

RONIELLE PEREIRA RIBEIRO DE SOUSA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS ADIPODERIVADAS DE SUINOS**

TERESINA-PI
2019

RONIELLE PEREIRA RIBEIRO DE SOUSA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS ADIPODERIVADAS DE SUINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Serviço de Processamento Técnico

S725i Sousa, Ronielle Pereira Ribeiro de.
Isolamento e caracterização de células-tronco
mesenquimais adipoderivadas de suínos. / Ronielle Pereira
Ribeiro de Sousa. – 2020.
44 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Área Sanidade e Reprodução Animal,
Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

Orientação: “Prof.^a Dra. Maria Acelina Martins de
Carvalho.”.

1. Suíno. 2. Células-tronco mesenquimais adipoderivadas.
3. Diferenciação celular. 4. Imunofenotipagem. Título I.

CDD 636.085

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS ADIPODERIVADAS DE SUÍNOS

RONIELLE PEREIRA RIBEIRO DE SOUSA

Dissertação aprovada em: 17/06/2019

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto (Interno) / DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Miguel Ferreira Cavalcante Filho (Interno) / DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Dayseanny de Oliveira Bezerra (Externa) / IFPI

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:13 - Bíblia Sagrada

Dedico,

A Deus, por toda força, amparo e foco para poder concretizar meus objetivos.

Aos meus pais Francisco Ribeiro de Sousa e Antônia Maria Pereira pelo amor, educação, carinho e força em todos os momentos da minha jornada de vida.

Aos meus irmãos Antônio Rômulo e Ronilson Pereira pelo companheirismo e compreensão.

A minha namorada Roberta Santos pelo carinho, apoio e incentivo nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido o dom da vida e pela força que me foi dada para superar todos os obstáculos, por ter iluminado o meu caminho e me ensinado a ser um homem de fé.

Aos meus pais, Francisco Ribeiro de Sousa e Antônia Maria Pereira, por serem o alicerce da minha vida, apoiando-me em todas as decisões. Agradeço por terem me educado sempre com dignidade, respeito, sinceridade e amor. Aos meus irmãos, Antônio Rômulo Pereira Ribeiro de Sousa e Ronilson Pereira Ribeiro de Sousa, pelo companheirismo, pelo apoio que me foi dado em todos os momentos. À minha namorada Roberta Santos por toda ajuda, apoio, e companheirismo em todos os momentos compartilhados. E aos familiares que me ajudaram a perseverar em minha jornada acadêmica.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelas oportunidades de conhecimento e qualificações que foram conferidas, tanto para minha formação acadêmica de Medicina Veterinária como no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a elaboração e desenvolvimento desta pesquisa.

À Prof. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho pela orientação, dedicação, confiança, disponibilidade, incentivo e carinho. Sua vasta experiência foi de fundamental importância para meu crescimento profissional e pessoal. Minha eterna gratidão, pois, vossa senhoria me acolheu em um momento difícil e nunca desistiu de mim.

Ao Prof. Dr. Miguel Ferreira Cavalcante Filho por todo apoio e conselhos oportunos que foram essenciais nessa caminhada. Obrigado pela amizade e por acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto por toda a orientação dada durante a pesquisa. Os conhecimentos e ensinamentos do senhor foram fundamentais para mim. Obrigado pela paciência e por ter acreditado em mim.

À Profa. Dra. Dayseanny de Oliveira Bezerra por ter sempre me incentivado durante a pesquisa. Sou muito grato pelo apoio cedido durante os procedimentos cirúrgicos e toda a orientação.

Às doutorandas Elis Rosélia Dutra de Freitas Siqueira Silva, Huanna Waleska Soares Rodrigues e ao graduando Wanderson Gabriel Gomes de Melo pela paciência e apoio no

Laboratório de Cultivo Celular do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt).

Aos Mestres Hermínio José e Yago Gabriel pela colaboração durante os procedimentos cirúrgicos.

Aos Pós-graduandos do NUPCelt que contribuíram com seus conhecimentos específicos Renata, Lorena, Lucilene, Charlys e Gustavo.

Aos Funcionários do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt): Janete, Cleyton, Hermínio, Fabiana, Leiliane, Flávia e Luciana por fornecerem ambiente adequado para realização desta pesquisa e por terem sempre incentivado nessa caminhada.

Aos meus amigos oficiais veterinários da Polícia Militar do Maranhão pela compreensão durante o período de realização do Mestrado.

Por fim, aos meus amigos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ...	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	13
CAPÍTULO I	18
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
Animais	22
Coleta de tecido adiposo subcutâneo	22
Isolamento e expansão celular	22
Ensaio de Unidade Formadora de Colônia	24
Ensaio de cinética celular.....	24
Ensaio de plasticidade.....	25
Caracterização imunofenotípica.....	25
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblastoídes (UFC) de CTMA.....	27
Figura 2.	Curva de crescimento por saturação em triplicata de uma cultura de células-tronco mesenquimais adipoderivadas de suínos em 3º passagem utilizando corante Azul de Trypan.....	28
Figura 3.	Curva de crescimento por saturação em triplicata de uma cultura de células-tronco mesenquimais adipoderivadas de suínos em 3º passagem utilizando MTT.....	29
Figura 4	Ensaio de plasticidade celular em células-tronco mesenquimais adipoderivadas de suínos em 3ª passagem.....	30
Figura 5	Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo em histograma.....	31
Figura 6.	Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo em dot plot.....	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CD - Células Dendríticas

CTE - Células-Tronco Embrionárias

CTI - Células-Tronco Induzidas

CTM - Células Tronco Adultas, Somáticas ou Mesenquimais

CTMA - Células Tronco Mesenquimais Adipoderivadas

DMSO - Dimetilsulfóxido

IM - Intramuscular

IR - Isquemia Reperfusão

MPO - Mieloperoxidase

MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NK - Células Natural Killer

ROS - Radicais Livres de Oxigênio

SFB - Soro Fetal Bovino

SOD - Superóxido Dismutase

UFC - Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

As células-tronco adipoderivadas (ADSC) constituem-se numa subpopulação de células-tronco mesenquimais amplamente estudadas, dada a facilidade de obtenção de tecido adiposo subcutâneo, em humanos e animais, para isolamento celular. Diversos protocolos de cultivo celular tem sido descritos na literatura especializada, com grande variabilidade dos dados de clonogenicidade, cinética celular e viabilidade, denotando a necessidade de reprodutibilidade e padronização das técnicas de cultivo e ensaios *in vitro*. Assim, este trabalho tem como objetivo caracterizar as ADSC suínas, por meio de método enzimático utilizando apenas 1 grama de tecido subcutâneo, empregando 4 ensaios *in vitro* fundamentais. Para tanto, a coleta de tecido adiposo foi realizada em dois porcos hígidos, com idade entre 70-90 dias, oriundos do criatório de suínos do setor de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí. O material foi dissociado mecanicamente em uma placa de petri, sendo adicionado colagenase do tipo I para digestão enzimática, incubado em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade durante 30 minutos. A reação enzimática foi neutralizada pela adição de meio de cultura basal completo alpha-MEM a 37°C, suplementado. As culturas foram expandidas em garrafas de 25cm² até a 3 passagem, fotografadas em microscópio invertido. Após o estabelecimento da cultura, foi realizada a avaliação da morfologia celular, ensaio de unidade formadora de colônia, cinética celular utilizando azul de Trypan e MTT, plasticidade e caracterização imunofenotípica. O processo de isolamento das CTMA demonstrou em todas as amostras adesão à superfície plástica e morfologia celular variando de fusiforme a fibroblastoíde, núcleos esféricos e proliferação em monocamada, comprimento médio de 46,34 ± 13,50µm e largura média de 7,61 ± 1,23µm. No ensaio de UFC foi possível observar a formação de 187 colônias bem definidas. Na curva de crescimento com Trypan as células apresentaram concentração média de 1,69 ± 1 x 10⁵ células por poço cultivado e viabilidade média de 90,94 ± 0,05%, exibindo as fases LAG, LOG, PLATEAU e DECLÍNIO. Quanto ao MTT demonstraram absorvância média de 2,39 ± 0,72, apresentando as fases LAG, LOG e DECLÍNIO, não sendo observada fase PLATEAU. As CTMA apresentaram diferenciação nas três linhagens, adipogênica, osteogênica e condrogênica. Quanto à caracterização por citometria de fluxo expressaram CD14-/CD90+/CD105+. Conclui-se que, o tecido adiposo de suíno apresenta uma população distinta de células-tronco mesenquimais capaz de manter-se em expansão contínua, em cultivo, originando três linhagens celulares mesodermis distintas e expressando os marcadores específicos, o que demonstra a eficácia do método.

Palavras-chaves: Suíno, células-tronco mesenquimais adipoderivadas, diferenciação celular, imunofenotipagem.

