



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO LISADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS
CANINO COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO NO
CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO
ADIPOSO CANINO**

ANDERSON LUCAS ALIEVI

Foz do Iguaçu
2021

**AVALIAÇÃO DO LISADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS
CANINO COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO NO
CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO
ADIPOSO CANINO**

ANDERSON LUCAS ALIEVI

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado ao Instituto Latino-
Americano de Ciências da Vida e da
Natureza da Universidade Federal da
Integração Latino-Americana como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria
Ruiz

Foz do Iguaçu

2021

ANDERSON LUCAS ALIEVI

**AVALIAÇÃO DO LISADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS
CANINO COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO NO
CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO
ADIPOSO CANINO**

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado ao Instituto Latino-
Americano de Ciências da Vida e da
Natureza da Universidade Federal da
Integração Latino-Americana como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
UNILA

Profa. Dra. Carina Sperotto Librelotto
UNIOESTE

Profa. Dra. Leticia Priscilla Arantes
UNILA

Foz do Iguaçu, 07 de outubro de 2021.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Claudedir Alievi e Luciane Fagundes Alievi, pela dedicação em me proporcionar educação, pela confiança depositada em minhas escolhas e por todo apoio e encorajamento nos momentos em que assumi novos desafios. Obrigado pelos conselhos, pelos ensinamentos e pelos exemplos, os quais me auxiliaram em minha trajetória e possibilitaram o desenvolvimento desse trabalho. Ao meu irmão Alexandre Alievi pelo companheirismo, pela amizade e pelos conselhos que sempre ajudaram em minha vida.

Ao meu orientador Professor Dr. Jorge Luis Maria Ruiz por ter aceitado me orientar nesse trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos e conselhos, por todo o incentivo, inspiração e pela confiança depositada em minhas escolhas.

À minha companheira Michelli Ramires Teixeira, pela amizade, pelo carinho e pela lealdade nos momentos difíceis. Obrigado por ter proporcionado discussões científicas enriquecedoras e por todo auxílio na execução dos trabalhos. Meus sinceros agradecimentos por ter tornado minha vida mais feliz.

A todos os meus amigos e colegas do curso, principalmente ao Felipe Justiniano e Samuel Chagas pelo companheirismo, compreensão e amizade durante esses 5 anos compartilhando o mesmo apartamento.

Aos técnicos do DELABEN, em especial à Amanda Araújo e à Dra. Giseli Traesel que possibilitaram o suporte técnico necessário para a execução deste trabalho.

À Ma. Roberta Ruiz Tognareli e a Ma. Camila Neri Barra, responsáveis pela VetQualis por toda solicitude no fornecimento das amostras de tecido adiposo e plasma rico em plaquetas.

À professora Dra. Thatiana Corrêa de Melo pela amizade, inspiração, incentivo e pela ajuda durante o início da minha jornada acadêmica.

À Aline Batista, pelo auxílio nos protocolos de Biologia Molecular e por me ter recebido no Centro de Medicina Tropical.

Por fim, agradeço à Universidade Federal da Integração Latino-Americana, por ter me proporcionado um ensino público de qualidade e ter me possibilitado conhecer profissionais, colegas e amigos que agregaram imensamente em minha vida.

ALIEVI, Anderson Lucas. **AVALIAÇÃO DO LISADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS CANINO COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CANINO**. 53 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

RESUMO

As células-tronco adultas são notáveis pelo seu potencial no uso clínico em terapias celulares e na engenharia de tecidos humana e veterinária, incluindo em cães. Dentre as células-tronco adultas, as células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASCs) apresentam vantagens devido à facilidade de extração, expansão *in vitro* e a potencial terapêutico. Entretanto, a maioria dos protocolos de expansão das ASCs *in vitro* envolve a utilização de meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino (SFB). O SFB apresenta diversos problemas e sua substituição é desejável, principalmente no cultivo de células para terapias. Nesse contexto, o plasma rico em plaquetas (PRP) tem se mostrado como uma interessante alternativa, havendo, entretanto, poucos estudos, principalmente sobre cultivo de ASCs caninas (cASCs). No presente trabalho foi investigada a viabilidade da utilização do PRP canino como substituto do SFB na suplementação de meio de cultivo no processo de expansão e criopreservação de cASCs. Para isso, foram isoladas as cASCs de uma amostra de tecido adiposo canino e foram avaliados os efeitos e papéis do PRP (comparados à suplementação com SFB) sobre a: proliferação celular e tempo de dobramento celular, expressão de marcadores de membrana típicos de ASCs, expressão de marcadores moleculares relacionados à pluripotência, capacidade de diferenciação adipogênica, condrôgenica e osteogênica e, por fim, buscou-se avaliar o potencial da PRP como componente do meio de criopreservação, avaliando a viabilidade celular após descongelamento das cASCs. Em relação à proliferação celular e o tempo de dobramento, o PRP demonstrou sustentar um crescimento celular semelhante ao SFB, com um tempo de dobramento de 117 ± 24 horas e 103 ± 20 horas, respectivamente. A análise dos marcadores de membrana típicos de ASCs demonstrou que a expansão de cASCs com 10% de PRP não altera a presença de CD73, CD90 e CD105 em relação ao cultivo com 10% de SFB. A capacidade de diferenciação para as três linhagens se manteve igual entre os dois tratamentos. Além disso, o PRP se mostrou como um substituto viável ao SFB na composição de meio de criopreservação após 18 dias de congelamento, não demonstrando diferença estatística na viabilidade celular entre os dois tratamentos. Tais dados apontam que o PRP pode ser uma alternativa viável a utilização do SFB como suplementação no cultivo *in vitro* de ASCs caninas, demandando, todavia, investigações complementares.

Palavras-chave: Células-tronco; Plasma Rico em Plaquetas; Soro Fetal Bovino; Cultivo Celular.

ALIEVI, Anderson Lucas. **AVALIAÇÃO DO LISADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS CANINO COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CANINO**. 53 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

ABSTRACT

Adult stem cells are notable for their potential in clinical use in cell therapies and in human and veterinary tissue engineering, including in dogs. Among adult stem cells, adipose tissue-derived stem cells (ASC) have advantages due to their ease of extraction, *in vitro* expansion and therapeutic potential. However, most ASCs expansion protocols *in vitro* involve the use of culture medium supplemented with fetal bovine serum (FBS). FBS presents several problems and its replacement is desirable, especially in cell cultures for therapies. In this context, platelet-rich plasma (PRP) has been shown to be an interesting alternative, with, however, few studies, mainly on the cultivation of canine ASCs (cASCs). In the present work, the feasibility of using canine PRP as a substitute for FBS in the supplementation of culture medium in the expansion and cryopreservation process of cASCs was investigated. For this, cASCs were isolated from a sample of canine adipose tissue and the effects and roles of PRP (compared to FBS supplementation) were evaluated in relation to: cell proliferation and cell folding time, expression of membrane markers typical of ASCs, expression of molecular markers related to pluripotency, adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation capacity and, finally, we sought to evaluate the potential of PRP as a component of the cryopreservation medium, evaluating cell viability after thawing of cASCs. Regarding cell proliferation and folding time, PRP was shown to support cell growth similar to FBS, with a folding time of 117 ± 24 hours and 103 ± 20 hours, respectively. The analysis of typical membrane markers of ASCs showed that the expansion of cASCs with 10% PRP does not alter the presence of CD73, CD90 and CD105 in relation to the culture with 10% FBS. Differentiation capacity for the three strains remained the same between the two treatments. Furthermore, PRP proved to be a viable substitute for FBS in the composition of cryopreservation medium after 18 days of freezing, with no statistical difference in cell viability between the two treatments. These data indicate that PRP can be a viable alternative to the use of FBS as a supplement in the *in vitro* culture of canine ASCs, requiring, however, further investigations.

