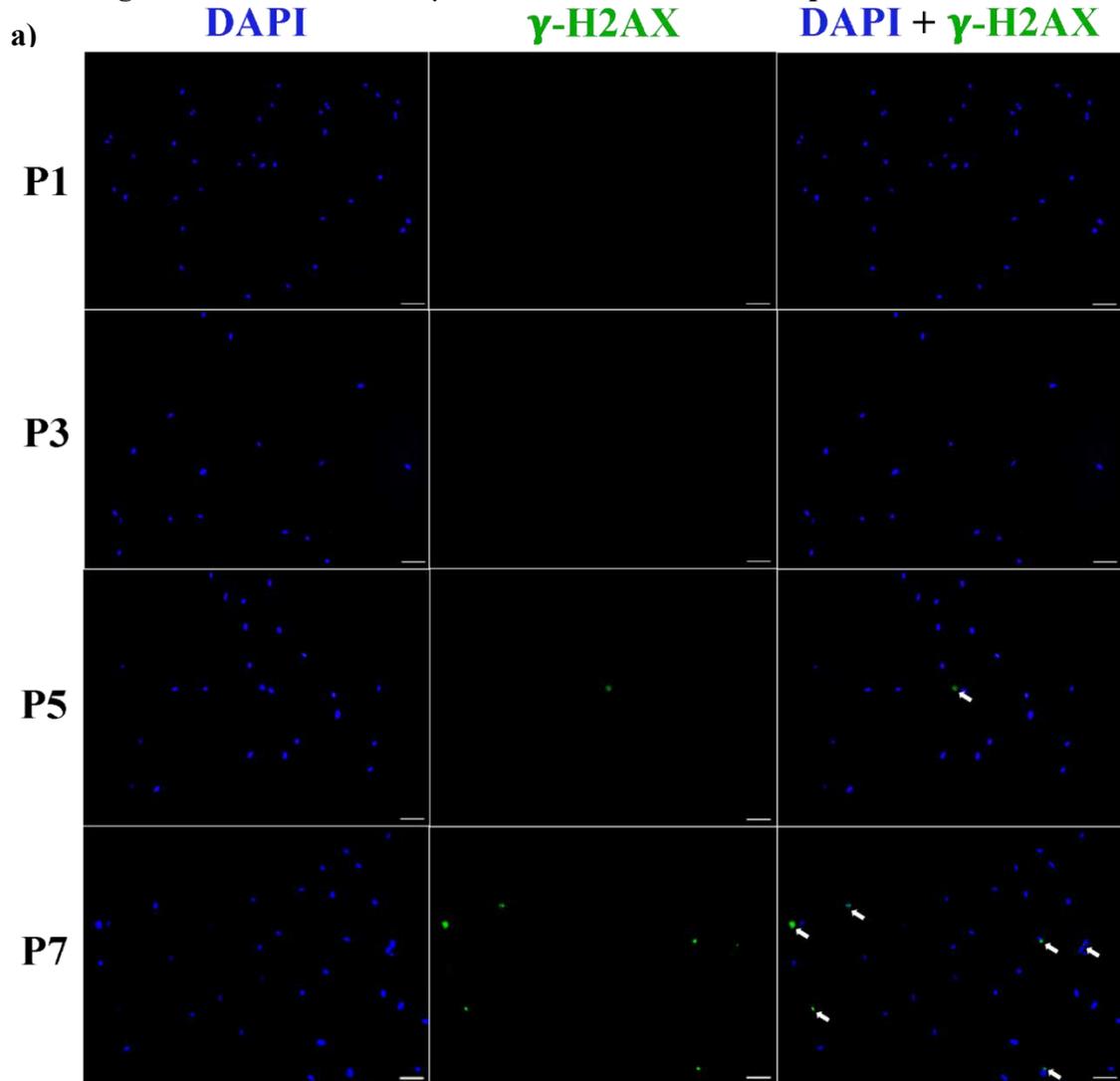
Ensaio fluorimétrico de quantificação de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) realizado por espectrofotometria (Ex/Em = 485/535 nm). Os dados representam média±DP de 5 replicatas biológicas em triplicata técnica. ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey foi aplicado para a comparação entre passagens. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.2.7 Avaliação da incidência de $\gamma$ -H2AX nas cAD-MSCs

O  $\gamma$ -H2AX é formado pela fosforilação da histona H2A após quebras da dupla fita de DNA pelos mecanismos do sistema de reparo, além de ser marcador de genotoxicidade e estar presente em células senescentes (PUSTOVALOVA et al., 2016).

Assim como EROs, o  $\gamma$ -H2AX apresentou maior incidência nas cAD-MSCs em passagem tardia (Figura 13), indicando aumento da instabilidade genética com o cultivo *in vitro* prolongado. Em P7, a expressão de  $\gamma$ -H2AX foi significativamente superior ( $4,20 \pm 2,13\%$ ) a P1 ( $0,17 \pm 0,11\%$ ) e P3 ( $0,49 \pm 0,29\%$ ) (ambos  $p < 0,001$ ) e P5 ( $0,94 \pm 0,47\%$ ) ( $p < 0,01$ ) (Figura 13b). Na Figura 13a estão representadas micrografias da incidência de  $\gamma$ -H2AX

Figura 13. Incidência de  $\gamma$ -H2AX nas cAD-MSCs amplificadas *in vitro*.