ABSTRACT

Adipoderivated stem cells (ADSC) are a subpopulation of mesenchymal stem cells widely studied, given the ease of obtaining subcutaneous adipose tissue, in humans and animals, for cell isolation. Several cell culture protocols have been described in the specialized literature, with great variability of data on clonogenicity, cell kinetics and viability, denoting the need for reproducibility and standardization of culture techniques and in vitro tests. For this reason, this work aims to describe the characterization of swine ADSC, by means of an enzymatic method using only 1 gram of subcutaneous tissue, using 4 fundamental in vitro assays. Therefore, the collection of adipose tissue was carried out in two healthy pigs, aged between 70 and 90 days, being the pig breeding base of the Animal Science sector of the Federal University of Piauí. The material was mechanically dissociated into a petri dish, added to a type I mixture for enzymatic digestion, incubated in an oven at 37°C with 5% CO₂ and 95% humidity for 30 minutes. The enzyme was neutralized by the addition of basal culture medium alpha-MEM at 37°C, supplemented. The waves were expanded in bottles of 25cm² to 3 passages, photographed under inverted microscope. After the establishment of the culture, a cellular morphological evaluation, colony elution assay, cell kinetics using Trypan blue and MTT, plasticity and immunophenotypic characterization were performed. The ADSC Isolation Process demonstrated in all the adhesion samples the plastic surface and cellular morphology of a fusiform fibroblast, spherical nuclei and monolayer proliferation, mean length of 46.34±13.50µm and Mean Width of 7.61±1,23µm. No reaction from the CFU was able to observe a formation of 187 well-defined colonies. In the growth curve based on the mean of 1.69±1x10⁵ cells per well cultivated and mean path of 90.94 ± 0.05%, displaying as phases LAG, LOG, PLATEAU and DECLINE. As for MTT, they showed an average absorption of 2.39±0.72, presenting LAG, LOG and DECLINE phases, not being followed by the PLATEAU phase. As ADSC, the differentiation in the three strains, adipogenic, osteogenic and chondrogenic. Regarding the characterization by flow cytometry they expressed CD14- / CD90 + / CD105 +. It is concluded that the pig adipose tissue presents a distinct population of mesenchymal stem cells able to keep expanding, in culture, originating three distinct mesoderm cell lines and expressing the specific silhouettes, which demonstrates an action of the method.

Keywords: Swine, Adipoderivated Mesenchymal Stem Cells, Cellular diferenciation, imuno, immunophenotyping.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Células-tronco são definidas por serem células não especializadas que têm como características principais a capacidade de auto renovação (mitose simétrica) e a capacidade de diferenciação em tipos celulares especializados (mitose assimétrica), podendo estar presentes em diversos sítios das mais variadas fases de desenvolvimento, podendo ser classificadas de acordo com sua origem potência e sua origem (KALRA et al., 2014)

Com relação à origem, podem ser classificadas em células-tronco embrionárias (CTE), células tronco adultas, somáticas ou mesenquimais (CTM) e células-tronco induzidas (CTI). As CTE são totipotentes originadas da massa interna do blastocisto durante a fase de gastrulação do embrião (SYLVESTER; LONGAKER, 2004). As CTM são células estromais não hematopoiéticas presentes em tecidos não embrionários, toti ou multipotentes, capazes de se diferenciar e contribuir na regeneração de tecidos mesenquimais como os ossos, cartilagem, músculo, ligamentos, tendões e gordura (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; KALRA *et al.*, 2014). As CTI são pluripotentes derivadas de alterações genéticas e fisiológicas de células diferenciadas de tecidos adultos (WILSON; WU, 2015).

De acordo com a plasticidade, isto é, a capacidade de diferenciação as células-tronco podem ser classificadas como totipotentes, quando apresentam capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células; pluripotentes quando se diferenciam em praticamente todos os tipos de células, exceto as células de placenta, a exemplo das células embrionária derivadas do endoderma, mesoderma e ectoderma; multipotente, quando tem habilidade de se diferenciar em todas as células de mesma família; oligopotentes, quando tem capacidade de diferenciação em poucos tipos de células e onipotentes, em apenas um tipo celular. (BISSELS; ECKARDT; BOSIO, 2013).

As CTM apresentam potencial terapêutico devido a sua capacidade de auto renovação e diferenciação em multilinhagens, além de estarem em destaque devido a capacidade de servirem como suporte para a sobrevivência de outras células, sendo muito utilizado em pesquisas científicas (BUTLER *et al.*, 2016). Em cultura *in vitro*, essas células apresentam características específicas às quais são utilizadas em sua definição, de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISTC).

Caracterizam-se por serem plástico-aderentes, apresentarem morfologia fusiforme ou fibroblastoide, e apresentarem os antígenos de membrana CD75, CD90 e CD103, baixa expressão de MHC-1 além da expressão virtual (<2%) dos antígenos CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006; CASTRO-MANRREZA e MONTESINOS, 2015).

As propriedades de regulação imune, mais estudadas, são ligadas à ativação, proliferação, diferenciação e função efetora dos linfócitos T. Relato feito por Ramasamy *et al.* (2008) demonstra que as CTM derivadas da medula óssea a serem cocultivadas com linfócitos T, previnem a expressão dos antígenos CD25 e CD69, essenciais para a ativação dessas células. Para Castro-Manrezza *et al.* (2015) os linfócitos TCD3+ ativados cocultivados com CTM reduzem a secreção de interferon- γ (IFN γ).

Em relação à proliferação das células T, Hystad *et al.* (2007) verificaram que em cocultivo com CTM, se mostrou reduzida proporcionalmente à concentração de CTM utilizada. Nos quesitos diferenciação e função efetora, estudos demonstram que as CTM modulam a diferenciação das células T no padrão Th2, o que leva à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL17, IL22, IFN γ e TNF α (GHANNAN *et al.*, 2010).

Além das células T, as células dendríticas (CD), que são células derivadas de monócitos, especializadas em apresentação de antígenos, também são moduladas pelas CTM. Jiang *et al.* (2005) observaram que ao tentar ativar CD imaturas cocultivadas com CTM utilizando lipopolissacarídeos, estas permaneceram-se imaturas.

Células Natural Killer (NK) e linfócitos B também são afetados pelas CTM. Aggarwal e Pittenger (2005) observaram que ao cocultivar células NK com CTM, a secreção de IFN γ reduziu significativamente. Para Corcione *et al.* (2006) as CTM diminuem a população de linfócitos B por induzirem a manutenção destas células em fases G0 e G1 do ciclo celular.

Essas células vêm sendo bastante utilizadas nos últimos anos em diversas terapias para reparo tecidual, pois apresentam maior segurança e são facilmente isoladas. Na regeneração de tecido ósseo fraturado, defeitos cartilagosos, feridas cutâneas crônicas e órgãos isquêmicos, tanto em humanos quanto em modelos animais (VILQUIN; ROSSET, 2006; ABDALLAH; KASSEM, 2008; ARGOLO NETO *et al.*, 2016; ALVES *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018). No tratamento de doenças auto-imunes (YAMADA *et al.*, 2014) e na biotecnologia da reprodução (TOMASZEWSKI *et al.*, 2019; BEZERRA *et al.*, 2019). Ainda, como adjuvantes em transplantes de órgãos, devido a sua atividade imunorregulatória, agindo de

maneira isocrônica com células do sistema imune inato e adaptativo através do contato entre as células ou a partir de substâncias secretadas (MA *et al.*, 2014).

O tecido adiposo é constituído por adipócitos maduro, pré-adipócitos, células vasculares, células endoteliais, células do sistema monocítico fagocitário, células linfocíticas, fibroblastos e miócitos, também representa uma fonte de células-tronco mesenquimais adipoderivadas (CTMA), podendo-se adquirir, de forma não invasiva, grande quantidade destas células (GIMBLE; KATZ; BUNNEL, 2007; TOBITA; OBRBAY; MIZUNO, 2011). Protocolos para o isolamento e cultivo celular experimental possibilitam altos níveis de viabilidade e rendimento a partir de tecido de origem subcutânea ou visceral (BAER, GEIGER, 2012; BERTALOSSO *et al.*, 2013).

De acordo com Guercio *et al.*, 2013, no cão a localização do tecido adiposo, a quantidade e as características das CTMA são diferentes. Na gordura subcutânea da região braquial apresenta maior densidade populacional destas células, comparada à situada na gordura visceral, porém, as CTMA isoladas de gordura inguinal apresentam maior plasticidade.

Segundo Gronthos *et al.* (2001), as CTMA recém isoladas formam uma população bastante heterogênea, que fenotipicamente apresentam perfil antigênico diversificado, apresentando características de CTM, células progenitoras hematopoiéticas, pericitos e células hematopoiéticas, cujo perfil se enquadra CD31-, CD34 variado, CD45 variado, CD90+, CD105- e CD146 variado. Já em culturas puras, a expressão é diferenciada, os níveis de CD117 se tornam elevados, HLA-DR+, CD34 variável, sendo que as células CD34+ apresentam maior capacidade proliferativa e as CD34- maior capacidade plástica.