Key-words: Stem cells; Platelet Rich Plasma; Fetal Bovine Serum; Cell culture.

ALIEVI, Anderson Lucas. **AVALIAÇÃO DO LISADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS CANINO COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CANINO**. 53 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

RESÚMEN

Las células madre adultas son notables por su potencial en uso clínico en terapias celulares y en ingeniería de tejidos humanos y veterinarios, incluso en perros. Entre las células madre adultas, las células madre derivadas del tejido adiposo (ASC) tienen ventajas debido a su facilidad de extracción, expansión *in vitro* y potencial terapéutico. Sin embargo, la mayoría de los protocolos de expansión de ASC *in vitro* implican el uso de medio de cultivo suplementados con suero fetal bovino (SFB). El SFB presenta varios problemas y es deseable su sustitución, especialmente en cultivos celulares para terapias. En este contexto, el plasma rico en plaquetas (PRP) se ha mostrado como una alternativa interesante, sin embargo, con pocos estudios, principalmente sobre el cultivo de ASCs caninas (cASCs). En el presente trabajo se investigó la viabilidad de utilizar PRP canino como sustituto de SFB en la suplementación de medio de cultivo en el proceso de expansión y criopreservación de cASCs. Para eso, se aislaron cASCs de una muestra de tejido adiposo canino y se evaluaron los efectos del PRP (en comparación con la suplementación con SFB) sobre: proliferación celular y tiempo de doblamiento celular, expresión de marcadores de membrana típicos de ASC, expresión de marcadores moleculares relacionados con la pluripotencia, la capacidad de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica y, finalmente, se buscó evaluar el potencial del PRP como componente del medio de criopreservación, evaluando la viabilidad celular tras la descongelación de cASC. Con respecto a la proliferación celular y el tiempo de doblamiento, se demostró que el PRP apoya el crecimiento celular similar al SFB, con un tiempo de doblamiento de 117 ± 24 horas y 103 ± 20 horas, respectivamente. El análisis de los marcadores de membrana típicos de las ASCs mostró que la expansión de las cASCs con PRP al 10% no altera la presencia de CD73, CD90 y CD105 en relación con el cultivo con SFB al 10%. La capacidad de diferenciación de las tres linajes se mantuvo igual entre los dos tratamientos. Además, el PRP demostró ser un sustituto viable de SFB en la composición del medio de crioconservación después de 18 días de congelación, sin diferencia estadística en la viabilidad celular entre los dos tratamientos. Estos datos indican que el PRP puede ser una alternativa viable al uso de SFB como suplemento en el cultivo *in vitro* de ASCs caninos, lo que requiere, sin embargo, más investigaciones.

Palavras clave: Células madre; Plasma rico en plaquetas; Suero fetal bovino; Cultivo celular.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processos de obtenção do SFB e PRP	24
Figura 2 – Processo de isolamento de ASCs a partir do tecido adiposo canino	32
Figura 3 – Curva de crescimento celular	40
Figura 4 – Imunofenotipagem de marcadores de membrana de ASCs	42
Figura 5 – Coloração para confirmação do processo de diferenciação	44
Figura 6 – Análise da viabilidade celular pós-congelamento	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados no ensaio de imunofenotipagem	35
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ASCs - do inglês: *adipogenic Stem cell* ou *adipose-derived stromal cells*

cASCs – do inglês: *canine adipogenic Stem cell*

cMSCs - do inglês: *canine mesenchymal stem cells*

DMEM - do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

EGF - do inglês: *epidermal growth factor*

ESCs - do inglês: *embryonic stem cells*

HLA - do inglês: *human leukocyte antigen*

IFATS - *International Fat Applied Technology Society*

iPSC - do inglês: *induced pluripotent stem cells*

ISCT - *International Society for Cellular Therapy*

MHC II - do inglês: *major histocompatibility complex class II proteins*

MSCs - do inglês: *mesenchymal stem cells*

PATF - do inglês: *pluripotency-associated transcription factors*

PBS - do inglês: *Phosphate Buffered Saline*

PDGF - do inglês: *platelet derived growth factor*

pH - Potencial hidrogeniônico

PRP - Plasma rico em plaquetas

SFB - Soro fetal bovino

SVF - do inglês: *stromal vascular fractions*

TGF- β - do inglês: *transforming growth factor β*

Tween - Polioxietileno-20-sorbitan monolaureato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 CÉLULAS-TRONCO	15
2.2 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS NA TERAPIA CELULAR AVANÇADA .	16
2.2.1. Células-tronco derivadas do tecido adiposo	19
2.3 CULTURA DE CÉLULAS E A SUPLEMENTAÇÃO	21
3 JUSTIFICATIVA	26
4 OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GERAL	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1 CONDIÇÕES PADRÃO DE CULTIVO CELULAR	29
5.2 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	30
5.2.1. Aquisição do plasma rico em plaquetas (PRP).....	30
5.2.2. Ativação do plasma rico em plaquetas	30
5.2.3. Formulação do meio suplementado com plasma rico em plaquetas ativado 30	
5.3 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSO CANINO.....	31
5.3.1. Processamento da amostra de tecido adiposo para isolamento de células-tronco.	31
5.4 ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE SUPLEMENTAÇÃO UTILIZANDO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E SORO FETAL BOVINO.....	33
5.4.1. CURVA DE CRESCIMENTO E TEMPO DE DOBRAMENTO	33
5.4.2. EXPRESSÃO DE MARCADORES DE MEMBRANA DE CÉLULAS- TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSO	34
5.4.3. ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO.....	36
5.5 ANÁLISE DO PRP COMO COMPONENTE DE MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO.....	37
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1 CURVA DE CRESCIMENTO E TEMPO DE DOBRAMENTO.....	39
6.2 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE MEMBRANA DE ASCs.....	41
6.3 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO	43
6.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE DO PRP COMO SUBSTITUTO DO SFB NA COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO	45
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco adultas são tipos celulares presentes em quase todos os tecidos animais. Essas células são responsáveis pela regeneração dos tecidos aos que pertencem através da divisão celular assimétrica (SLACK; JONATHAN M. W., 2018). Além da sua capacidade de regeneração, as células-tronco estão relacionadas à regulação de seu microambiente através de atividade parácrina. Sendo assim, tanto a capacidade de regeneração, quanto a de regulação parácrina são características importantes que despertam o interesse do uso das células-tronco na terapia celular avançada humana e veterinária (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2009; LI; CLEVERS, 2010; QUESENBERRY; BECKER, 1998)

Entre os diferentes tipos de células-tronco adultas, as células-tronco mesenquimais (MSCs) têm se destacado como uma das ferramentas mais promissoras para terapias celulares, em vista de sua variedade de fontes de extração, atividade imunomoduladora e imunossupressora e pela ausência de entraves éticos relacionados a sua obtenção (LANZA *et al.*, 2014; MARKOSKI, 2016).