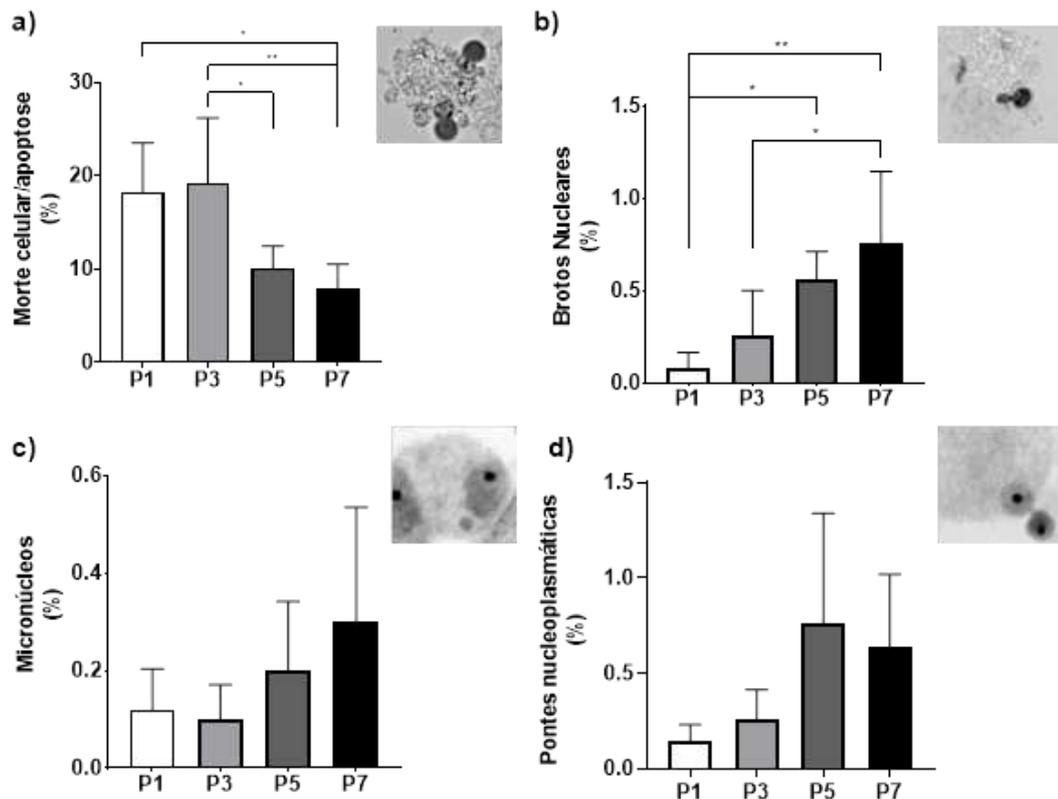


a) Fotomicrografias representativas da incidência de  $\gamma$ -H2AX nas diferentes passagens analisadas (aumento de 100x). b) Proporção de células positivas para a marcação de  $\gamma$ -H2AX. Os dados representam média $\pm$ DP de 5 replicatas biológicas em duplicata técnica. A comparação entre passagens foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. \*\*\*\*p<0,0001. Barra de escala = 100  $\mu$ m.

#### 4.2.8 Avaliação das alterações nucleares e de apoptose me cAD-MSCs

A seguir foi avaliada a ocorrência das alterações nucleares dos tipos brotos nucleares, micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas em cAD-MSCs expandidas *in vitro* (Figura 14) que, assim como o  $\gamma$ -H2AX, são marcadores de instabilidade genética e podem ser afetados pela amplificação celular (DELBEN et al., 2021; FENECH et al., 2011). Foi constatado aumento significativo na ocorrência de brotos nucleares em P5 ( $0,56\pm 0,15\%$ ) e P7 ( $0,76\pm 0,38\%$ ) em comparação a P1 ( $0,08\pm 0,08\%$ ) ( $p<0,05$  e  $p<0,01$ , respectivamente) (Figura 14b). A ocorrência de pontes nucleoplasmáticas (Figura 14c) e micronúcleos (Figura 14d) manteve-se comparável entre as passagens avaliadas. Por outro lado, a análise visual de células em morte celular/apoptose revelou redução deste parâmetro nas células em P7, em comparação a P1 ( $p<0,05$ ), identificado pela diminuição da proporção de células com núcleos picnóticos e/ou corpos apoptóticos (Figura 14a). Em conjunto, estes resultados sugerem um aumento do dano nuclear do tipo broto acompanhado de uma redução de morte celular por volta de P5.

**Figura 14. Ensaio de bloqueio da citocinese.**



Valores referentes à quantificação de 600 células binucleadas por replicata técnica. Os dados representam média $\pm$ DP de 5 replicatas biológicas em triplicata técnica. A comparação entre passagens foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. \*\*\*\* $p<0,0001$ .

## 5 DISCUSSÃO

Compreender os fenômenos relacionados à senescência replicativa das MSCs é essencial, dado que o uso terapêutico destas células requer a expansão *in vitro*. Neste sentido, este trabalho avaliou a progressão e o surgimento de características de senescência celular em MSCs obtidas a partir de tecido adiposo subcutâneo canino (cAD-MSCs) durante a amplificação. Verificou-se que há uma progressão passagem-dependente de características relacionadas à senescência, algumas evidentes apenas em passagem tardia (P7). Com os resultados obtidos pôde-se compreender a linha do tempo da vida útil das cAD-MSCs amplificadas *in vitro*.

### 5.1 O tecido adiposo subcutâneo como uma fonte de cAD-MSCs

A escolha da fonte tecidual é importante para a aplicação clínica das MSCs (WILSON et al., 2021; ZOMER et al., 2019). Nesse sentido, o tecido adiposo apresenta-se como uma das fontes mais utilizadas e promissoras, devido à quantidade e às características das células obtidas, disponibilidade tecidual e facilidade de coleta cirúrgica, menos invasiva que outras fontes (RUSSELL et al., 2016; ZOMER et al., 2019).

Em humanos, o tecido adiposo subcutâneo abdominal apresenta maior rendimento de MSCs com maior potencial proliferativo em comparação às do tecido adiposo subcutâneo facial (DELBEN et al., 2021). No modelo canino também já foi demonstrado que esta fonte possui maior rendimento e homogeneidade fenotípica, capacidade de proliferação e potencial osteogênico e condrogênico, em comparação à medula óssea e ao tecido amniótico (HUMENIK et al., 2022). Por outro lado, o potencial proliferativo das cAD-MSCs de diferentes regiões do organismo se assemelha, sendo as do tecido adiposo subcutâneo menos proliferativas apenas do que as da gordura infrapatelar (RASHID et al., 2021) porém mais proliferativas do que as do tecido visceral (GUERCIO et al., 2013).

Estas observações sugerem o grande potencial proliferativo das cAD-MSCs. Destaca-se que o tecido adiposo humano apresenta rendimento 100 vezes maior do que a derme, que porém apresentam maior potencial de fechamento de ferida *in vitro* e atividade parácrina pró-reparo cutâneo (ZOMER et al., 2019).

## 5.2 Particularidades do perfil imunofenotípico de cAD-MSCs

Assim como em outros trabalhos utilizando esta fonte tecidual, o procedimento de isolamento mostrou-se eficaz para a obtenção de cAD-MSCs. As células obtidas apresentaram potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica (Figura 4), bem como morfologia (Figura 2) e perfil imunofenotípico mesenquimal característico (Figura 3). Apesar disso, a expressão do marcador de superfície CD73 foi encontrada em uma proporção de células menor (57,25%) em comparação com o observado em MSCs humanas (~98%) (BROWN et al., 2019; DELBEN et al., 2021). Neste sentido, diversos trabalhos reportaram uma expressão baixa ou moderada de CD73 em cAD-MSCs (RASHID et al., 2021). Em uma destas publicações, Requicha e colaboradores (2012) hipotetizaram que isso poderia ser atribuído ao método de obtenção de MSCs ou à potencial falta de especificidade dos anticorpos utilizados para citometria de fluxo, os quais são primariamente desenvolvidos para proteínas humanas (REQUICHA et al., 2012). No entanto, foi demonstrado que, mesmo com o uso de anticorpos que atestadamente apresentam reatividade com moléculas caninas, apenas uma parte das cAD-MSCs expressam CD73 (RUSSELL et al., 2016). Além disso, em estudo mais recente foi verificado que, à nível de expressão gênica, cAD-MSCs expressam o mRNA de CD73 de maneira estável ao longo do cultivo celular, porém com o aumento no número de passagens há uma redução na proporção de células com esta proteína de membrana (KREŠIĆ et al., 2021).