A aparência das CTMA durante cultura é semelhante às demais CTM, mostrando-se plástico-aderente e morfologia fibroblastoide (MANI *et al.*, 2008). A capacidade proliferativa é maior que as CTM derivadas de medula-óssea CTMMO, apresentando fase logarítmica de crescimento mais longo, tal característica depende da idade do doador e da localização do tecido adiposo fonte das células; entretanto a senescência das CTMA e CTMMO é semelhante (DE UGARTE *et al.*, 2003). Foi relatado por Torsvik *et al.*, 2010 que quando as CTMA são cultivadas por mais de 4 meses, podem sofrer alterações genômicas e citogenéticas capazes de ocasionar transformação maligna das células, ocasionando a formação de neoplasias caso utilizadas em terapia celular.

O potencial plástico das CTMA é bastante rico, podendo se diferenciar em células de linhagens mesodérmica, ectodérmica e endodérmica, principalmente, adipócitos, osteócitos, condrócitos, miócitos, cardiomiócitos e células periodontais. Além da possibilidade de diferenciação em neurônios e células progenitoras neurais, e ainda, em hepatócitos (ANZALONE *et al.*, 2010).

Segundo Hu *et al.* (2014), estudando o cão, as CTMA diferenciam-se em células semelhantes a fibroblastos, pela regulação de fatores de crescimento de tecido conjuntivo. Já Zhou *et al.* (2019) trabalhando com camundongos, ativaram a diferenciação de CTMA em fibroblastos e verificaram aumento da produção de fibras colágenas, utilizando a matriz extracelular do tecido adiposo, propiciando a regeneração de feridas cutâneas. Santos *et al.* (2018) ao tratar lesões tendíneas no coelho, utilizando tratamento cirúrgico convencional e com o uso de CTMA, observaram que os resultados biomecânicos se mostraram superiores no tratamento cirúrgico com CTMA em relação ao convencional. Em ratos, Seki *et al.* (2013) observaram melhoras bioquímicas ao administrar essas células por via intra-arterial no fígado de animais cirróticos.

Durante procedimentos cirúrgicos em órgãos parenquimatosos, uma das principais complicações são as lesões de isquemia reperfusão (IR), que resultam na formação de radicais livres de oxigênio (ROS) levando a danos na membrana lipídica das células e aumentando a frequência de lesões na fita dupla de DNA (CENTURION *et al.*, 2002). Burgossilva *et al.* (2015) induzindo a nefrotoxicidade em rim de rato, demonstraram que as CTMA apresentam atividade antioxidativa pela regulação de enzimas, superóxido dismutase (SOD) e mieloperoxidase (MPO), além de verificarem redução na concentração de malondialdeído (MDA), importante biomarcador de lesão na membrana plasmática. Já Ge *et al.* (2018), Sheashaa *et al.* (2016) e Yang *et al.* (2012) obtiveram sucesso na diminuição de danos ocasionados pela lesão de IR em fígado, rim e coração, respectivamente, utilizando CTMA.

O meio condicionado de CTMA de humanos foi utilizado no cultivo de folículos ovarianos de ratos em ambiente tridimensional por Tomaszewski *et al.* (2019), que afirmaram ocorrer incremento na foliculogênese primária desses animais, indicando que as células secretam fatores que aumentam a sobrevivência folicular.

As quimioterapias para tratamento de câncer apesar de benéficas para sobrevida humana apresentam um efeito colateral quanto a destruição dos folículos ovarianos. A terapia tradicional

para evitar os malefícios das quimioterapias é a reposição hormonal, no entanto, há o risco de reincidência do câncer, sendo as CTMA um método alternativo nesse tratamento (MEIROW *et al.*, 2008). Para Sun *et al.* (2013) utilizando CTMA no tratamento de falha ovariana devido a quimioterapia houve aumento no número de oócitos viáveis, provavelmente devido a alterações na expressão genica e síntese parácrina de citocinas.

A espécie suína (*Sus domesticus*) é uma importante fonte de tecido adiposo e apresenta grande compatibilidade imunológica com a espécie humana, tornando-se um modelo experimental ideal na realização de ensaios pré-clínicos e clínicos utilizando CTMA (PARK; KOO; LEE, 2015).

Experimentos realizados por Ren *et al.* (2012), demonstraram que as CTMA de suíno apresentam alta capacidade de expansão *in vitro*, morfologia semelhante a um fibroblasto, viabilidade média de 95%. Apresentam-se positivas para os antígenos CD29, CD90 e CD44, e negativas para o antígeno CD31. Tais células apresentaram baixo grau de senescência, sendo inferior a 5% em 7ª passagem, e inferior a 10% em 10ª passagem.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o comportamento *in vitro* das células tronco mesenquimais adipoderivadas de suínos (CTMA), avaliando-se a autorrenovação destas células, o potencial de diferenciação e a caracterização imunofenotípica, visando sua utilização em futuras pesquisas na medicina regenerativa.

Este trabalho encontra-se estruturado conforme a Resolução 001/03-CCMCA de 22.05.2003, que estabelece normas editoriais do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. À vista disso, está dividido em: Introdução e Revisão de Literatura do assunto pesquisado, seguido de um capítulo elaborado em formato de artigo científico intitulado “**Caracterização de população de células-tronco adipoderivadas subcutâneas de suínos**” de acordo com as normas do periódico *Acta Scientiae Veterinariae.*; e as considerações finais.

CAPÍTULO I*

*Apresentado segundo normas do periódico *Acta Scientiae Veterinariae*

Acta Scientiae Veterinariae
RESEARCH ARTICLE

Caracterização de População de Células-Tronco Adipoderivadas Subcutâneas de Suínos

Ronielle Pereira Ribeiro de Sousa¹, Wanderson Gabriel Gomes de Melo², Elis Roselia Dutra de Freitas Siqueira Silva³, Dayseanny de Oliveira Bezerra⁴, Napoleão Martins Argôlo Neto⁵, Miguel Ferreira Cavalcante Filho⁶ & Maria Acelina Martins de Carvalho⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil. ²Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil. ³Doutora em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil. ⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, IFPI, Paulistana, PI, Brasil. ⁵Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil. ⁶Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil. CORRESPONDENCE: R.P.R. Sousa [roniellesousa@hotmail.com – Tel. +55 86 99829-0940]. Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células Tronco, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Bairro Socopo, CEP: 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

Introdução As células-tronco adipoderivadas (ADSC) constituem-se numa subpopulação de células-tronco mesenquimais amplamente estudada, dada a facilidade de obtenção de tecido adiposo subcutâneo, em humanos e animais, para isolamento celular. Diversos protocolos de cultivo celular tem sido descritos na literatura especializada, com grande variabilidade dos dados de clonogenicidade, cinética celular e viabilidade, denotando a necessidade de reprodutibilidade e padronização das técnicas de cultivo e ensaios in vitro.

Materiais, Metodos e Resultados: O tecido adiposo foi obtido de dois suínos sadios, com idade entre 70-90 dias. As culturas foram expandidas em garrafas de 25cm² em 3 passagens, para estabelecimento da cultura, e realizada a avaliação da morfologia celular, ensaio de unidade formadora de colônia, cinética celular utilizando azul de Trypan e MTT, plasticidade e caracterização imunofenotípica. O processo de isolamento das CTMA demonstrou adesão à

superfície plástica e morfologia celular de fusiforme a fibroblastoíde, núcleos esféricos e proliferação em monocamada, comprimento médio de $46,34 \pm 13,50\mu\text{m}$. No ensaio de UFC foi possível observar a formação de 187 colônias. Na curva de crescimento com Trypan as células apresentaram concentração média de $1,69 \pm 1 \times 10^5$ células por poço cultivado e viabilidade média de $90,94 \pm 0,05\%$. Quanto ao MTT demonstraram absorvância média de $2,39 \pm 0,72$. As CTMA apresentaram diferenciação nas três linhagens. Quanto à caracterização por citometria de fluxo expressaram CD14-/CD90+/CD105+.

Discussão: A efetividade do método utilizado para o isolamento de CTMA-su permitiu, por meio de procedimento minimamente invasivo, o fornecimento de grande quantidade de células. Estas apresentaram-se plástico-aderentes e a morfologia encontrada corrobora com o disposto na literatura. Quanto à cinética de CTMA-su, o desempenho da cultura tanto utilizando o Azul de Trypan quanto o MTT demonstram alta capacidade de auto-renovação, semelhante ao descrito para outros tipos celulares. Quando induzidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, as CTMA-su demonstraram características morfológicas especializadas de cada linhagem celular, confirmando a multipotencialidade. Neste estudo, as CTMA-su mostraram alta expressão de CD105, e expressão positiva, porém baixa, de CD90, além de ausência de expressão do marcador hematopoiético CD14, excluindo a possibilidade do isolamento de outro tipo celular

Palavras-chave: cultura celular, células-tronco mesenquimais, tecido adiposo, diferenciação celular.

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais se destacam pelo potencial terapêutico, sua capacidade de auto renovação e diferenciação em multilinhagens, além de servirem como suporte para a sobrevivência de outros tipos celulares, sendo muito utilizado em pesquisas científicas [8]. Em cultura in vitro, essas células apresentam características específicas às quais são utilizadas em sua definição, de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISTC).