Entre as variadas fontes de obtenção de MSCs, o tecido adiposo tem despertado grande interesse, considerando: (i) abundância de MSCs nesse tecido; (ii) facilidade de isolamento; (iii) fácil crescimento destas células *in vitro*; e (iv) baixa invasividade no processo de obtenção do tecido adiposo (REQUICHA *et al.*, 2012; SCHWARZ *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2010)

O isolamento e obtenção de células-tronco derivadas do tecido adiposo canino, que também podem ser chamadas de células-tronco adipogênicas caninas (cASCs), é relativamente bem padronizada, podendo ser utilizada como ferramenta na terapia de variadas patologias em cães (MARKOSKI, 2016). Apesar disso, alguns problemas técnicos relacionados ao cultivo ainda devem ser superados, a fim de obter-se tratamentos mais seguros, eficazes e menos onerosos.

Um aspecto de grande relevância sobre o cultivo celular, tanto de células caninas quanto humanas, é a utilização de soro fetal bovino (SFB). Embora seja um suplemento estabelecido para a maioria das linhagens celulares, o SFB apresenta uma série de problemas referentes ao: (i) bem estar animal; (ii) à variabilidade do produto, que pode comprometer a confiabilidade e reprodutibilidade de ensaios *in vitro*; (iii) limitações para uso em células destinadas a terapias; e (iv) preocupações recentes com adulterações (GSTRAUNTHALER; LINDL; VAN DER VALK, 2014; VAN DER VALK *et al.*, 2018).

Sendo assim, emerge-se a necessidade da investigação de novas fontes de suplementação de meios de cultivos substitutas aos SFB, que sejam tão eficientes quanto e apresentam menos problemas. Neste sentido, estudos têm demonstrando grande eficiência na utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) no cultivo de MSCs humanas, entretanto, ainda há uma lacuna de estudos sobre a eficiência do PRP no cultivo de MSCs caninas (AMABLE *et al.*, 2013, 2014; LUBKOWSKA; DOLEGOWSKA; BANFI, 2012). Desse modo, o presente trabalho visou investigar a viabilidade da utilização de PRP na substituição da utilização de SFB em cultivo celular de células-tronco derivadas do tecido adiposo de cães.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÉLULAS-TRONCO

O termo “célula-tronco” passou por diversas ressignificações no decorrer dos anos. Embora remeta a algo recente, o termo “*stem cell*” (célula-tronco, em inglês) é muito antigo, tendo sido utilizado pela primeira vez em 1868, pelo pesquisador Ernst Haeckel, para se referir ao organismo ancestral unicelular do qual todos os outros organismos multicelulares tiveram origem (RAMALHO-SANTOS; WILLENBRING, 2007). A partir de então, diferentes significados foram dados para as células-tronco, chegando à definição contemporânea do termo, a qual ainda apresenta algumas controvérsias entre pesquisadores da área. De forma simplificada, a definição das células-tronco se utiliza para descrever aquelas células que apresentam uma série de características como divisão assimétrica, onde as células precisam apresentar capacidade de i) autorrenovação, onde novas células-tronco idênticas à sua progenitora são geradas e ii) diferenciação, onde células comprometidas a se diferenciarem em outros tipos celulares, diferentes de sua progenitora, são produzidas (LANZA *et al.*, 2014; SLACK; JONATHAN M. W., 2018).

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com sua origem e potência. A origem se refere ao local do qual as células-tronco foram extraídas, podendo ser de origem embrionária (células-tronco embrionárias) de origem em tecidos adultos (células-tronco adultas). Já a potência, também chamada de plasticidade, é uma forma de medir a gama de linhagens celulares em que uma determinada população de células-tronco é capaz de se diferenciar. Em relação às potências, as células-tronco podem ser classificadas como: totipotentes, pluripotentes e multipotentes (LANZA *et al.*, 2014; SLACK; JONATHAN M. W., 2018).

As células-tronco totipotentes são células capazes de formar um organismo como um todo e, no caso dos mamíferos, os tecidos extraembrionários (placenta). A totipotência é o mais alto grau de plasticidade de uma célula-tronco e as únicas células totipotentes são o próprio zigoto e os primeiros blastômeros, oriundos das primeiras divisões celulares após a fecundação (LANZA *et al.*, 2014; SLACK;

JONATHAN M. W., 2018).

Células-tronco pluripotentes são células que possuem a capacidade de dar origem a todos os tecidos de um organismo, mas, diferente das totipotentes, não dão origem aos tecidos extraembrionários (SLACK; JONATHAN M. W., 2018). Por definição, esse tipo de células-tronco era encontrado apenas na massa interna do blastocisto de embriões (origem embrionária). Entretanto, uma tecnologia recente chamada células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC; do inglês: *induced pluripotent stem cells*) conseguiu, através da inserção de 4 genes de pluripotência, fazer com que células adultas já diferenciadas adquirissem características de células-tronco pluripotentes (TAKAHASHI *et al.*, 2007).

Já as células-tronco multipotentes são células que, diferentes das duas anteriores, podem dar origem a apenas alguns tipos específicos de células em condições normais. São classificadas como multipotentes a maioria das células-tronco adultas presentes nos organismos (LANZA *et al.*, 2014).

2.2 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS NA TERAPIA CELULAR AVANÇADA

As células-tronco têm se apresentado como ferramentas promissoras para aplicações terapêuticas envolvendo, principalmente, a regeneração de órgãos e tecidos injuriados aplicadas nas áreas de engenharia de tecidos e medicina regenerativa (BERTHIAUME; MAGUIRE; YARMUSH, 2011; EHNERT *et al.*, 2009). Devido às questões éticas, legais e práticas envolvendo as células-tronco embrionárias, as células-tronco adultas são as candidatas mais promissoras e utilizadas para diversos fins terapêuticos (EHNERT *et al.*, 2009).

As células-tronco adultas são células indiferenciadas, predominantemente em estado quiescente, presentes em quase todos os tecidos animais. Essas células-tronco são responsáveis pela renovação celular nos tecidos através da diferenciação em células com funções específicas. Desse modo, as células-tronco adultas podem ser extraídas de diversas fontes e tecidos (p.ex.: medula óssea, sangue, polpa de dente, tecido adiposo, entre outros) e podem ser utilizadas na diferenciação de uma gama extensa de tipos celulares (LI; CLEVERS, 2010; MARKOSKI, 2016).

A maior parte das células-tronco adultas são classificadas como multipotentes (LANZA *et al.*, 2014). Essas células são reguladas pelo microambiente ao qual pertencem, sendo induzidas a manterem seu estado quiescente, estimuladas a se diferenciar e/ou realizarem o chamado *homing* celular. O *homing* celular é caracterizado pela migração das células-tronco para os locais onde são necessárias, sendo reguladas por uma série de estímulos provindas através de diversos fatores celulares. Durante o *homing* celular, as células podem ser atraídas para tecidos lesionados, promovendo sua regeneração através da diferenciação nos tipos celulares lesados, substituindo-os, ou por meio da regulação do perfil inflamatório no local da lesão, através da secreção de fatores parácrinos imunomodulatórios (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2009; LI; CLEVERS, 2010; QUESENBERRY; BECKER, 1998).