Aqui foi avaliada a expressão a nível proteico dos marcadores de superfície mesenquimais (CD73, CD90 e CD105) e hematopoiéticos (CD34 e CD45) em P3, utilizando um dos cultivos obtidos. Esta análise foi aplicada com o objetivo de validar o protocolo de isolamento bem como as características mesenquimais da cultura. Porém, considerando as publicações recentes, e o que foi observado com a nossa análise, uma comparação da expressão destes marcadores em diferentes passagens é fundamental e pode fornecer uma compreensão mais aprofundada sobre o potencial terapêutico destas células.

O marcador de superfície CD73 (ecto-5'-nucleotidase), que apresentou expressão intermediária, é uma proteína ancorada à face externa da membrana celular responsável pela hidrólise de AMP (Adenosina Monofosfato) extracelular em adenosina (MISUMI et al., 1990). A ação desta enzima resulta na defosforilação de AMP e conseqüentemente na formação de adenosina, molécula com diversas funções bioativas. Este processo leva a uma mudança no perfil inflamatório do meio extracelular, passando de um ambiente pró-inflamatório mediado por ATP para um ambiente anti-inflamatório mediado por vias de sinalização adenosinérgicas (CHEN et al., 2019; KREŠIĆ et al., 2021). Desta forma, além de um marcador mesenquimal,

esta proteína de membrana tem importante função na atividade imunomoduladora das MSCs. Isso reforça a necessidade de uma correta caracterização das MSCs antes de qualquer aplicação clínica, avaliando o impacto da amplificação *in vitro* na expressão de marcadores mesenquimais, visando otimizar o potencial imunossupressor desta terapia através de um protocolo de expansão celular adequado.

### 5.3 Impactos da amplificação *in vitro* nas características de cAD-MSCs

Neste estudo, foi investigado o surgimento de características associadas à amplificação celular, como redução do potencial de autorrenovação e proliferação, além de alterações morfológicas, na capacidade migratória e relacionadas à morte celular. Avaliou-se ainda a ocorrência de marcadores associados à senescência, como a atividade de SA- $\beta$ -Gal, danos genéticos/nucleares e a incidência de EROs. Estas análises permitiram identificar aspectos da senescência replicativa *in vitro* das cAD-MSCs, a fim de monitorar a progressão desse fenótipo.

#### 5.3.1 A capacidade clonogênica das cAD-MSCs é afetada pela amplificação *in vitro*

Foi constatada uma redução no potencial clonogênico das cAD-MSCs a partir de P5, onde observou-se uma diminuição da eficiência clonal e do tamanho das colônias formadas em comparação com P1 (Figura 5). Esse resultado destaca a diminuição na proporção de células com potencial de autorrenovação à medida que o número de passagens aumenta. Deng e colaboradores (2021) também observaram uma redução no potencial de formação de colônias em MSCs derivadas da medula óssea canina (cBM-MSCs) em P6, em comparação com P3 (DENG et al., 2021). Embora haja uma redução semelhante no potencial de autorrenovação com a amplificação *in vitro*, Bearden e colaboradores (2017) compararam a formação de colônias de MSCs caninas derivadas do tecido adiposo, medula óssea e sinóvia e observaram que estes últimos apresentam uma proporção maior de células com potencial de autorrenovação em comparação com a medula óssea (BEARDEN et al., 2017), reforçando o uso do tecido adiposo como uma fonte eficiente para a obtenção de MSCs caninas. Apesar disso, os resultados de unidades formadoras de colônia mostram que a amplificação celular causa uma drástica redução na proporção de células com potencial de autorrenovação, característica fundamental de células-tronco e que é desejada para a medicina regenerativa (JOVIC et al., 2022).

### 5.3.2 O potencial proliferativo das cAD-MSCs é reduzido com a amplificação *in vitro*

Procedimentos de terapia celular com MSCs exigem um grande número de células (CHERIAN et al., 2020), por conta disso, avaliar o perfil proliferativo e os limites de expansão das cAD-MSCs se torna tão necessário. Os resultados obtidos com o ensaio de proliferação mostraram uma redução progressiva do potencial proliferativo a partir de P4 (Figura 6a), evidenciado pelo aumento do *Cell Doubling Time* (CDT) e compatível com o fenótipo de senescência replicativa. A construção da curva de CPDL mostrou o limite aproximado de duplicações das cAD-MSCs (Figura 6b). Em passagem tardia (P7) as cAD-MSCs apresentaram CPDL de aproximadamente 13,04. Outros autores relataram um CPDL semelhante ao que obtivemos neste estudo, mesmo com cBM-MSCs (BERTOLO et al., 2015). Isso pode sugerir uma semelhança no limite de duplicações das MSCs caninas, independentemente da fonte de aquisição. Em conjunto, os resultados de CDT e CPDL mostram o limite da expansão de cAD-MSCs e podem servir como base para a construção de ensaios pré-clínicos e clínicos na medicina veterinária.

Apesar da uniformidade do perfil de crescimento celular, foi verificado que a intensidade proliferativa das diferentes linhagens obtidas varia conforme o doador (Figura 7). Com relação a isso, diversos parâmetros individuais podem influenciar nas características das MSCs isoladas. A exemplo disso, a idade do doador está negativamente correlacionada com a viabilidade, proliferação e potencial de diferenciação celular (BARRETO-DURÁN et al., 2018; CHOUDHERY et al., 2014) e o *background* genético pode influenciar na heterogeneidade funcional das MSCs (WANG et al., 2020). De maneira semelhante, cAD-MSCs obtidas de cães mais velhos (>7 anos) apresentam proliferação e potencial imunomodulatório comprometidos, em comparação com doadores mais jovens (<2 anos), além de responderem de maneira diferente a estímulos pró-inflamatórios, aumentando a expressão de genes associados à osteogênese (TAGUCHI et al., 2019). Estes achados refletem a influência das características individuais dos doadores de tecido nas MSCs obtidas e devem ser considerados antes de procedimentos de terapia celular.

### 5.3.3 cAD-MSCs amplificadas apresentam redução do potencial de fechamento de ferida *in vitro*

A atividade terapêutica das MSCs é resultado de diversos fatores, incluindo a capacidade migratória dessas células para locais de inflamação por meio de gradientes quimiotáticos (JIMENEZ-PUERTA et al., 2020), os quais também podem ser afetados pelo

surgimento da senescência celular (YOUNIS et al., 2018). Durante o processo de cicatrização de feridas, a proliferação e migração de fibroblastos são essenciais para a formação de um novo tecido durante determinadas fases do reparo cutâneo (ZOMER; TRENTIN, 2018) e sabe-se que a senescência celular afeta negativamente esses parâmetros (YOUNIS et al., 2018).

Neste trabalho foi identificado uma redução no potencial de fechamento de ferida *in vitro* das cAD-MSCs expandidas tratadas com mitomicina, indicando uma alteração na capacidade migratória dessas células com a senescência replicativa (Figura 8). Este parâmetro foi afetado em uma passagem celular tardia (P7), sugerindo que a migração celular é impactada posteriormente em comparação com outros parâmetros relacionados à cinética celular, como morfologia e proliferação. No entanto, os pontos analisados (24 e 48 horas) representam um intervalo de tempo que pode não ser capaz de identificar mudanças pontuais no potencial migratório das cAD-MSCs. Portanto, recomenda-se avaliar este aspecto em intervalos mais curtos, com metodologias mais sensíveis ou por captura de imagens em tempo real, buscando uma compreensão mais aprofundada do fenômeno e sua correlação com a senescência replicativa.