Essas células têm como características principais a capacidade de auto renovação (mitose simétrica) e a capacidade de diferenciação em tipos celulares especializados (mitose assimétrica), podendo estar presentes em diversos sítios das mais variadas fases de desenvolvimento [21]. Apresentam morfologia fusiforme ou fibroblastoide, e expressam os antígenos de membrana CD75, CD90 e CD103 [12,10].

O tecido adiposo é constituído por adipócitos maduro, pré-adipócitos, células vascularesfibroblastos e miócitos, e ainda, representa fonte de células-tronco mesenquimais adipoderivadas (CTMA), podendo-se adquirir, de forma não invasiva, grande quantidade destas células [16,29]. Protocolos para o isolamento e cultivo celular experimental de CTMA possibilitam altos níveis de viabilidade e rendimento a partir de tecido de origem subcutânea ou visceral [6,7].

O comportamento das CTMA foi estudado em diversas espécies animais tendo em vista sua utilização em terapias celulares e engenharia tecidual, incluindo ratos [27], cão [19], coelho [26] e camundongo [30].

A espécie suína (*Sus domesticus*) é uma importante fonte de tecido adiposo e apresenta grande compatibilidade imunológica com a espécie humana, tornando-se um modelo experimental ideal na realização de ensaios pré-clínicos e clínicos utilizando CTMA [23].

Assim o objetivo deste trabalho foi caracterizar uma população de células-tronco mesenquimais adipoderivadas suína, por meio de ensaio de plasticidade, clonogenicidade, cinética celular e imunofenotipagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para a obtenção do tecido adiposo foi utilizado dois suínos saudáveis, com idade entre 70-90 dias, oriundos do setor de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí (UFPI) alimentados com ração para suínos em fase inicial e água *ad libitum*.

Coleta de tecido adiposo subcutâneo

Os suínos foram anestesiados com Ketamina (15mg/kg) e midazolam (1mg/Kg) e analgesia com tramadol (2mg/Kg) por via intramuscular (IM). Ao longo da região cervical ventral foi realizada tricotomia e higienização com álcool e iodopovidona (PVP-I). A incisão de 4cm na pele para coleta foi realizada em proximidade topográfica na região do esterno, especificamente no manúbrio, uma vez que a cicatrização é mais rápida e com menor incidência de miíase. Após incisão da pele realizou-se a coleta de fragmentos de 1g tecido adiposo subcutâneo que foram alocados em tubos cônicos de 50ml (TPP®, Trasadingen, Suíça) para posterior isolamento.

O pós-operatório foi realizado por 3 dias com limpeza diária no local da ferida cirúrgica utilizando clorexidina degermante a 2% (Riohex®), administração de antibiótico enrofloxacina a 10% (Baytril®) na dose de 2,5mg/Kg e anti-inflamatório flunixin meglumina (Banamine®) na dose de 1,1mg/Kg, IM.

Isolamento e expansão celular

Em câmara de fluxo laminar, os fragmentos de tecido adiposo coletados foram lavados duas vezes em solução salino-fosfato tamponante (PBS – *Phosphate Buffered Saline*) com 10% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina, Sigma-Aldrich®) e dissociado mecanicamente por 5 minutos com auxílio de duas lâminas de bisturi estéril n° 24, em placa de Petri estéril. Para digestão enzimática foi adicionado 1mg/mL de colagenase do tipo I (Sigma), previamente diluída na proporção de 1:3, em meio de cultivo alpha-MEM.

O material foi incubado em estufa úmida (Thermo Scientific series II Water Jacket, USA) a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade durante 30 minutos. Em seguida, a reação enzimática foi neutralizada pela adição de meio de cultura basal completo alpha-MEM a 37°C, suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma® N° M7145), com volume duas vezes superior ao da solução de digestão enzimática.

As amostras, em tubos cônicos de 15 mL (TPP®, Trasadingen, Suíça) foram transferidas para banho maria à 37°C por 30 minutos, e a cada 10 minutos os tubos eram agitados em vórtex. O conteúdo da digestão foi aspirado, filtrado em malhas de 100µm e centrifugado a 20°C em meio alpha a 1000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento celular foi ressuspenso em 1mL de meio alpha-MEM a 37°C e plaqueado em três garrafas de cultura de 25 cm² (TPP®, Trasadigen, Suíça) mantidas em 37°C, com atmosfera úmida, na presença de 5% de CO₂. As culturas foram acompanhadas a cada três dias, com troca regular do meio de acordo com o consumo dos seus nutrientes e a expansão feita após 80% de confluência do meio, por processo de tripsinização.

As garrafas de cultura foram tripsinizadas adicionando 2 mL de tripsina (Cultilab®, solução tripsina 2,500g/L e EDTA 250mg/L) e incubadas durante 10 minutos. Decorrido esse

período, inativou-se a ação da tripsina com adição de 4mL de meio alpha-MEM suplementado. A solução foi transferida para um tubo cônico de 15mL (TPP®, Trasadingen, Suíça) e centrifugada à temperatura de 20°C e 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento celular (*pellet*) foi ressuspensão em 1mL de meio alpha-MEM suplementado e efetuado contagem celular em hematocitômetro.

As culturas foram expandidas em garrafas de 25cm² (TPP®, Trasadingen, Suíça) até a 3ª passagem (P3), fotografadas em microscópio invertido (COLEMAN NIB-100®) e repicadas com o dobro da área original após confluência de 80%.

Ensaio de Unidade Formadora de Colônia

Para o teste de unidade formadora de colônia (UFC) foi alicotada uma amostra de CTMA em passagem 0 (P0) em garrafa de 25cm². Após o plaqueamento foram realizadas trocas de meio conforme necessidade da cultura até a formação do máximo de colônias com mais de 20 células. As células foram fixadas com paraformaldeído (Vetec®) a 4% durante 30 minutos e coradas com Giemsa por 10 minutos à temperatura ambiente, lavando-se o excesso com água destilada. As colônias foram contadas sobre a superfície da garrafa de 25cm². As células foram mensuradas utilizando máscara micrometrada em software ImageJ.

Ensaio de cinética celular

A cinética celular foi analisada mediante curva de crescimento por saturação, na qual é feito repique de células, sendo aliqüotadas $7,6 \times 10^3$ células na 3ª passagem (P3), em triplicata, em placas de 24 poços, e o meio de cultura substituído a cada 72h. A cada 3 dias, 3 poços eram escolhidos aleatoriamente e o meio de cultivo foi substituído por solução de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e Alpha-MEM na proporção de 1:9 e

mantidos em cultivo por 24h, em seguida a solução foi descartada e adicionado dimetilsulfóxido (DMSO), prontamente a solução foi alocada em placa para ELISA e levada para leitura em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 550nm. O procedimento foi executado a cada 72h, no período de 19 dias. Como controle foi utilizada modificação da avaliação cinética convencional, descrita por [3], onde foram escolhidos 3 poços com células tripsinizadas, sendo a concentração e viabilidade celular calculadas, utilizando-se o corante Azul de Trypan.

O uso do corante Azul de Trypan para análise de viabilidade celular é baseado no princípio de que a membrana plasmática íntegra em células vivas exclui corantes específicos enquanto células mortas não. Entretanto este teste possui algumas limitações. A coloração pode ser incorporada por células vivas após um curto período de tempo além da capacidade pessoal relacionada a expertise do avaliador pode afetar os resultados [5].

O ensaio de MTT ocorre a partir da reação de redução do tetrazólio de MTT por células viáveis, o resultado de tal reação são sais insolúveis de formazan, que ao ser dissolvido em DMSO formam uma solução de coloração roxa, que ao ser mensurado em espectrofotômetro possibilita a verificação da viabilidade celular [25].

Ensaio de plasticidade

Para ensaio de plasticidade celular, foram induzidas diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica das CTMA em 3^a passagem (P3), utilizando Stempro Differentiation Kit, conforme protocolo do fabricante, descrita por [9].

Caracterização imunofenotípica

A identificação do perfil de células quanto a imunofenotipagem foi realizada utilizando anticorpos específicos. Desta forma, utilizou-se o marcador positivo exclusivo para CTM

CD105 (Anti-CD105 PE –Abcam Cambridge, USA, 10:100, cód. Ab53318), o marcador positivo para CTM e fibroblastos CD90 (Anti-CD90 APC - Abcam Cambridge, USA, 1:100, cód. 555596) e o marcador negativo para CTM CD14 (Anti-CD14 FITC-Sigma, USA, 1:100, cód. C7673).

As células expandidas em 3ª passagem (P3) foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS e posteriormente 10^6 células foram distribuídas em 2 tubos falcon sendo uma amostra controle (branco) sem utilizar anticorpos e o seguinte contendo os 3 anticorpos para citometria de fluxo. Em cada tubo foi adicionado 1mL de tampão FACS [DBPS (Dulbecco Phosphate Buffer Solution) contendo 0,1% de BSA], centrifugados 2000rpm por 10 minutos para lavagem e posteriormente acrescentando os anticorpos propostos para cada um dos marcadores a serem analisados. As células foram incubadas com o anticorpo conjugado por 30 minutos em temperatura ambiente. Logo após a incubação as células foram lavadas uma vez com 1mL tampão FACS para a retirada do excesso de anticorpo. As amostras foram analisadas utilizando um citômetro de fluxo (FACScanto® II) e software BD FACSDiva Software (Version 6.1.3), obtendo-se 30.000 eventos por amostras testada. As populações foram estimadas pela porcentagem das células expressando cada um dos marcadores em relação ao total de células adquiridas por meio do software INFINICYT (version 5.1). Os resultados foram plotados em forma de histograma e *dot plot* em marcação dupla ou tripla.