Dentre as células-tronco adultas, as chamadas células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês: *mesenchymal stem cells*) representam uma das fontes terapêuticas mais exploradas, podendo ser encontradas e isoladas de diversos tecidos adultos (p.ex.: tecido adiposo, medula óssea, fígado, cérebro e músculo). Embora sua origem durante a ontogênese ainda não seja totalmente esclarecida, as MSCs são classicamente classificadas como células multipotentes, capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteócitos e miócitos (derivados do mesoderma), mas não em linhagens hematológicas (também provenientes do mesoderma) (LANZA *et al.*, 2014; MARKOSKI, 2016).

As primeiras MSCs isoladas e cultivadas *in vitro* foram descritas por Friedenstein e colaboradores, em 1970, como células mononucleares, aderentes, que formavam colônias e tinham aparência fibroblastóide (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKIN, 1970). A partir de então, baseado em estudos remanescentes, foram definidos alguns critérios para a identificação de MSCs, sendo eles: apresentar capacidade de aderência das células e formação de colônias fibroblastóides, análise do perfil de marcadores de superfície celular e a avaliação do potencial de diferenciação, mediante estímulos *in vitro*, em, pelo menos, osteócitos, condrócitos e adipócitos (DOMINICI *et al.*, 2006).

Além da variedade de tecidos em que estão presentes, as MSCs podem ser obtidas em quantidade relativamente altas e, no caso de alguns tecidos, apresentam uma considerável facilidade de obtenção dos tecidos e isolamento das MSCs (CHU *et al.*, 2019; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2009). Além disso, outra vantagem das MSCs é que, embora não seja equivalente ao das células-tronco embrionárias (ESCs, do inglês: *embryonic stem cells*), seu vigor de crescimento *in vitro* é considerado alto, apresentando capacidade de manutenção de seu caráter indiferenciado sob condições adequadas, permitindo sua expansão para aplicações terapêuticas (REQUICHA *et al.*, 2012).

O uso das MSCs para fins terapêuticos tem sido relatado tanto para medicina humana quanto para a medicina veterinária no tratamento de diversas patologias (MARKOSKI, 2016; RIZVANOV *et al.*, 2016). Os principais efeitos terapêuticos relacionados às MSCs estão associados aos seus potenciais de: regeneração (através do processo de diferenciação), imunomodulação, potencial anti-apoptótico e potencial angiogênico, sendo os três últimos provenientes da liberação de fatores parácrinos no meio em que as MSCs se encontram (DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2009; MARKOSKI, 2016). Além disso, a capacidade de *homing* das células-tronco possibilitam a aplicação sistêmica das MSCs no tratamento de algumas patologias, o que permite um melhor direcionamento ao local injuriado (DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2009; ENCISO *et al.*, 2018; MARKOSKI, 2016).

Para além do potencial de diferenciação em diversas linhagens e seus efeitos parácrinos, as MSCs são consideradas interessantes ferramentas terapêuticas devido às suas vantagens imunológicas e imunogênicas. Por não possuírem expressão de vários antígenos na superfície celular, as MSCs não são facilmente reconhecidas pelos linfócitos (tanto T quanto B), permitindo a utilização de MSCs de forma alógena (KISIEL *et al.*, 2012; LANZA *et al.*, 2014).

Em relação à administração alógena das MSCs, uma série de hipóteses busca esclarecer os mecanismos pelos quais as células conseguem driblar a rejeição de receptores, inclusive entre espécies. Uma das maiores evidências observadas é a baixa expressão de Complexo Principal de Histocompatibilidade do

tipo II (MHC II, do inglês: *major histocompatibility complex class II proteins*), embora a imunomodulação proporcionada pelas MSCs também deva ser considerada. A imunomodulação é capaz de interferir na maturação e função das células dendríticas, diminuir a proliferação de células T e interagir com células *natural killer* através da liberação de fatores solúveis. O potencial imunomodulatório, além de evitar a rejeição das MSCs, também é apontado como um dos mecanismos de ação responsável pelos efeitos terapêuticos destas células (LANZA *et al.*, 2014; MA; CHAN, 2016; WEISS; DAHLKE, 2019).

Desse modo, com base nas diversas potencialidades das MSCs, suas aplicações terapêuticas têm aumentado exponencialmente nos últimos anos, principalmente na medicina veterinária. Entretanto, a terapia regenerativa e a terapia celular enfrentam ainda uma série de problemas técnicos, estando entre eles a disponibilidade de células-tronco. Neste sentido, estudos têm apontado diversas fontes alternativas na obtenção de MSCs, estando entre as mais promissoras o tecido adiposo.

2.2.1. Células-tronco derivadas do tecido adiposo

Entre todos os locais de obtenção de MSCs, o tecido adiposo tem se destacado como uma importante fonte devido à: (i) abundância de MSCs nesse tecido; (ii) facilidade de isolamento; (iii) fácil crescimento destas células *in vitro* e (iv) baixa invasividade no processo de obtenção do tecido adiposo (REQUICHA *et al.*, 2012; SCHWARZ *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2010).

Por muito tempo os conhecimentos gerados sobre as MSCs e as terapias celulares foram baseados em células obtidas a partir da medula óssea. Apesar disso, hoje reconhece-se o grande potencial das células-tronco derivadas do tecido adiposo (DE BAKKER *et al.*, 2013). Estas MSCs são originadas na fração do estroma vascular (SVF, do inglês: *stromal vascular fractions*) do tecido adiposo (CHU *et al.*, 2019) e podem ser definidas na literatura como células estromais derivadas do tecido adiposo (ASCs, do inglês: *adipose-derived stromal cells*) (BOURIN *et al.*, 2013) ou células-tronco adipogênicas (ASCs, do inglês: *adipogenic stem cells*) (CHU *et al.*, 2019; LANZA *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2010).

Apesar das pequenas distinções de nomenclatura, as ASCs precisam atender aos critérios definidos pela Sociedade Internacional de Gordura Aplicada à Tecnologia (IFATS, do inglês: *International Fat Applied Technology Society*), estando entre eles: capacidade de formar colônias aderentes; apresentar positividade dos marcadores de membrana CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e baixa expressão de CD31, CD45 e CD235a; apresentar marcação distinta das MSCs derivadas da medula óssea, apresentando positividade do marcador CD36 e negatividade de CD106 e possuir capacidade de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica (BOURIN *et al.*, 2013). Além disso, as ASCs podem dar origem a linhagens de neurônios, hepatócitos, miócitos e cardiomiócitos, quando em condições adequadas (CHU *et al.*, 2019; DE BAKKER *et al.*, 2013)

Os critérios definidos pelo IFATs, embora inicialmente desenvolvidos para a caracterização de ASCs humanas, são amplamente utilizados na caracterização de células-tronco caninas, considerando a indisponibilidade de trabalhos definindo os critérios das ASCs de cães (DE BAKKER *et al.*, 2013)

Além dos critérios da IFATs, a expressão dos fatores de transcrição associados à pluripotência (PATF, do inglês: *pluripotency-associated transcription factors*) são frequentemente investigadas em células-tronco, embora não sejam um critério necessário para a caracterização de MSCs e ASCs (BOURIN *et al.*, 2013; DOMINICI *et al.*, 2006). Existem uma série de PATFs relacionados com as células-tronco, estando entre os principais investigados os fatores SOX2, OCT3/4 e NANOG, três genes chaves vinculados a pluripotência nas ESC e que também são encontrados nas células-tronco adultas, incluindo as ASCs caninas (ENCISO *et al.*, 2018; KISIEL *et al.*, 2012; NEUPANE *et al.*, 2008; TAKEMITSU *et al.*, 2012).