#### 5.3.4 cAD-MSCs sofrem alterações morfológicas com o aumento de passagens

A senescência também afeta a morfologia celular, sendo esta uma das características mais evidentes deste fenótipo. Células senescentes apresentam hipertrofia celular, bem como um formato achatado e irregular (CRISTOFALO; PIGNOLO, 1993; ZHAO; DARZYNKIEWICZ, 2013). Neste trabalho, foi realizada a morfometria de cAD-MSCs em diferentes passagens (Figura 10). Com esta análise verificou-se um aumento da área celular em P5, que se intensificou em P7, em comparação com as passagens iniciais, compatível com a hipertrofia de células senescentes. Quanto ao formato, foi constatada uma redução da relação comprimento/largura a partir de P3, que revela uma mudança da morfologia fusiforme para uma forma achatada com o aumento no número de passagens. O gráfico *Dot Plot* (Figura 10c) ilustra a visível diferença entre populações celulares senescentes e não-senescentes, sendo que as não-senescentes possuem um perfil de área celular menor com pouca variação, bem como uma maior relação comprimento/largura. Enquanto isso, o aumento nas passagens resultou em populações heterogêneas, com uma menor relação comprimento/largura e área celular maior, distribuída de maneira não-uniforme.

Taherian Fard e colaboradores (2023) identificaram diferentes tipos de senescência dentro da mesma população de MSC submetidas à senescência replicativa. Seus achados

demonstram que essas células passam por um estágio de pré-senescência seguido pela possível entrada em três tipos de programas de senescência celular, cada um com características distintas e mediados por diferentes mecanismos (TAHERIAN FARD et al., 2023). Considerando essas observações, nossos dados morfométricos indicam uma alta heterogeneidade em P7, potencialmente representando diferentes fenótipos senescentes. Para uma melhor compreensão destes tipos de senescência, análises de expressão gênica e de proteínas reguladoras do ciclo celular podem auxiliar na compreensão das redes regulatórias que modulam estas células. Outros trabalhos já relacionaram alterações morfológicas de MSCs senescentes com o aumento da expressão de p16 e p21 (OJA et al., 2018), resta identificar como estes e outros marcadores são diferencialmente expressos em uma mesma população de MSCs, relacionando padrões morfológicos com o perfil de expressão gênica, mapeando as subpopulações com diferentes fenótipos senescentes.

### 5.3.5 cAD-MSCs apresentam aumento progressivo da atividade de SA- $\beta$ -Gal

Dentre as mudanças emergentes que acompanham a senescência celular, adaptações metabólicas são bastante comuns. Um exemplo disso é o aumento na massa e na atividade lisossomal (GONZÁLEZ-GUALDA et al., 2021). Nesse contexto, a atividade da SA- $\beta$ -Gal é um marcador amplamente utilizado para identificar a senescência em vários tipos celulares. A atividade de SA- $\beta$ -Gal pode ser detectada em pH 6,0 e está relacionada com o aumento da expressão gênica de *GLB1*, gene que codifica a enzima  $\beta$ -D-Galactosidase, uma hidrolase lisossomal que possui atividade ótima em pH 4,0. Porém, com a senescência celular, a atividade de SA- $\beta$ -Gal pode ser identificada em condições sub-ótimas em pH 6,0 (DEBACQ-CHAINIAUX et al., 2009). Supõe-se que esse aumento na massa e atividade lisossomal, juntamente com a atividade disfuncional da  $\beta$ -Gal, seja resultado da incapacidade das células senescentes em degradar certas macromoléculas, organelas e lipídeos, levando ao acúmulo desses componentes nos lisossomos (OGRODNIK; SALMONOWICZ; GLADYSHEV, 2019).

Em MSCs, a quantificação da atividade de SA- $\beta$ -Gal pode ser aplicada para monitorar a evolução do fenótipo senescente em populações expandidas *in vitro*, tanto em células humanas quanto caninas (DELBEN et al., 2021; DENG et al., 2021). Neste sentido, P3 é frequentemente utilizada como controle negativo para a atividade de SA- $\beta$ -Gal, visto que apenas uma pequena proporção de cMSCs expandidas apresentam esta característica (FANG et al., 2018; ZHONG et al., 2021). Aqui foi constatado um aumento progressivo na atividade da SA- $\beta$ -Gal em cAD-MSCs a partir de P5 (Figura 11). Esse achado indica o início da prevalência de MSCs

senescentes a partir desta passagem, o que é consistente com resultados obtidos em outros estudos envolvendo esse tipo celular (FANG et al., 2018; LIU et al., 2018; YASUMURA et al., 2023).

Porém, ainda há a necessidade de avaliar a relação da atividade de SA- $\beta$ -Gal com outros aspectos particulares da senescência replicativa, uma vez que este marcador não é uniformemente expresso em todas as subpopulações de MSCs senescentes (TAHERIAN FARD et al., 2023). Além disso, estudos aprofundados sobre a atividade lisossomal e macroautofagia podem elucidar aspectos ainda não compreendidos sobre a função desta atividade enzimática na senescência replicativa (OGRODNIK; SALMONOWICZ; GLADYSHEV, 2019).

### 5.3.6 cAD-MSCs apresentam aumento da ocorrência de danos genéticos e EROs em passagem tardia

Interessantemente, as cAD-MSCs em P7 mostraram um aumento tanto no marcador de quebra de dupla fita  $\gamma$ -H2AX (Figura 13) quanto na incidência de EROs (Figura 12). Em MSCs humanas (hMSCs), a expansão celular durante sucessivas passagens resulta em um aumento de focos de  $\gamma$ -H2AX em passagens tardias (DELBEN et al., 2021; PUSTOVALOVA et al., 2016). Além disso, MSCs obtidas de doadores idosos (70-80 anos) apresentaram níveis de EROs mais elevados que as coletadas de doadores infantis (1-12 meses) (KHANH et al., 2020). Isso mostra a relação destes fatores com o envelhecimento *in vivo* e com a senescência replicativa adquirida com a expansão *in vitro*.

Porém, a relação entre EROs e  $\gamma$ -H2AX é ambígua e bidirecional (SRINIVAS et al., 2019). Em células de câncer de mama, o estresse oxidativo crônico resulta na redução de  $\gamma$ -H2AX, devido à degradação proteica mediada por altos níveis de EROs (GRUOSSO et al., 2016). Por outro lado, o estresse oxidativo agudo causa um aumento de quebras de dupla fita seguido pelo aumento da incidência de  $\gamma$ -H2AX, em espermatozoides humanos (LI; YANG; HUANG, 2006). Especificamente no modelo canino, cBM-MSCs apresentam aumento nos níveis de EROs com a expansão *in vitro*, passando a apresentar níveis elevados em P6, em comparação com passagens anteriores (ZHONG et al., 2021). Além disso, Stojiljković e colaboradores (2022) reportaram, de maneira semelhante, um aumento de cAD-MSCs positivas para marcação com  $\gamma$ -H2AX em P6 (STOJILJKOVIĆ et al., 2022).