RESULTADOS

O processo de isolamento das CTMA-su demonstrou em todas as amostras adesão à superfície plástica e morfologia celular de fusiforme a fibroblastoíde. As primeiras células plásticas aderentes, com morfologia fibroblastoíde foram visualizadas aos 10 dias de cultivo celular, a confluência de 80% da área da garrafa de cultivo foi constatada aos 16 dias. Feita a

expansão, as células cultivadas até a 3ª passagem (P3), sempre apresentaram morfologia característica fibroblastóide, núcleos esféricos e proliferação em monocamada, comprimento médio de $46,34 \pm 13,50\mu\text{m}$ e largura média de $7,61 \pm 1,23\mu\text{m}$.

No ensaio de UFC foi possível observar a formação de 187 colônias bem definidas, as células apresentaram coloração basofílica e forte interação entre si (Figura 1).



Figura 1. Unidades formadoras de colônias fibroblastóides (UFC) de CTMA-su. Garrafa de cultivo celular de 25cm² evidenciando colônias de CTMA-su submetidos a coloração Giemsa (A). Fotomicrografia de CTMA-su evidenciando coloração basofílica e intensa interação celular (B).

Na curva de crescimento com Trypan as células apresentaram concentração média de $1,69 \pm 1 \times 10^5$ células por poço cultivado e viabilidade média de 90,94%. A curva exibiu fases LAG, LOG e DECLÍNIO. A fase inicial LAG ocorreu do 1º ao 4º dia, apresentando baixa proliferação celular. A partir do 4º dia ocorreu a fase LOG caracterizada pelo aumento exponencial da concentração celular atingindo seu ápice de concentração no 13º dia, quando a proliferação celular foi reduzida, e as concentrações celulares se reduziram, a partir do qual iniciou a fase de DECLÍNIO (Figura 2).

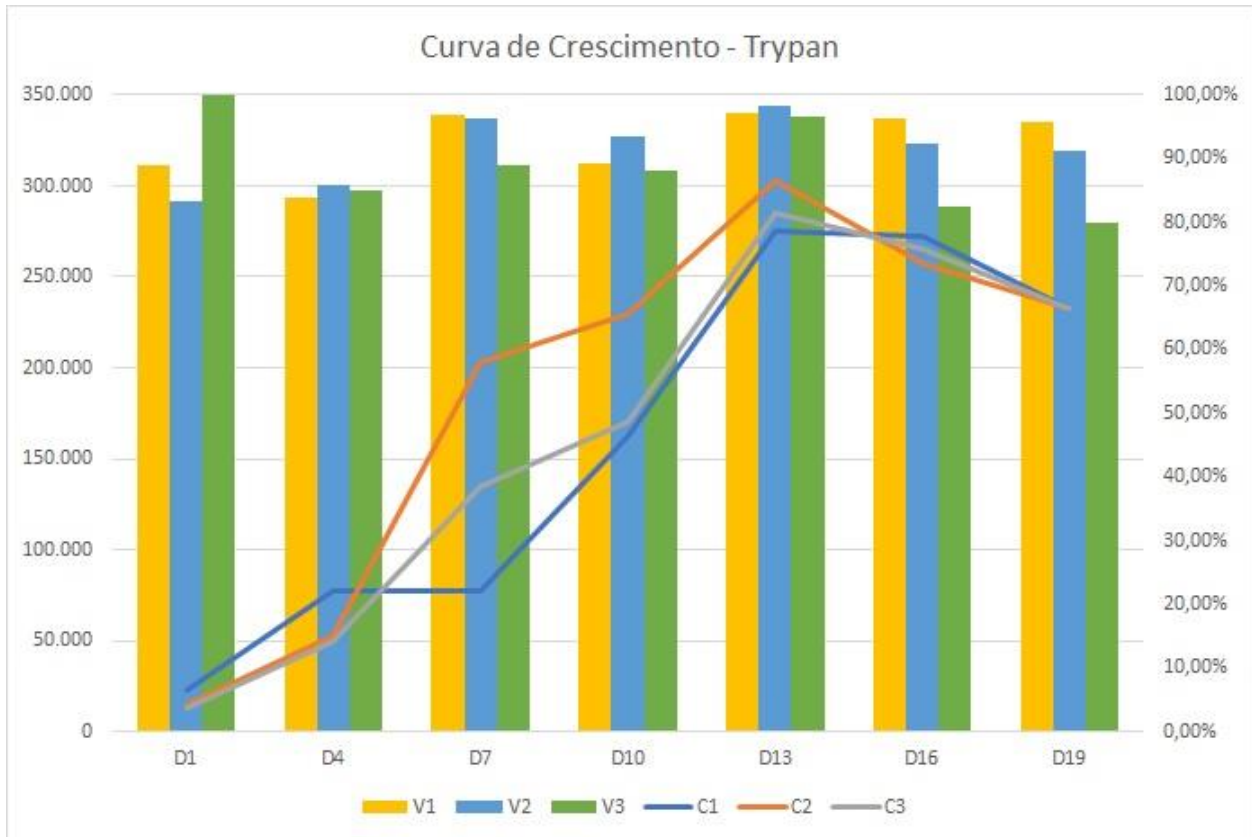


Figura 2. Curva de crescimento por saturação em triplicata de uma cultura de células-tronco mesenquimais adipoderivadas de suínos em 3ª passagem (P3) utilizando corante Azul de Trypan. As culturas exibiram fase LAG até o 4º dia (D4), fase LOG do 4º (D4) ao 13º dia (D13), iniciando a fase de DECLÍNIO. Viabilidade média de 90,94%.

Na curva de crescimento com MTT as células apresentaram absorvância média de $2,39 \pm 0,72$. Exibiu as fases LAG, LOG e DECLÍNIO. A fase inicial LAG ocorreu do 1º ao 4º dia, apresentando leve aumento. Do 4º dia ao 13º dia ocorreu a fase LOG caracterizada pelo aumento exponencial. Após atingir absorvância máxima esta foi reduzida até valores próximos ao inicial no 19º dia caracterizando fase de DECLÍNIO (Figura 3).

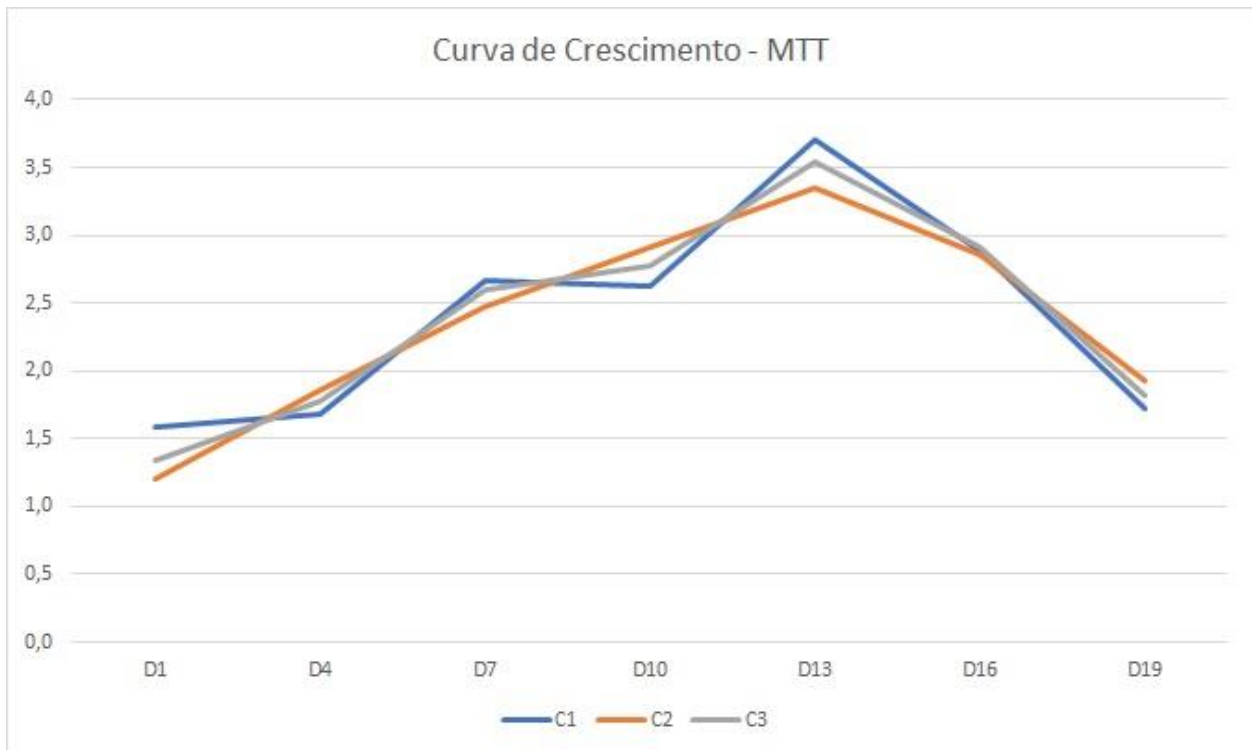


Figura 3. Curva de crescimento por saturação em triplicata de uma cultura de células-tronco mesenquimais adipoderivadas de suínos em 3^o passagem (P3) utilizando MTT. As culturas exibiram fase lag até o 4^o dia (D4), fase log do 4^o (D4) ao 13^o dia (D13) e fase de declínio até o 19^o dia (D19).