Dentro do cenário das ASCs caninas (cASCs), Neupane e sua equipe (2008) foram os primeiros pesquisadores a conseguirem isolar, caracterizar molecularmente e verificar o potencial de diferenciação das cASCs. Apesar disso, a equipe não realizou a imunofenotipagem dos marcadores de membrana específicos das ASCs (NEUPANE *et al.*, 2008). Mais adiante, em 2010, Vieira e colaboradores, conseguiram isolar cASCs, realizar sua imunofenotipagem e observar o processo de

diferenciação adipogênica, condrogênica, miogênica e osteogênica, utilizando-se de fatores específicos de indução (VIEIRA *et al.*, 2010).

Embora avanços sobre as cASCs e seu potencial no tratamento de diferentes patologias em cães sejam notáveis, ainda se observam diversos gargalos técnicos que dificultam a aplicação destas células na terapia celular canina. Entre as principais problemáticas na produção de ASCs para fins terapêuticos, estão questões envolvendo a padronização do cultivo celular e o elevado custo de produção, fatores que refletem diretamente na segurança, eficiência e viabilidade dos tratamentos.

2.3 CULTURA DE CÉLULAS E A SUPLEMENTAÇÃO

A cultura de células é uma poderosa ferramenta utilizada tanto na pesquisa quanto como plataforma para a produção de diversos produtos biotecnológicos. Entre as diferentes áreas impactadas, os produtos provenientes da cultura de células tornam possível a medicina regenerativa e a terapia celular utilizando células-tronco (ARORA, 2013; HELGASON; MILLER, 2013).

A cultura de células começou a ser desenvolvida no início do século 20, passando por drásticas mudanças e melhorias desde então (HELGASON; MILLER, 2013). Uma dessas mudanças foi a introdução do soro fetal bovino (SFB) na década de 50 por Puck e colaboradores (1958) como um suplemento do meio basal de cultivo (PUCK, THEODORE T.; CIECIURA, STEVEN J.; ROBINSON, 1958). Desde então, o SFB passou a ser adotado como uma suplementação praticamente universal para o cultivo da maioria das células animais, sendo amplamente difundido no cultivo de células tanto para fins científicos, clínicos ou industriais, devido, principalmente, a sua capacidade de aumentar a proliferação celular (GSTRAUNTHALER; LINDL; VAN DER VALK, 2014; PUCK, THEODORE T.; CIECIURA, STEVEN J.; ROBINSON, 1958).

Entretanto, há décadas a utilização de SFB desperta preocupações relativas a: (i) bem estar animal; (ii) variabilidade do produto que pode comprometer a confiabilidade e reprodutibilidade de ensaios *in vitro*; (iii) limitações para uso em

células destinadas a terapias e (iv) preocupações recentes com adulterações (GSTRAUNTHALER; LINDL; VAN DER VALK, 2014; VAN DER VALK *et al.*, 2018)

Do ponto de vista do bem estar animal, o SFB é tido como um insumo biotecnológico problemático, pois é um produto do soro sanguíneo de fetos bovinos com 3 a 9,4 meses de desenvolvimento. A obtenção do sangue geralmente é realizada por punção cardíaca em fetos retirados de vacas prenhas, acidentalmente abatidas. A punção cardíaca é realizada com o feto ainda vivo, o que resulta em um processo doloroso, o qual levanta enormes debates relativos ao bem estar animal. Estimativas de 2012 dão conta que mais de 800.000 L de SFB são produzidos globalmente a cada ano, utilizando cerca de 2 milhões de fetos bovinos (BRINDLEY *et al.*, 2012; JOCHEMS *et al.*, 2002; VAN DER VALK *et al.*, 2018).

No âmbito científico, a utilização do SFB representa um problema relativo à confiabilidade e reprodutibilidade dos dados de cultivo celular utilizando o SFB. Isso ocorre principalmente porque o SFB é um composto complexo, contendo cerca de 1800 diferentes tipos de proteínas e mais de 4000 metabólitos distintos, incluindo hormônios, proteínas, vitaminas e fatores de crescimento, os quais são responsáveis por estimular a manutenção e proliferação celular (SUBBIAHANADAR CHELLADURAI *et al.*, 2021). Entretanto, a concentração destes componentes, assim como perfis de fatores de crescimento distintos podem variar de lote para lote do SFB. Isso pode ocorrer devido a: (i) variações biológicas individuais dos doadores (raça ou condições de saúde); (ii) diferentes estádios de desenvolvimento dos doadores (que geralmente tem 3 a 9,4 meses); (iii) localização geográfica e estação do ano e (iv) alimentação do animal prenha (BRINDLEY *et al.*, 2012; GSTRAUNTHALER; LINDL; VAN DER VALK, 2014; JOCHEMS *et al.*, 2002). Tais alterações podem influenciar no cultivo celular, comprometendo a confiabilidade e a reprodutibilidade dos experimentos. Além disso, um desequilíbrio na concentração de determinados componentes pode levar a seleção de populações de células que respondem melhor a esse perfil de nutrientes, originando linhagens celulares significativamente diferentes das originais (VAN DER VALK *et al.*, 2018).

A utilização do SFB no processo de expansão *in vitro* das MSCs para

aplicações terapêuticas também é um problema. O principal problema é que a administração de MSCs, cultivadas na presença de SFB, podem desencadear respostas imunológicas quando aplicadas em pacientes. Isso pode ocorrer devido a presença de antígenos bovinos no SFB, o que contamina com esses antígenos as amostras de MSCs utilizadas para as terapias (KOCAOEMER *et al.*, 2007; OIKONOMOPOULOS *et al.*, 2015). Além disso, o SFB pode ser fonte de contaminação por diversos microrganismos, incluindo *mycoplasma*, leveduras e bactérias ou por outros contaminantes, como endotoxinas, vírus e *prions* (GSTRAUNTHALER; LINDL; VAN DER VALK, 2014; JOCHEMS *et al.*, 2002; KOCAOEMER *et al.*, 2007).