Com os resultados obtidos, verificou-se que os níveis de EROs e a incidência dos focos de  $\gamma$ -H2AX podem ser bons marcadores para a senescência celular em cAD-MSCs, uma vez que são expressos em passagens tardias, onde as células cultivadas apresentam diversas

características senescentes, e possuem uma ocorrência comparável entre as passagens iniciais. Este é o primeiro trabalho que identificou a correlação do aumento da incidência de EROs com o aumento de Quebras de Dupla Fita (DSB) em cAD-MSCs expandidas *in vitro*. Essa constatação não apenas representa um avanço significativo, mas também abre novas perspectivas para a compreensão da progressão do fenótipo senescente nessas células.

O ensaio para avaliação da estabilidade genética por bloqueio da citocinese, revelou aumento nos brotos nucleares em cAD-MSCs a partir de P5 e que se intensificou em P7 (Figura 14b). Os brotos nucleares são um tipo de anomalia nuclear associada a eventos de instabilidade cromossômica (FENECH et al., 2011) e indicam DNA amplificado removido do núcleo celular (CORNÉLIO et al., 2014). Este ensaio, bem como outras análises genéticas, podem ser empregados com o objetivo de garantir a segurança e estabilidade genética das MSCs com potencial clínico e, nesse sentido, as MSCs cultivadas conforme nosso protocolo de amplificação demonstraram, exceto pela ocorrência de brotos nucleares, uma baixa incidência de danos nucleares (micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas) nas passagens avaliadas. Isso sugere que o procedimento de expansão é eficaz para gerar um grande número de cAD-MSCs com potencial para aplicação em ensaios pré-clínicos.

### 5.3.7 A amplificação *in vitro* reduz a proporção de cAD-MSCs em apoptose

Uma outra observação interessante verificada com o ensaio de bloqueio da citocinese foi a redução de células em apoptose/morte celular em P7 em comparação com P1 (Figura 14a). Tanto a senescência celular quanto a apoptose são mecanismos distintos pelos quais células sob estresse podem acabar adotando. Apesar de diferentes, esses dois destinos celulares compartilham mecanismos, tornando a correlação entre ambos ainda mais ambígua e paradoxal. (CHILDS et al., 2014; VICTORELLI et al., 2023). Via de regra, células senescentes apresentam resistência a estímulos pró-apoptóticos, mantendo-se viáveis tanto em cultura celular quanto *in vivo* (HU et al., 2022). Porém, de maneira contrária ao que foi encontrado no presente estudo, Zhong e colaboradores (2021) verificaram um aumento da proporção de cBM-MSCs em apoptose com a amplificação *in vitro* (ZHONG et al., 2021). Além disso, resultados do grupo de pesquisa do LACERT indicam que as MSCs derivadas do tecido adiposo felino demonstram um aumento na proporção de células apoptóticas à medida que o número de passagens aumenta (BION, 2023). A apoptose das MSCs parece desempenhar um papel fundamental no processo de imunossupressão mediado por essas células (CHEUNG et al., 2023; GIACOMINI et al., 2023; PANG et al., 2021), e a literatura apresenta resultados com hMSCs senescentes que

mostram que a resistência à apoptose pode ser bastante variável, sendo que nem todas as células senescentes adquirem esta característica (DERYABIN; SHATROVA; BORODKINA, 2021).

Em conjunto, estas constatações reforçam a necessidade de se avaliar profundamente a resistência a estímulos pró-apoptóticos em cAD-MSCs no contexto da senescência replicativa. Para isso, devem ser utilizados métodos analíticos mais sensíveis e específicos para análise de morte celular, uma vez que o ensaio aqui aplicado tem como objetivo principal a verificação de alterações nucleares.

#### 5.4 cAD-MSCs como um modelo para o estudo da senescência celular

Neste estudo, foi observado um desenvolvimento progressivo de várias características de senescência replicativa nas cAD-MSCs, ao longo do cultivo celular. Em conjunto, nossos resultados revelam a mudança fenotípica das cAD-MSCs conforme o número de passagens aumenta, permitindo comparações com hMSCs senescentes. Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, foi constatado que hMSCs do tecido adiposo da face e do abdômen entram em senescência replicativa e perdem a estabilidade genética com o aumento no número de passagens (DELBEN et al., 2021). Nossos resultados indicam características de senescência replicativa em cAD-MSCs já em P5, enquanto hMSCs demonstraram essas características apenas em passagem mais avançada, em P12. Nesse sentido, as cAD-MSCs apresentam-se como um modelo potencialmente mais eficaz e menos laborioso para o estudo da senescência replicativa do que as hMSCs. Isso se deve ao fato de que as cAD-MSCs podem ser expandidas por um período menor para adquirir características senescentes, simplificando a manipulação das células e a realização de ensaios *in vitro*. Desta forma, a comparação entre cMSCs e hMSCs pode responder à pergunta: cAD-MSCs são um modelo mais adequado para o estudo da senescência replicativa do que as hMSCs?

#### 5.5 Limitações e perspectivas futuras

Embora tenham sido avaliadas as principais características associadas ao desenvolvimento de senescência celular nas cAD-MSCs, neste estudo não foram considerados o comprimento dos telômeros nem a atividade da enzima telomerase. A redução dos telômeros é uma das causas conhecidas da senescência replicativa, sendo essencial avaliar a progressão dessa característica ao longo da expansão *in vitro*. Outro parâmetro relevante a ser analisado é a fase do ciclo celular em que as cAD-MSCs se encontram em diferentes passagens, o que pode oferecer uma compreensão mais profunda dos distintos programas de senescência que emergem

na população de cAD-MSCs senescentes. Além disso, é crucial investigar o secretoma das cAD-MSCs, pois está diretamente ligado ao potencial clínico da terapia celular com MSCs. O fenótipo secretório associado à senescência (SASP) manifesta-se durante o desenvolvimento da senescência e está associado a uma disfunção na atividade parácrina das MSCs, frequentemente apresentando um perfil pró-inflamatório no secretoma dessas células (YUE et al., 2022). O secretoma tem sido objeto de investigação como um alvo de estratégias de pré-condicionamento que visam contornar o problema do SASP, e esse tipo de abordagem merece uma atenção especial, uma vez que poucos estudos avaliam essa característica em cAD-MSCs (HU; LI, 2018).

Algumas metodologias de cultivo que utilizam o pré-condicionamento buscam atenuar os efeitos da aquisição do fenótipo senescente ou eliminar células senescentes, selecionando MSCs que possuem maior capacidade terapêutica (CHERIF et al., 2019; DENG et al., 2021; LI et al., 2019; ZHOU et al., 2021). Por exemplo, fármacos senolíticos ou senomórficos podem representar um avanço importante na medicina regenerativa, pois alvejam células senescentes, e possibilitam o estabelecimento de linhagens de cAD-MSCs que podem ser expandidas por um maior período de tempo sem apresentar características de senescência replicativa (ZHANG et al., 2023).