A diferenciação das células em três linhagens foi positiva (Figura 4). As culturas submetidas à diferenciação adipogênica apresentavam morfologia hexagonal, com citoplasma rico em vacúolos lipídicos evidenciados pela coloração Oil Red. Na diferenciação osteogênica pode-se observar matriz óssea rica em cálcio evidenciada pelo corante Alizarin Red. As submetidas à diferenciação condrogênica apresentaram mudança de morfologia e foi possível evidenciar a matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos através da coloração com Alcian Blue.

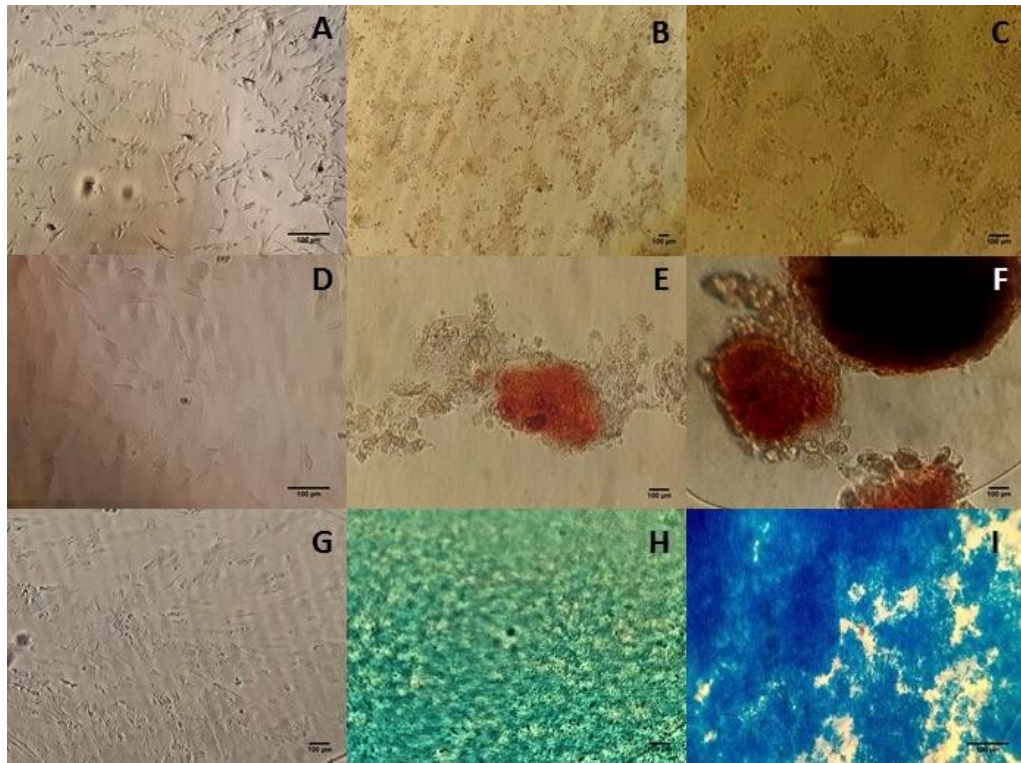


Figura 4. Ensaio de plasticidade em células-tronco mesenquimais adipoderivadas de suínos em 3ª passagem. Controle adipogênico (A), controle osteogênico (D) e controle condrogênico (G). Diferenciação adipogênica, evidencia-se vacúolos lipídicos corados com Oil Red, (B e C). Diferenciação osteogênica, verifica-se matriz óssea rica em cálcio, corados com Alizarim Red (E e F). Diferenciação condrogênica, observa-se a formação de matriz rica em glicosaminoglicanos evidenciados em azul, devido à coloração com Alcian Blue (H e I).

As CTMA-su caracterizadas por citometria de fluxo apresentaram expressão CD14-/CD90+/CD105+ (Figura 5). Ao se avaliar as porcentagens de expressão dos marcadores notou-se, ausência de marcação para CD14 e marcação positiva de 8,12% para CD90 e 99,43% para CD105 (Figura 6).

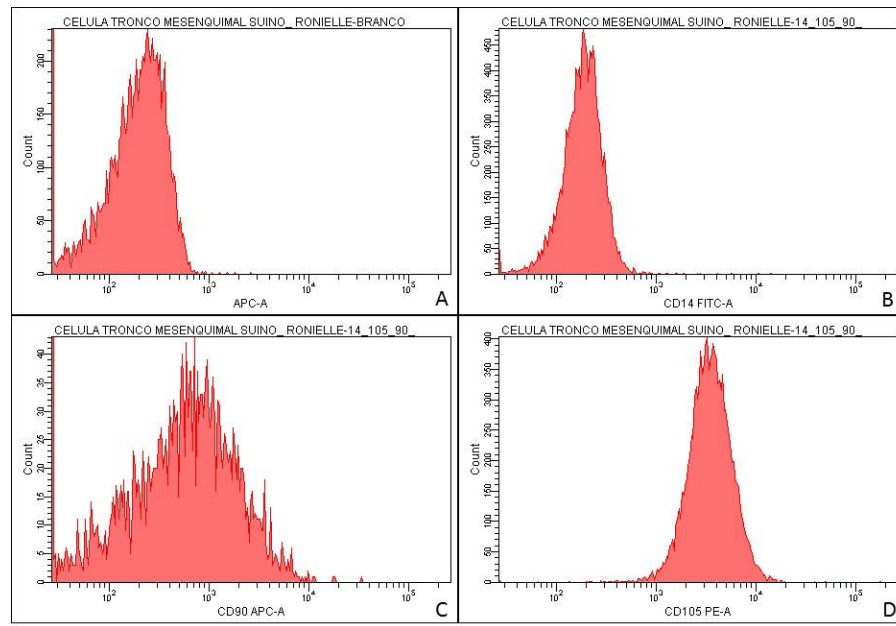


Figura 5. Análise da expressão de marcadores celulares de células tronco mesenquimais adipoderivadas subcutâneas de suínos em 3ª passagem, por citometria de fluxo em histograma. (A) Branco. (B) CD14 FITC. (C) CD90 APC. (D) CD105 PE.

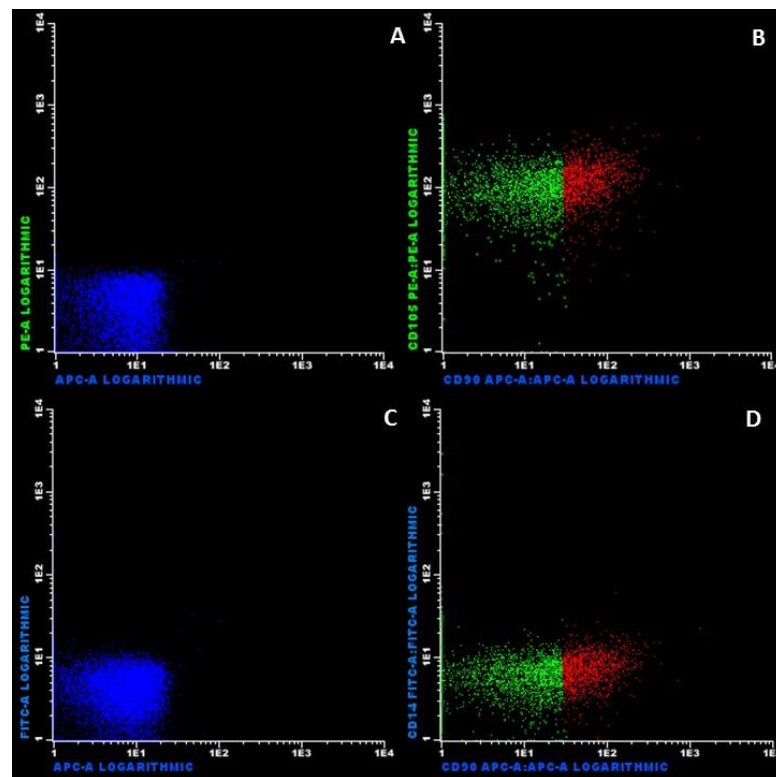


Figura 6. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo em dot plot. A: Branco para os fluorocromos PE e APC. B: Marcação positiva de 99,43% para CD105 (PE) e

8,12% para CD90 (APC). C: Branco para os fluorocromos FITC e APC. D: Ausência de marcação para CD14 (FITC) e 8,12% para CD90.