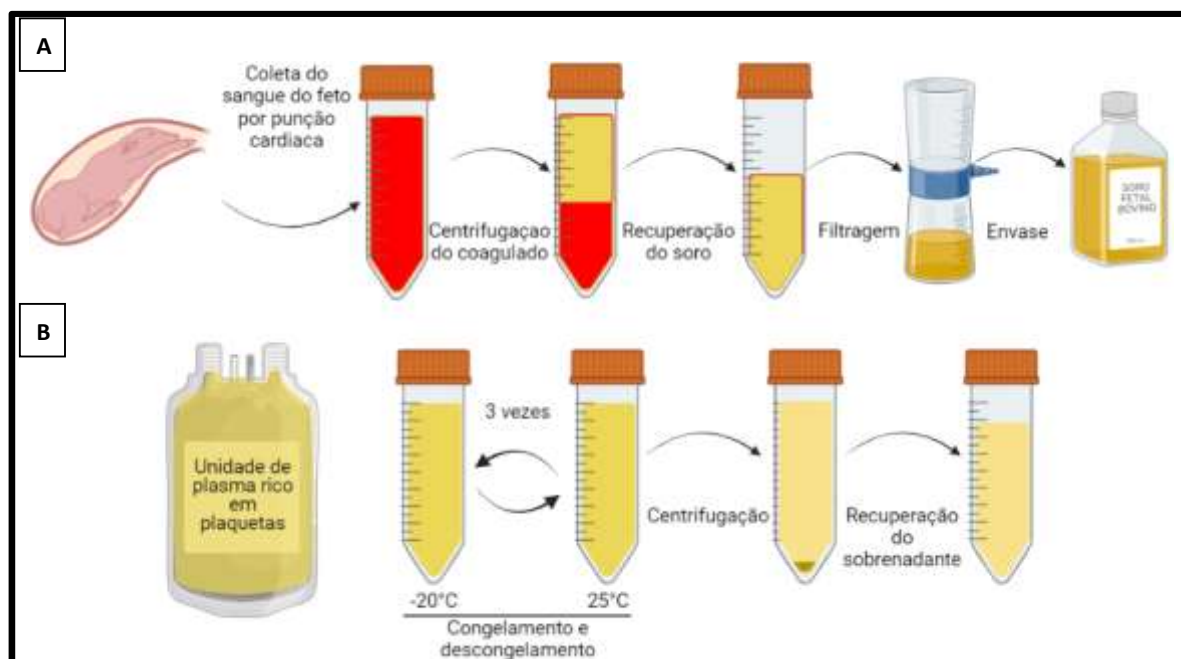
A falta de regulamentações sobre a produção e controle de qualidade do SFB, juntamente ao fato de ser um produto de alto valor e com uma demanda mundial crescente, fazem do SFB um potencial alvo para fraudes e adulterações (VAN DER VALK *et al.*, 2018). De fato, alterações como essas já ocorreram anteriormente, demonstrando a fragilidade do SFB como insumo biotecnológico. As adulterações, além de impactar experimentos científicos que utilizam cultura de células, também podem afetar a qualidade e eficiência de centenas de produtos/serviços biotecnológicos baseados em cultura de células, causando prejuízos para empresas e oferecendo riscos para a sociedade (GSTRAUNTHALER; LINDL; VAN DER VALK, 2014).

Devido a essa série de problemas envolvendo o SFB, diversas abordagens estão sendo desenvolvidas como alternativa ao uso desse insumo. Os meios livres de componentes derivados de animais (meios *xenofree*) e os meios de cultivo quimicamente definidos são algumas das alternativas mais promissoras (BAUMAN; GRANJA; BARRIAS, 2018; VAN DER VALK *et al.*, 2018). Entretanto, apesar de ser uma área que evoluiu bastante nos últimos anos, estes meios alternativos se mostram bastante onerosos, além de ainda não existir um meio quimicamente definido ou *xenofree* capaz de sustentar o crescimento da maioria das células, diferente dos meios suplementados com SFB. Sendo assim, para utilizar essa tecnologia, ainda é necessário desenvolvimento de meios *xenofree* ou quimicamente

definidos bastante específicos, onde cada produto abarca apenas pequenos grupos de linhagens celulares (VAN DER VALK *et al.*, 2018).

Outra alternativa para o uso do SFB são outros produtos de origem animal, com menores problemas éticos, como soros e plasmas (p.ex: equino, bovino, bovino recém-nascido, suíno, etc.). Dentre estes, o plasma rico em plaquetas (PRP) tem se mostrado como uma alternativa viável para o cultivo *in vitro* de MSCs humanas em diversos trabalhos, apresentando facilidade de obtenção e processamento (**Figura 1b**), além de ter apresentado em alguns estudos estímulos proliferativos superiores, mantendo as características de MSCs preconizados pelo *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) (ABAZARI *et al.*, 2020; LYKOV *et al.*, 2017; VOGEL *et al.*, 2006).

Figura 1 – Processos de obtenção do SFB e PRP



Obtenção de Soro Fetal Bovino (SFB) e Plasma Rico e Plaquetas (PRP). A: Durante o processo de produção do SFB, o sangue bovino é coletado dos fetos vivos com idades entre 3 a 9,4 meses por meio de punção cardíaca. Em seguida, o sangue coagulado naturalmente dos fetos é centrifugado e o soro, presente no sobrenadante, é recuperado. Na sequência, o SFB é filtrado utilizando filtro de 0,22 μm , homogeneizado com o soro de outros fetos e envasado (JOCHEMS *et al.*, 2002). B: o plasma rico em plaquetas é obtido através de sangue retirado por meio de punção venosa, sendo o material levado a seguidos processo de centrifugação dos quais é possível obter o PRP. Após obtida a unidade de plasma rico em plaquetas, é realizado o processo de ativação do PRP, onde são realizados o processo de congelamento e descongelamento 3 vezes, centrifugação do conteúdo e recuperação do sobrenadante, contendo o PRP pronto para uso no cultivo celular (AMABLE *et al.*, 2013). **Fonte:** Do autor

Um dos motivos que torna o PRP uma alternativa viável para cultura de MSCs, é que o mesmo contém vários fatores de crescimento e componentes importantes para a cultura celular, dentre os quais o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês: *platelet derived growth factor*), fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês: *epidermal growth factor*) e o fator de crescimento transformador β (TGF- β , do inglês: *transforming growth factor β*) se destacam devido a sua relação com os estímulos proliferativos e de manutenção celular das MSCs (AMABLE *et al.*, 2013, 2014; LUBKOWSKA; DOLEGOWSKA; BANFI, 2012).

Além disso, a utilização do PRP como suplementação pode representar uma diminuição de custo de produção dos produtos biotecnológicos baseados em culturas de células. Isso porque o PRP produzido industrialmente para uso clínico possui uma validade muito curta e não pode ser congelado, sendo mantido sob refrigeração a 4-7°C por, no máximo, 5 dias. Após esse período, o PRP não pode mais ser utilizado para fins clínicos, sendo um produto de descarte que pode ser aproveitado no cultivo celular e adquirido por custo menor do que o SFB (VAN DER VALK *et al.*, 2018).

3 JUSTIFICATIVA

As células-tronco mesenquimais (MSCs), incluindo as derivadas do tecido adiposo (ASCs), têm sido largamente estudadas para aplicações terapêuticas em diversas patologias, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (MARKOSKI, 2016; RIZVANOV *et al.*, 2016). Para sua utilização, as células-tronco adultas são isoladas dos tecidos e expandidas *in vitro* até que seja obtido quantidades suficientes de células para a aplicação desejada. O processo de expansão utiliza a técnica de cultura de células. Entretanto, uma das limitações e preocupações desse processo é a utilização de soro fetal bovino (SFB) como suplementação para o meio de cultivo, que auxilia no processo de manutenção e proliferação celular (DE BAKKER *et al.*, 2013; VAN DER VALK *et al.*, 2010).