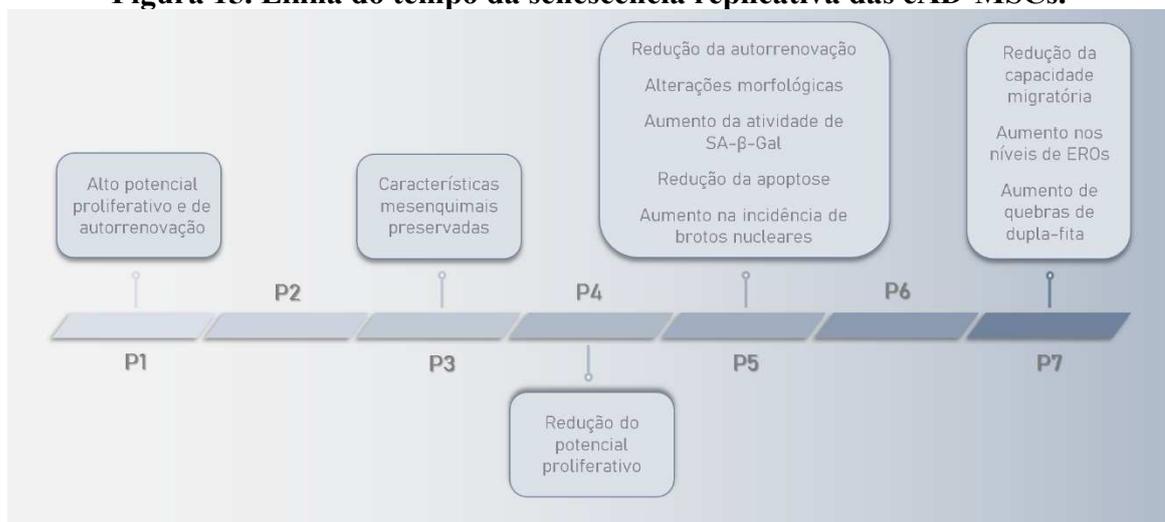
A partir dos resultados aqui expostos, uma série de outros trabalhos puderam ser construídos, resultando em apresentações científicas que culminaram na disseminação do conhecimento produzido pelo grupo de pesquisa do LACERT (Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual). Além disso, dois artigos científicos estão em processo de elaboração, no presente momento, um em estágio de finalização e outro na etapa de redação.

## **6 CONCLUSÃO**

O presente estudo permitiu acompanhar o desenvolvimento das características de senescência replicativa em cAD-MSCs, identificando as alterações celulares relacionadas a esse fenótipo. Os resultados indicam que até P3, as cAD-MSCs exibem características compatíveis com um fenótipo não-senescente, mantendo características mesenquimais desejáveis para a terapia celular. Em P1, até por volta de P4, as cAD-MSCs possuem alto potencial proliferativo, com presença de morfologia, perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação compatível com o estabelecido pela ISCT, além de não apresentarem nenhuma alteração significativa dos marcadores de senescência analisados. Em P5 as cAD-MSCs passam a apresentar muitas das características senescentes avaliadas, como redução do potencial de autorrenovação, alteração

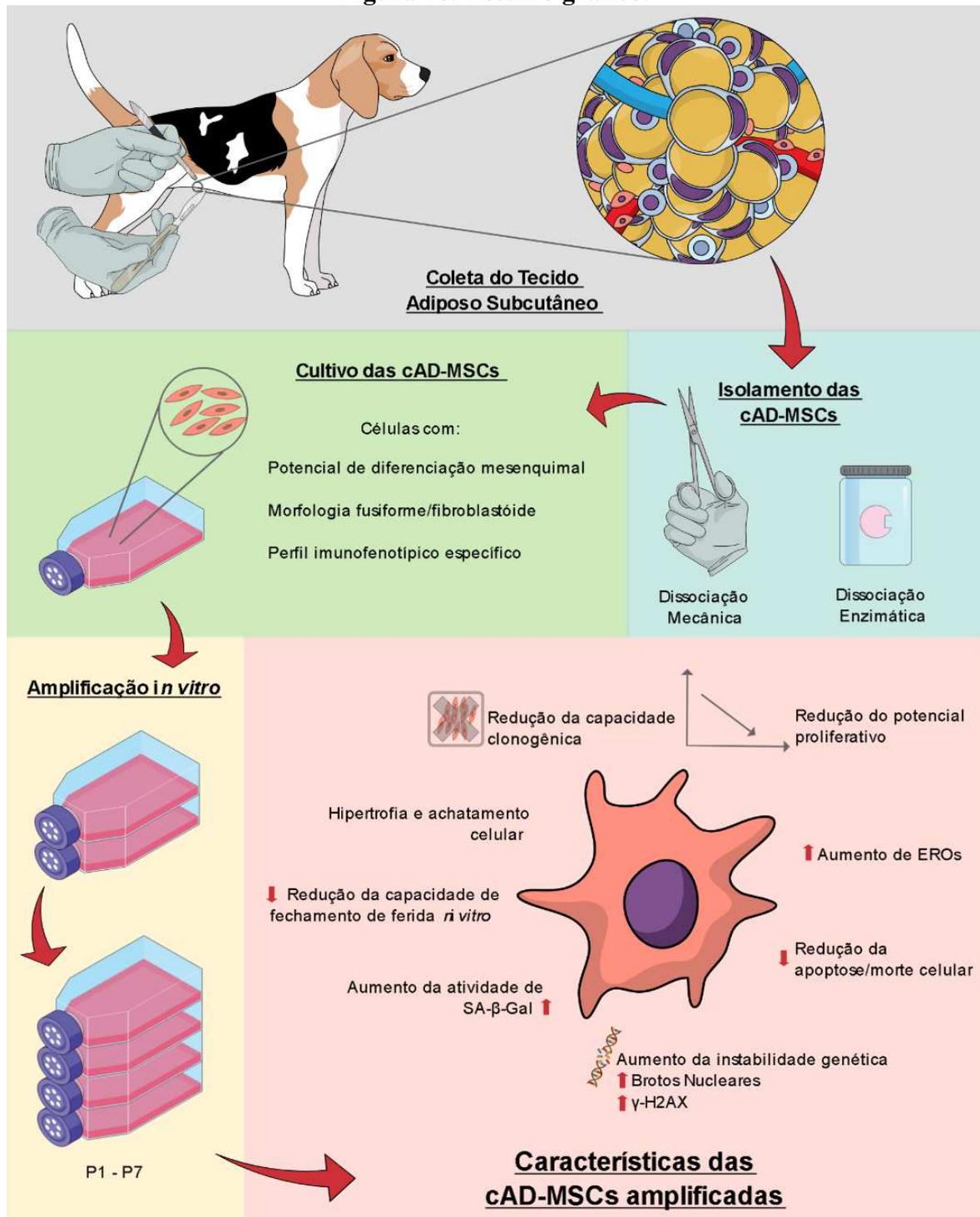
morfológica, aumento da atividade de SA- $\beta$ -Gal e de brotos nucleares, bem como redução da incidência de morte celular/apoptose. No entanto em P7, parece ocorrer uma transição completa para um fenótipo senescente bem estabelecido, com a presença de todas as características citadas, incluindo aumento de EROs e da instabilidade genética. A figura 15 resume a linha do tempo da senescência replicativa, proporcionando uma compreensão mais detalhada sobre a vida útil das cAD-MSCs expandidas *in vitro*. Na figura 16 está representado o resumo do presente trabalho de maneira gráfica. Essas observações podem ser relevantes para orientar o desenvolvimento de metodologias de cultivo, expansão e aplicação de MSCs que sejam mais eficazes e que apresentem uma maior reprodutibilidade.