DISCUSSÃO

A efetividade do método utilizado para o isolamento de CTMA-su permitiu, por meio de procedimento minimamente invasivo, o fornecimento de grande quantidade de células, o que também foi verificado em outros experimentos, nos quais foi possível o isolamento de cerca de 5×10^9 CTMA em 1g de tecido [12,14,31]. A utilização de métodos enzimáticos para o isolamento de CTMA é convencional e amplamente útil como identificado por diversos autores [11,24,22], fornecendo células com características plásticas e imunofenotípicas semelhantes às CTMA isoladas em método de cultura de explante e às CTM de medula óssea [18].

As células apresentaram-se plástico-aderentes e a morfologia encontrada corrobora com o disposto na literatura, com células alongadas de formato fusiforme, semelhante a fibroblastos [2,11]. Em relação ao comprimento celular, o tamanho médio de $46,34 \pm 13,50 \mu\text{m}$ corresponde ao indicado em estudo anterior [15]. Embora a frequência observada da formação de unidades formadoras de colônia tenha grande variação na literatura, o resultado obtido neste estudo, apresentou grande número de colônias, quando comparado ao descrito na literatura, demonstrando a eficiência do processo de isolamento [9,13].

Quanto à cinética de CTMA-su o desempenho da cultura tanto utilizando o Azul de Trypan quanto o MTT demonstrou elevada capacidade de clonogenicidade, semelhante ao descrito para outros tipos celulares [3,9,28], capazes de realizar um grande número de divisões, principalmente pela manutenção de altas concentrações ocasionando uma exaustão dos nutrientes presentes no meio de cultivo, levando a cultura à depressão.

Quando induzidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, as CTMA-su apresentaram características morfológicas especializadas de cada linhagem celular, confirmando a multipotencialidade, característica comum às células-tronco mesenquimais obtidas de outras fontes e animais [1,2,4].

“The International Society for Cellular Therapy” definiu que as CTM devem expressar marcadores como CD105 e CD90 bem como não expressar marcadores de células hematopoiéticas [2]. Neste estudo, as CTMA-su mostraram alta expressão de CD105, e expressão positiva, porém baixa, de CD90, além de ausência de expressão do marcador hematopoiético CD14, excluindo a possibilidade do isolamento de outro tipo celular. A baixa expressão de CD90 pode estar associada a utilização de anti-corpos não específicos para a espécie suína, além da possibilidade de variação da composição antigênica conforme o sítio de coleta e baixa passagem, assim como, citados em outras investigações [20,17].

CONCLUSÃO

Conclui-se que as células-tronco mesenquimais adipoderivadas de suínos apresentam elevada atividade proliferativa, amplo potencial para diferenciação em multilinhagem, originando adipócitos, osteoblastos e condroblastos. A alta expressão do marcador CD105 e a baixa expressão do CD90 demonstram variação da composição antigênica devido ao sítio de coleta e baixa passagem. Os achados sugerem fortemente que as células células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de suínos, representam ferramenta promissora para uso em ensaios de terapia celular.

Ethical approval. Todos os protocolos utilizados durante os procedimentos foram condizentes com as diretrizes para uso e experimentação animal, aprovados junto a Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFPI sob n°269/16.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERÊNCIAS

- 1 ALIABOUZAR M., LEE S.J., ZHOU X., ZHANG G.L. & SARKAR K. 2018.** Effects of scaffold microstructure and low intensity pulsed ultrasound on chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 115: 495–506.
- 2 ALVES E.G.L., SERAKIDES R., ROSADO I.R., BOELONI J.N., OCARINO N.M. & REZENDE C.M.F. 2017.** Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e da medula óssea de cães. *Ciência Animal Brasileira*. 18: 1-14.
- 3 ARGÔLO-NETO N.M., FEITOSA M.L.T., SOUSA S.S., FERNANDES P.B., PESSOA G.T., BEZERRA D.O., ALMEIDA H.M., CARVALHO Y.K.P., ROCHA A.R., SILVA L.M.C. & CARVALHO M.A.M. 2016.** Isolation, Expansion, Differentiation and Growth Kinetics Essay in Mesenchymal Stem Cells Culture from the Bone Marrow of Collared Peccaries (*Tayassu tajacu*). *Acta Scientiae Veterinariae*. 44: 1341-1351.
- 4 ARJMAND M., ARDESHIRYLAJIMI A., MAGHSOUDI H. & AZADIAN E. 2018.** Osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells cultured on nanofibrous scaffold improved in the presence of pulsed electromagnetic field. *Journal of Cellular Physiology*. 233: 1061 – 1070.

- 5 AVELAR-FREITAS B.A., ALMEIDA V.G., PINTO M.C.X., MOURÃO F.A.G., MASSENSINI A.R., MARTINS-FILHO O.A., VIEIRA E.R. & MELO, G.E.A.B. 2014.** Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res*, 47(4): 307-315 .
- 6 BAER, P.C.; GEIGER, H. 2012.** Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization and heterogeneity. *Stem Cells International*, 2012: 1-11.
- 7 BERTALOSSO, B.M. et al. 2013.** Mesenchymal stem cells – Emphasis in Adipose Tissue. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(4): 607-617.
- 8 BUTLER, C.R. et al. 2016.** Rapid expansion of human epithelial stem cells suitable for airway tissue engineering. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 194(2): 156-168.
- 9 CARVALHO Y.K.P., ARGOLO-NETO N.M., AMBRÓSIO C.E., OLIVEIRA L.J., ROCHA A.R., SILVA J.B., CARVALHO M.A.M. & ALVES F.R. 2015.** Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(6): 590-598.
- 10 CASTRO-MANRREZA, M. E.; MONTESINOS, J.J. 2015.** Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of immunology research*, 2015.
- 11 CHEN Y., LIU H., CHANG Y., CHENG Y.H., MERSMANN H.J., KUO W. & DING S. 2016.** Isolation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells from Porcine Subcutaneous Adipose Tissues. *Journal of Visualized Experiments*. 109: 1-10.
- 12 DOMINICI, M. et al. 2006.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8: 315-317.
- 13 ESTEVES C.L., SHELDRAKE T.A., MESQUITA S.P., PENSATES J.J., MENGHINI T., DAWSON L., PEULT B. & DONADEU F.X. 2017.** Isolation and Characterization of equine native MSC populations. *Stem Cells Research and Therapy*. 8(1): 80.

- 14 FATHI E. & FARAHZADI R. 2016.** Isolation, Culturing, Characterization and Aging of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells: A Brief Overview. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 59: e16150383.
- 15 GE Y., ZHANG Q., JIAO Z., LI H., BAI G. & WANG H. 2018.** Adipose-derived stem cells reduce liver oxidative stress and autophagy induced by ischemia-reperfusion and hepatectomy injury in swine. *Life sciences*, 214: 62-69.
- 16 GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J.; BUNNELL, B. A. 2007.** Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research*, 100(9): 1249-1260.
- 17 GRONTHOS S., FRANKLIN D.M., LEDDY H.A., ROBEY P.G. STORMS R.W. & GIMBLE J.M. 2001.** Surface protein characterization of human adipose tissue- derived stromal cells. *Journal of cellular physiology*, 189(1): 54-63.
- 18 HENDIJANI F. 2017.** Explant culture: Na Advantageous Method for Isolation of Mesenchymal Stem Cells From Human Tissues. *Cell Proliferation*. 50: 1-14.
- 19 HU, R. et al. 2014.** Fibroblast-like cells differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells for vocal fold wound healing. *PloS one*, 9(3): e92676.
- 20 KAEWKHAW R., SCUTT A.M. & HAYCOOK J.W. 2011.** Anatomical Site Influences the Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells for Schwann-Cell Phenotype and Function. *GLIA*. 59: 734-749.
- 21 KALRA, K.; TOMAR, P.C. 2014.** Stem Cells: Basics, Classification and Applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 7: 919-930.
- 22 MEIRELLES L.S., MALTA M.T., WAGATSUMA V.M.D., PALMA P.V.B., ARAÚJO A.G., MALMEGRIM K.C.R., OLIVEIRA F.M., PANEPUCCI R.A., SILVA JUNIOR W.A., HADDAD S.K. & COVAS D.T. 2015.** Cultured Human Adipose Tissue Pericytes and

Mesenchymal Stromal Cells Display a Very Siilar Gene Expression Profile. *Stem Cells and Develompment*. 24: 2822-2840.

23 PARK E.J., KOO O.J. & LEE B.C. 2015. Overexpressed human heme Oxygenase-1 decreases adipogenesis in pigs and porcine adipose-derived stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 467(4): 935-940.

24 PRIYA N., SARCAR S., MAJUMDAR A.S. & SUNDARRAJ S. 2012. Explant culture: a simple, reproducibel, eficiente and economic technique for isolation of mesenchyal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 8: 706-716.

25 RISS T.L., MORAVEC R.A., NILES A.L., DUELMANN S., BENINK H.A., WORZELLA T.J. & MINOR L. 2004. Cell viability assays. *Assay guidance manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. 1-23.