A utilização de SFB desperta preocupações relativas a: (i) bem estar animal, pois ele é produzido a partir do sangue de fetos bovinos retiradas de vacas prenhas acidentalmente abatidas, através de punção cardíaca do feto ainda vivo; (ii) por ser um produto biológico, estando sujeito a variações entre lotes do produto, o que pode comprometer a confiabilidade e reprodutibilidade de ensaios *in vitro*, além de alterações na eficiência de produtos biotecnológicos baseados em cultura de células; (iii) limitações para uso em células destinadas a terapias devido a contaminação das células com antígenos bovinos, podendo desencadear respostas imunológicas indesejadas, além de poder ser fonte de contaminações por vírus, bactérias, fungos, *mycoplasma*, endotoxinas e *prions*; e (iv) preocupações recentes com adulterações, já que este é um produto com demanda crescente e de alto custo (GSTRAUNTHALER; LINDL; VAN DER VALK, 2014; JOCHEMS *et al.*, 2002; VAN DER VALK *et al.*, 2018).

Devido a esses problemas relacionados à utilização de SFB como suplementação de meios de cultivo, meios de cultivo alternativos (sem a utilização de SFB) estão sendo extensamente desenvolvidos, principalmente para o cultivo de células-tronco para fins terapêuticos (VAN DER VALK *et al.*, 2018). Dentre as alternativas, o plasma rico em plaquetas (PRP) tem se mostrado como uma opção promissora, alcançando um bom desempenho no processo de expansão de células-

tronco (ASTORI *et al.*, 2016; LYKOV *et al.*, 2017). Entretanto, a quantidade de estudos ainda é pequena e não comparável, já que a qualidade do PRP é bastante vaga e os métodos de preparação bastante variáveis (AMABLE *et al.*, 2014). Portanto, há uma carência de estudos envolvendo a exploração do PRP como alternativa ao SFB para cultivo e expansão de células-tronco na área da medicina humana e, principalmente, veterinária.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a viabilidade da utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) na substituição da utilização de soro fetal bovino (SFB) em cultivo celular de células-tronco derivadas do tecido adiposo de cães (cASCs).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar células-tronco de uma amostra de tecido adiposo canino;
- Verificar se a suplementação com PRP afeta a taxa de crescimento celular das cASCs em comparação à suplementação tradicional (com SFB) e ao meio de cultivo sem suplementação;
- Analisar se o cultivo utilizando suplementação com PRP afeta a expressão de imunomarcadores típicos de cASCs em comparação com a suplementação com SFB;
- Investigar se o cultivo utilizando suplementação com PRP influencia na capacidade de diferenciação das cASCs;
- Analisar a eficiência do PRP como componente de meio de criopreservação.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONDIÇÕES PADRÃO DE CULTIVO CELULAR

Todas as etapas relativas ao cultivo celular e processamento da amostra de tecido adiposo canino foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde (Lab G004) da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) - Campus Jardim Universitário.

O cultivo celular foi realizado em incubadoras de cultivo celular modelo HF 212UV (Heal Force, China), utilizando os parâmetros de temperatura de 37°C, atmosfera com umidade relativa de 80% e 5% de CO₂.

Para estabelecimento da cultura e expansão das ASCs foram utilizados frascos de poliestireno próprios para cultivo de células com tratamento para adesão celular de 25 e 75 cm² de superfície de cultivo (BIOFIL, China). Para a realização dos ensaios de imunofluorescência, diferenciação e tempo de dobramento, foram utilizadas placas de cultivo de 6, 12 e 24 poços (BIOFIL, China), respectivamente.

O meio de cultivo utilizado no presente trabalho foi o meio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês: *Dulbecco's modified Eagle's medium*) na variação baixa glicose (*low glucose*), por ser o mais amplamente utilizado para cultivo de MSCs caninas.

Os meios de cultivo liofilizados DMEM (Gibco®, EUA) foram preparados conforme orientação do fabricante e esterilizado através de filtração utilizando um filtro a vácuo com capacidade para 500 mL, equipado com filtro de acetato de celulose, com porosidade de 0,22 µm (BIOFIL, China). O meio que iria receber a suplementação de PRP foi reservado em um frasco de vidro estéril e o meio que recebeu a suplementação convencional foi suplementado normalmente, também sob condições estéreis. Para a suplementação convencional, foram adicionados 100 mL de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil) em um frasco de vidro estéril, 10 mL da solução de antibiótico penicilina-estreptomicina (Vitrocell, Brasil) (correspondente a concentração final de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) e o volume ajustado para 1 L utilizando o meio de cultivo previamente preparado. Durante esse

trabalho, esse meio é chamado de meio completo convencional.

5.2 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

5.2.1. Aquisição do plasma rico em plaquetas (PRP)

O PRP canino utilizado foi adquirido do Laboratório de Análises Clínicas e Banco de Sangue Canino VetQualis, localizada na cidade de Foz do Iguaçu. Uma bolsa contendo cerca de 80 mL do material foi transportada em caixas térmicas contendo gelo e acondicionada em geladeira a 4 °C até o momento do processamento.

5.2.2. Ativação do plasma rico em plaquetas

A ativação do plasma rico em plaquetas foi realizada conforme o método descrito por Amable e colaboradores (2013). Para isso, as bolsas contendo o PRP foram congeladas a -20°C por 2h e descongeladas a temperatura ambiente por 30 minutos, repetindo esse ciclo por três vezes. Em seguida, o conteúdo das bolsas foi transferido para dois tubos de polipropileno de 50 mL e centrifugados a 3200 xg por 10 minutos. A parte líquida foi transferida para tubos de polipropileno de 15 mL em alíquotas de 10 mL e toda a parte sólida foi descartada. As alíquotas foram mantidas congeladas a -20°C até o momento da utilização.

5.2.3. Formulação do meio suplementado com plasma rico em plaquetas ativado

A formulação do meio de cultivo suplementado com PRP foi realizada com o objetivo de obter um meio de cultivo com concentração final de 10% de PRP. Para isso, inicialmente as alíquotas de PRP foram descongeladas à temperatura ambiente. Na sequência, em um tubo de polipropileno de 50 mL foram adicionados 5 mL do PRP junto a 0,5 mL da solução de antibiótico (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina de concentração final) (Vitrocell, Brasil), e o volume necessário de meio de cultivo DMEM *low glucose* (Gibco®, EUA) para completar 50 mL de meio de cultivo completo. Os tubos foram armazenados a 4 °C *overnight*. No dia seguinte, os tubos foram agitados em um agitador do tipo *vortex* por 1 minuto e centrifugados a 3200 xg por 10 minutos. Essa etapa fez-se necessária para a

remoção de qualquer tipo de aglutinação causada pelo PRP. A parte líquida foi removida para um tubo de polipropileno de 50 mL novo e toda parte sólida descartada. Os meios foram armazenados a 4°C até o momento da utilização.