**Figura 15. Linha do tempo da senescência replicativa das cAD-MSCs.**



SA- $\beta$ -Gal:  $\beta$ -Galactosidase Associada à Senescência; EROs: Espécies Reativas de Oxigênio. Fonte: do autor.

Figura 16. Resumo gráfico.



cAD-MSCs: Células Estromais Mesenquimais derivadas do Tecido Adiposo canino; SA-β-Gal: β-Galactosidase Associada à Senescência; EROs: Espécies Reativas de Oxigênio; γ-H2AX: Isoforma fosforilada da histona H2A. Fonte: do autor.

## REFERÊNCIAS

- A, B. Comparative Characterization of Canine and Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow. **International Journal of Stem cell Research & Therapy**, v. 2, n. 1, 30 jun. 2015.
- AYALA-CUELLAR, A. P. et al. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration and Immunomodulation. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 25–33, 1 jan. 2019.
- BAOUCHE, M. et al. Mesenchymal Stem Cells: Generalities and Clinical Significance in Feline and Canine Medicine. **Animals**, v. 13, n. 12, p. 1903, 7 jun. 2023.
- BARRETO-DURÁN, E. et al. Impact of donor characteristics on the quality of bone marrow as a source of mesenchymal stromal cells. [s.d.].
- BEARDEN, R. N. et al. In-vitro characterization of canine multipotent stromal cells isolated from synovium, bone marrow, and adipose tissue: a donor-matched comparative study. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 218, dez. 2017.
- BION, M. C. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO. 2023.
- BRONDEEL, C. et al. Review: Mesenchymal Stem Cell Therapy in Canine Osteoarthritis Research: “Experientia Docet” (Experience Will Teach Us). **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 668881, 19 maio 2021.
- BROWN, C. et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1738–1755, set. 2019.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 9, n. 5, p. 641–650, set. 1991.
- CHAN, R. W. S.; NG, E. H. Y.; YEUNG, W. S. B. Identification of Cells with Colony-Forming Activity, Self-Renewal Capacity, and Multipotency in Ovarian Endometriosis. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 6, p. 2832–2844, jun. 2011.
- CHEN, S. et al. CD73: an emerging checkpoint for cancer immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 11, n. 11, p. 983–997, ago. 2019.
- CHERIAN, D. S. et al. Biological Considerations in Scaling Up Therapeutic Cell Manufacturing. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 654, 13 maio 2020.
- CHERIF, H. et al. Curcumin and o-Vanillin Exhibit Evidence of Senolytic Activity in Human IVD Cells In Vitro. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 4, p. 433, 29 mar. 2019.
- CHEUNG, T. S. et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells activates an immunosuppressive secretome predicting clinical response in Crohn’s disease. **Molecular Therapy**, v. 31, n. 12, p. 3531–3544, dez. 2023.
- CHILDS, B. G. et al. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? **EMBO reports**, v. 15, n. 11, p. 1139–1153, nov. 2014.

CHOUDHERY, M. S. et al. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 8, dez. 2014.

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.

COSTELA-RUIZ, V. J. et al. Different Sources of Mesenchymal Stem Cells for Tissue Regeneration: A Guide to Identifying the Most Favorable One in Orthopedics and Dentistry Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6356, 6 jun. 2022.

CRISTOFALO, V. J.; PIGNOLO, R. J. Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. **Physiological Reviews**, v. 73, n. 3, p. 617–638, 1 jul. 1993.

DEBACQ-CHAINIAUX, F. et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ 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.

DENG, J. et al. Curcumin Alleviates the Senescence of Canine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells during In Vitro Expansion by Activating the Autophagy Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11356, 21 out. 2021.

DERYABIN, P. I.; SHATROVA, A. N.; BORODKINA, A. V. Apoptosis resistance of senescent cells is an intrinsic barrier for senolysis induced by cardiac glycosides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 23, p. 7757–7776, dez. 2021.

DI MICCO, R. et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 75–95, fev. 2021.

DIAS, I. E. et al. Mesenchymal stem cells therapy in companion animals: useful for immune-mediated diseases? **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 358, dez. 2019.

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.

EL-HUSSEINY, H. M. et al. The Pivotal Role of Stem Cells in Veterinary Regenerative Medicine and Tissue Engineering. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 11, p. 648, 21 nov. 2022.

FANG, J. et al. Melatonin prevents senescence of canine adipose-derived mesenchymal stem cells through activating NRF2 and inhibiting ER stress. **Ageing**, v. 10, n. 10, p. 2954–2972, 25 out. 2018.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, 1 jan. 2011.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393–403, out. 1970.

GIACOMINI, C. et al. The critical role of apoptosis in mesenchymal stromal cell therapeutics and implications in homeostasis and normal tissue repair. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 20, n. 6, p. 570–582, 25 abr. 2023.

GIRE, V.; DULIĆ, V. Senescence from G2 arrest, revisited. **Cell Cycle**, v. 14, n. 3, p. 297–304, 1 fev. 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.

GRUOSSO, T. et al. Chronic oxidative stress promotes H2 AX protein degradation and enhances chemosensitivity in breast cancer patients. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 5, p. 527–549, maio 2016.

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

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 25, n. 3, p. 585–621, dez. 1961.

HOFFMAN, A. M.; DOW, S. W. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. **Stem Cells**, v. 34, n. 7, p. 1709–1729, 1 jul. 2016.

HU, C.; LI, L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1428–1442, mar. 2018.

HU, L. et al. Why Senescent Cells Are Resistant to Apoptosis: An Insight for Senolytic Development. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 822816, 16 fev. 2022.

HUANG, W. et al. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. **Nature Reviews Nephrology**, v. 18, n. 10, p. 611–627, out. 2022.

HUMENIK, F. et al. A Comparative Study of Canine Mesenchymal Stem Cells Isolated from Different Sources. **Animals**, v. 12, n. 12, p. 1502, 9 jun. 2022.

ITO, K.; SUDA, T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 4, p. 243–256, abr. 2014.

JIMENEZ-PUERTA, G. et al. Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 445, 6 fev. 2020.

JOVIC, D. et al. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 18, n. 5, p. 1525–1545, jun. 2022.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, p. 51046, 1 jun. 2014.