26 SANTOS A., SILVA C.G., BARRETTO L.S.S, FRANCIOZI C.E.S., TAMAOKI M.J.S., ALMEIDA F.G. & FALOPPA F. 2018. Biomechanical evaluation of tendon regeneration with adipose- derived stem cell. *Journal of Orthopaedic Research®*, 37: 1281-1286.

27 SEKI, A. et al. 2013. Adipose tissue- derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis- induced cirrhosis model. *Hepatology*, 58(30): 1133-1142.

28 SILVA L.M.C., ROCHA M.A.C., NUNES M.H.V., MEDEIROS B.L.N., LEITE Y.K.C., RODRIGUES H.W.S., RODRIGUES M.C., ROCHA-NETO H.J., CARVALHO M.A.M. & ARGOLO-NETO N.M. 2018. Xenogeneic Mesenchymal Stem Cells in the Formation of Hyaline Cartilage in Osteochondral Goat Failure. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46: 1555-1565.

29 TOBITA, M.; ORBAY, H.; MIZUNO, H. 2011. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discovery medicine*, 11(57): 160-170.

30 ZHOU Z.Q., CHEN Y., CHAI M., TAO R., LEI Y., JIA Y., SHU J., REN J., LI G., WEI W., HAN Y.D. & HAN Y. 2019. Adipose extracellular matrix promotes skin wound healing by inducing the differentiation of adipose derived stem cells into fibroblasts. *International journal of molecular medicine*, 43(2): 890-900.

31 ZUTTON M.S.S.R., CÂMARA D.A.D., DARIOLLI R., TAKIMURA C., WENCESLAU C. & KERKIS I. 2019. In Vitro Heterogeneity of Porcine Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Tissue and Cell*. 58: 51-60.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstra que as técnicas inócuas aplicadas para o isolamento, cultivo e ensaios de diferenciação celular revelam a presença de uma população de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de suínos, bem definida, com alta taxa de proliferação *in vitro*. Em relação à multipotencialidade das CTMA-su, as características de especialização são bastante evidentes na diferenciação em três linhagens celulares (adipogênica, osteogênica e condrogênica) quando induzidas em monocamada. A avaliação da imunofenotipagem demonstra que CTMA-su expressam os marcadores positivos característicos de CTM.

AS CTMA-su são de fácil obtenção e os resultados alcançados, no que diz respeito a caracterização, possibilitam sugerir o emprego deste tipo celular como opção, para futuros estudos pré-clínicos em terapia celular.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene therapy**, v. 15, p. 109, 2008.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.

ALVES, E.G.L. *et al.* Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e da medula óssea de cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, p. 1-14, 2017.

ANZALONE, R. *et al.* New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. **Stem cells and development**, v. 19, n. 4, p. 423-438, 2010.

ARGOLO NETO, N.M., *et al.* Role of the autologous mesenchymal stem cells compared with platelet rich plasma on cicatrization of cutaneous wounds in diabetic mice. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 617-624, 2016.

BAER, P.C.; GEIGER, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization and heterogeneity. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

BERTALOSSI, B.M. *et al.* Mesenchymal stem cells – Emphasis in Adipose Tissue. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 607-617, 2013.

BEZERRA, M.É.S. *et al.* Conditioned medium of ovine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves growth and reduces ROS generation of isolated secondary follicles after short-term in vitro culture. **Theriogenology**, v. 125, p. 56-63, 2019.

BISSELS, U.; ECKARDT, D.; BOSIO, A. Characterization and Classification of Stem Cells. **Regenerative Medicine**, v. 2, p. 155-176, 2013.

BURGOS-SILVA, M. *et al.* Adipose tissue-derived stem cells reduce acute and chronic kidney damage in mice. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142183, 2015.

BUTLER, C.R. *et al.* Rapid expansion of human epithelial stem cells suitable for airway tissue engineering. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 194, n. 2, p. 156-168, 2016.

CASTRO-MANRREZA, M. E.; MONTESINOS, J.J. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.

CENTURION, S. *et al.* Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. Suplemento 3, 2002.

- CHAMBERLAIN, G. *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v. 25, p. 2739-2749, 2007.
- CHEN, Y. *et al.* Isolation and differentiation of adipose-derived stem cells from porcine subcutaneous adipose tissues. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 109, 2016.
- CORCIONE, A. *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 367-372, 2006.
- DARIOLLI, R. **Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de porcos criopreservadas e sua responsividade ao Shear stress**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- DE UGARTE, D. A. *et al.* Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells tissues organs**, v. 174, n. 3, p. 101-109, 2003.
- DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.
- GE, Y. *et al.* Adipose-derived stem cells reduce liver oxidative stress and autophagy induced by ischemia-reperfusion and hepatectomy injury in swine. **Life sciences**, v. 214, p. 62-69, 2018.
- GHANNAM, S. *et al.* Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. **Stem cell research & therapy**, v. 1, n. 1, p. 2, 2010.
- GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J.; BUNNELL, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circulation research**, v. 100, n. 9, p. 1249-1260, 2007.
- 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, 2013.
- GRONTHOS, S. *et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue- derived stromal cells. **Journal of cellular physiology**, v. 189, n. 1, p. 54-63, 2001.
- HYSTAD, M.E. *et al.* Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 3662-3671, 2007.
- HU, R. *et al.* Fibroblast-like cells differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells for vocal fold wound healing. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92676, 2014.
- JIANG, X. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v. 105, n. 10, p. 4120-4126, 2005.

KALRA, K.; TOMAR, P.C. Stem Cells: Basics, Classification and Applications. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**. v. 7, p. 919-930, 2014.

MA, S. *et al.* Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell death and differentiation**, v. 21, n. 2, p. 216, 2014.

MANI, S.A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**. v. 133. p. 704-715. 2008.

MEIROW, D. *et al.* Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. **Hum. Reprod.** v.23. p.1007-1013. 2008.

RAMASAMY, R. *et al.* The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. **Cell Immunol.** v. 6. p. 251-261. 2008.

REN, M. *et al.* Allogeneic adipose-derived stem cells with low immunogenicity constructing tissue-engineered bone for repairing bone defects in pigs. **Cell transplantation**, v. 21, n. 12, p. 2711-2721, 2012.

ROCHA, M. A. C. *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cells and xenogenic platelet rich plasma, associated or not, in the repair of bone failures in rabbits with secondary osteoporosis. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 32. p. 767-780. 2017.

SANTOS, A. *et al.* Biomechanical evaluation of tendon regeneration with adipose- derived stem cell. **Journal of Orthopaedic Research®**, 2018.

SEKI, A. *et al.* Adipose tissue- derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis- induced cirrhosis model. **Hepatology**, v. 58, n. 3, p. 1133-1142, 2013.

SHEASHAA, H. *et al.* Protective effect of adipose-derived mesenchymal stem cells against acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in Sprague-Dawley rats. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 11, n. 5, p. 1573-1580, 2016.

SILVA, L.M.C. *et al.* Xenogeneic Mesenchymal Stem Cells in the Formation of Hyaline Cartilage in Osteochondral Goat Failure. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46. p. 1555-1565. 2018.

SUN, M. *et al.* Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. **Stem cell research & therapy**, v. 4, n. 4, p. 80, 2013.

SYLVESTER, K.G.; LONGAKER, M.T. Stem Cells Review and Update. **The Archives of Surgery**. v. 139, p. 93-99, 2004.

PARK, E. J.; KOO, O. J.; LEE, B. C. Overexpressed human heme Oxygenase-1 decreases adipogenesis in pigs and porcine adipose-derived stem cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 467, n. 4, p. 935-940, 2015.

TOBITA, M.; ORBAY, H.; MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. **Discovery medicine**, v. 11, n. 57, p. 160-170, 2011.

TOMASZEWSKI, C.E. *et al.* Adipose-derived stem cell-secreted factors promote early stage follicle development in a biomimetic matrix. **Biomaterials science**, v. 7, n. 2, p. 571-580, 2019.

TORSVIK, A. *et al.* Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track–letter. **Cancer research**, v. 70, n. 15, p. 6393-6396, 2010.

VILQUIN J.T.; ROSSET P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. **Regen Med** v.1. p.589–604. 2006.

WILSON, K.D.; WU, J. C. Induced pluripotent stem cells. **Jama**, v. 313. p. 1613-1614, 2015.

YAMADA, S. *et al.* Trophic effect of adipose tissue derived stem cells on porcine islet cells. **Journal of Surgical Research**. v. 187. p. 667-672, 2014.

YANG, Y. *et al.* MRI studies of cryoinjury infarction in pig hearts: ii. Effects of intrapericardial delivery of adipose- derived stem cells (ADSC) embedded in agarose gel. **NMR in Biomedicine**, v. 25, n. 2, p. 227-235, 2012.

ZHOU, Z. *et al.* Adipose extracellular matrix promotes skin wound healing by inducing the differentiation of adipose-derived stem cells into fibroblasts. **International journal of molecular medicine**, v. 43, n. 2, p. 890-900, 2019.