- KANG, M.-H.; PARK, H.-M. Challenges of stem cell therapies in companion animal practice. **Journal of Veterinary Science**, v. 21, n. 3, p. e42, 2020.
- KHANH, V. C. et al. Rejuvenation of mesenchymal stem cells by extracellular vesicles inhibits the elevation of reactive oxygen species. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 17315, 14 out. 2020.
- KIM, Y. et al. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. **Journal of Veterinary Science**, v. 17, n. 1, p. 123, 2016.
- KREŠIĆ, N. et al. The Expression Pattern of Surface Markers in Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7476, 12 jul. 2021.
- KUMARI, R.; JAT, P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 645593, 2021.
- LI, W. et al. The curcumin analog EF24 is a novel senolytic agent. **Aging (Albany NY)**, v. 11, n. 2, p. 771–782, 28 jan. 2019.
- LI, Z.; YANG, J.; HUANG, H. Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. **FEBS Letters**, v. 580, n. 26, p. 6161–6168, 13 nov. 2006.
- 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.
- MICLAU, K. et al. Cellular expansion of MSCs : Shifting the regenerative potential. **Aging Cell**, v. 22, n. 1, p. e13759, jan. 2023.
- MISUMI, Y. et al. Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. **European Journal of Biochemistry**, v. 191, n. 3, p. 563–569, 1990.
- MOCCHI, M. et al. Veterinary Regenerative Medicine for Musculoskeletal Disorders: Can Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Secretome Be the New Frontier? **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1453, 11 jun. 2020.
- OGRODNIK, M.; SALMONOWICZ, H.; GLADYSHEV, V. N. Integrating cellular senescence with the concept of damage accumulation in aging: Relevance for clearance of senescent cells. **Aging Cell**, v. 18, n. 1, p. e12841, fev. 2019.
- OJA, S. et al. Automated image analysis detects aging in clinical-grade mesenchymal stromal cell cultures. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 6, dez. 2018.
- OLSSON, D. C. et al. Administration of mesenchymal stem cells from adipose tissue at the hip joint of dogs with osteoarthritis: A systematic review. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 495–503, mar. 2021.
- PANG, S. H. M. et al. Mesenchymal stromal cell apoptosis is required for their therapeutic function. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 6495, 11 nov. 2021.

- PÉREZ-MERINO, E. M. et al. Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Endoscopic and histological outcomes. **The Veterinary Journal**, v. 206, n. 3, p. 391–397, dez. 2015.
- PITTENGER, M. F. et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. **npj Regenerative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 22, 2 dez. 2019.
- PRZĄDKA, P. et al. The Role of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Veterinary Medicine and Their Use in Musculoskeletal Disorders. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1141, 2 ago. 2021.
- PUSTOVALOVA, M. et al. Accumulation of spontaneous  $\gamma$ H2AX foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells. **Aging**, v. 8, n. 12, p. 3498–3506, 11 dez. 2016.
- RASHID, U. et al. Characterization and differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from multiple canine adipose tissue sources. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 388, 18 dez. 2021.
- RENESME, L. et al. Definition and Characteristics of Mesenchymal Stromal Cells in Preclinical and Clinical Studies: A Scoping Review. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 11, n. 1, p. 44–54, 3 mar. 2022.
- REQUICHA, J. F. et al. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 4, p. 1211–1222, dez. 2012.
- RUSSELL, K. A. et al. Characterization and Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0167442, 1 dez. 2016.
- SAGARADZE, G. D. et al. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 576176, 25 set. 2020.
- SARMENTO, C. et al. Pilot study: bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal cord injury. **Regenerative Medicine Research**, v. 2, n. 1, p. 9, 2014.
- SRINIVAS, U. S. et al. ROS and the DNA damage response in cancer. **Redox Biology**, v. 25, p. 101084, jul. 2019.
- STOJILJKOVIĆ, A. et al. Novel immortalization approach defers senescence of cultured canine adipose-derived mesenchymal stromal cells. **GeroScience**, v. 44, n. 3, p. 1301–1323, jun. 2022.
- TAGUCHI, T. et al. Influence of Donor's Age on Immunomodulatory Properties of Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 28, n. 23, p. 1562–1571, 1 dez. 2019.
- TAHERIAN FARD, A. et al. Deconstructing heterogeneity of replicative senescence in human mesenchymal stem cells at single cell resolution. **GeroScience**, v. 46, n. 1, p. 999–1015, 14 jun. 2023.
- VICTORELLI, S. et al. Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP. **Nature**, v. 622, n. 7983, p. 627–636, 19 out. 2023.

VICTORELLI, S.; PASSOS, J. F. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. **EBioMedicine**, v. 21, p. 14–20, 1 jul. 2017.

WANG, T. et al. Donor genetic backgrounds contribute to the functional heterogeneity of stem cells and clinical outcomes. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 9, n. 12, p. 1495–1499, 1 dez. 2020.

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, 29 abr. 2022.

WILSON, A. J. et al. Characterisation of mesenchymal stromal cells in clinical trial reports: analysis of published descriptors. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 360, dez. 2021.

YASUMURA, Y. et al. Immortalized Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Novel Candidate Cell Source for Mesenchymal Stem Cell Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2250, 23 jan. 2023.

YOUNIS, L. T. et al. 3D TECA hydrogel reduces cellular senescence and enhances fibroblasts migration in wound healing. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 4, p. 317–325, jul. 2018.

YUE, Z. et al. Senescence-associated secretory phenotype and its impact on oral immune homeostasis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1019313, 4 out. 2022.

ZHAN, X.-S. et al. A Comparative Study of Biological Characteristics and Transcriptome Profiles of Mesenchymal Stem Cells from Different Canine Tissues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1485, 25 mar. 2019.

ZHANG, L. et al. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. **The FEBS Journal**, v. 290, n. 5, p. 1362–1383, mar. 2023.

ZHAO, H.; DARZYNKIEWICZ, Z. Biomarkers of Cell Senescence Assessed by Imaging Cytometry. Em: GALLUZZI, L. et al. (Eds.). **Cell Senescence**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 965p. 83–92.

ZHONG, L. et al. Protective effect of MitoQ on oxidative stress-mediated senescence of canine bone marrow mesenchymal stem cells via activation of the Nrf2/ARE pathway. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 57, n. 7, p. 685–694, ago. 2021.

ZHOU, Y. et al. Senolytics improve bone forming potential of bone marrow mesenchymal stem cells from aged mice. **npj Regenerative Medicine**, v. 6, n. 1, p. 34, 11 jun. 2021.

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.

ZOMER, H. D.; TRENTIN, A. G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. **Journal of Dermatological Science**, v. 90, n. 1, p. 3–12, 1 abr. 2018.

## APÊNDICE A – TCLE Tutores/Proprietários

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA DOAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO (TCLE -Tutor/Proprietário)

**Título do Projeto:** Avaliação do potencial proliferativo e da senescência de Células Estromais Mesenquimais caninas de doadores com diferentes idades

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, portador do RG \_\_\_\_\_ e CPF \_\_\_\_\_, residente de (cidade e estado) \_\_\_\_\_ responsável legal e proprietário do cão que atende pelo nome de \_\_\_\_\_, raça \_\_\_\_\_, idade (meses ou anos) \_\_\_\_\_, paciente do estabelecimento \_\_\_\_\_, declaro que estou doando fragmento de tecido adiposo subcutâneo do animal de minha propriedade, excisado durante procedimento de incisão dermo-cirúrgica, sem danos ao animal, realizada pelo(a) médico(a) veterinário(a) \_\_\_\_\_, CRMV \_\_\_\_\_, para ser utilizado em estudo científico sobre terapia celular no Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do proprietário/tutor legal