5.3 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CANINO

5.3.1. Processamento da amostra de tecido adiposo para isolamento de células-tronco.

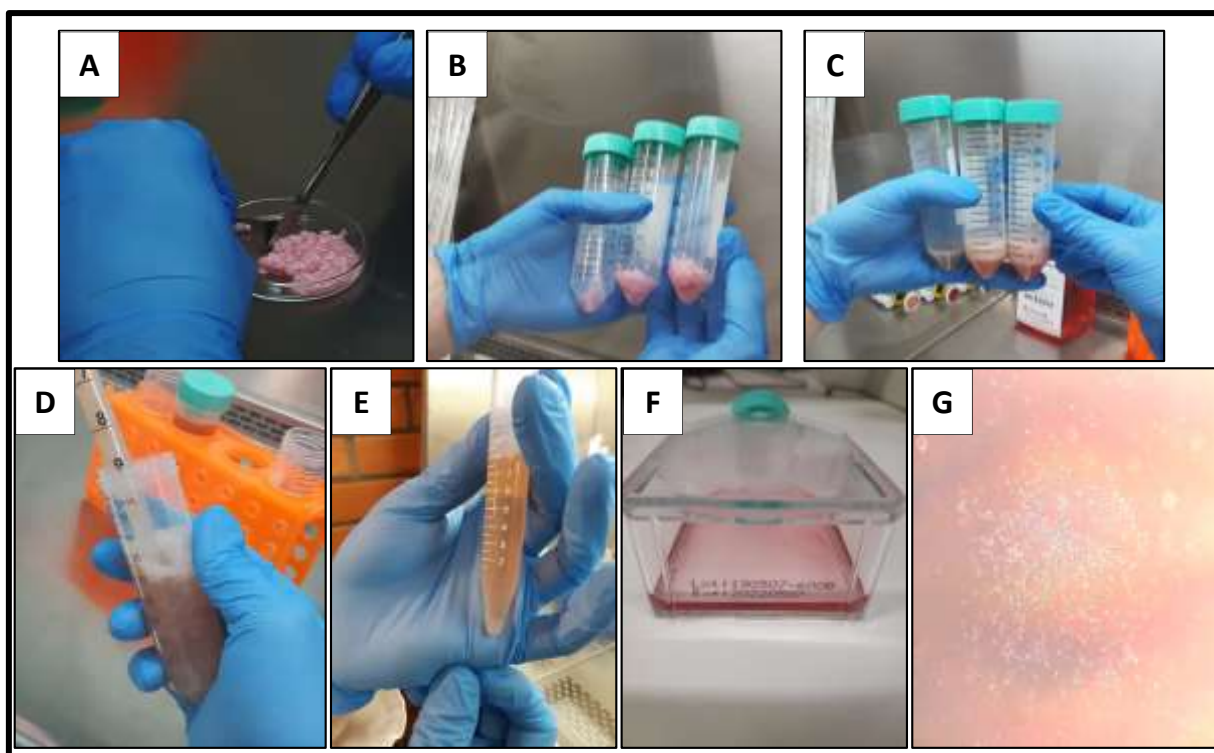
Todo processo de aquisição e processamento da amostra de tecido adiposo canino para o isolamento de células-tronco derivadas do tecido adiposo (cASCs), ocorreram sob responsabilidade da empresa Supercell Medicina Veterinária Regenerativa Ltda.

O tecido adiposo canino foi coletado durante a realização de uma cirurgia eletiva, com prévia autorização do tutor. Durante a cirurgia, foi retirada cerca de 1 g de tecido adiposo do animal. O tecido foi acondicionado em recipiente de polipropileno estéril, contendo meio de cultivo completo, sendo armazenado a 4 °C por 5 horas, até o seu processamento.

Para o processamento, em cabine de segurança biológica, as amostras foram retiradas dos tubos e dispostas em placas de petri com a massa previamente mensurada, realizando em seguida a mensuração da massa das placas de petri com a amostra, a fim de estimar a massa da amostra processada. Utilizando um ou dois bisturis, a amostra de tecido adiposo foi fragmentada mecanicamente até que a amostra de tecido adiposo adquirir um aspecto pastoso (**Figura 2a**). Toda a amostra macerada foi disposta em um tubo de 50 mL (**Figura 2b**) e foram então adicionados 5 mL de uma solução de colagenase I (2000 U/mL) (Gibco, EUA) e incubado a 37°C por 1 h, agitando a solução a cada 20 minutos (**Figura 2c**). Em seguida a colagenase I foi inativada através da adição de 20 mL de meio de cultivo DMEM completo (**Figura 2d**). As suspensões celulares foram aliqüotadas em tubos de polipropileno de 15 mL e centrifugadas a 200 xg por 10 minutos (**Figura 2e**). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspenso em 10 mL de meio de

cultivo DMEM completo e novamente centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente, esse processo foi realizado até que o conteúdo de gordura fosse separado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspense em 1 mL de meio de cultivo DMEM completo. Uma alíquota de 10 μ L foi retirada e foi realizada a contagem de células utilizando hemocítômetro. As células foram plaqueadas em frascos de cultivo de 75 cm² (BIOFIL, China) e incubados nas condições padrão de cultivo celular (**Figura 2f**), tendo o meio de cultura sido trocado 2 a 3 vezes por semana. Após 3 a 4 dias já foi possível a visualização de pequenas colônias de células aderentes (**Figura 2g**). Após atingirem confluência de 50 a 70% (cerca de 2 semanas) as células foram desagregadas utilizando a solução de tripsina-EDTA (Vitrocell, Brasil) e plaqueadas para a realização dos experimentos, na densidade celular pertinente.

Figura 2 – Processo de isolamento de ASCs a partir do tecido adiposo canino



Processo de isolamento de ASCs caninas. A: processo de maceração ou desagregação mecânica do tecido adiposo; B: amostra macerada dispostas em tubos; C: adição da solução de colagenase I (2000 U/mL); D: Inativação da ação da colagenase I com adição de meio de cultivo suplementado com SFB; E: Aliquotamento em tubos de 15 mL e centrifugação à 200 xg por 10 minutos; F: plaqueamento das células em frascos de cultivos; G: colônias de células aderentes após o período de 3 a 4 dias. **Fonte:** do autor.

5.4 ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE SUPLEMENTAÇÃO UTILIZANDO PLASMA RICO EM PLAQUETAS E SORO FETAL BOVINO

Visando verificar a viabilidade da utilização de PRP como suplemento no cultivo de cASCs, inicialmente foi realizada uma curva de crescimento para a determinação do tempo de dobramento das cASCs de acordo com a suplementação utilizada.

Posteriormente, buscou-se determinar se o cultivo com suplementação de PRP poderia alterar a capacidade das cASCs de: (i) apresentarem marcadores de membrana específicos de ASCs; (ii) expressarem fatores de transcrição relacionados à pluripotência; e (iii) diferenciarem em linhagens adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas. Para essas avaliações, as células foram cultivadas da passagem 1 (P1) até a passagem 2 (P2) com suplementação de PRP ou suplementação de SFB, sendo então tripsinizadas e plaqueadas para os experimentos.

Por fim, buscou-se avaliar se o PRP é um bom substituto do SFB como componente do meio de criopreservação celular.

5.4.1. CURVA DE CRESCIMENTO E TEMPO DE DOBRAMENTO

Para a realização da curva de crescimento e tempo de dobramento das cASCs, as células na passagem 0 (P0) foram tripsinizadas e plaqueadas na densidade de 10.000 células por poço em placas de 24 poços. Para esse procedimento, inicialmente foi retirado todo o meio do frasco, através de inversão ou aspiração, e a monocamada de células nos frascos lavadas utilizando aproximadamente 0,1 mL de solução de tampão de fosfato salino (140 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ e 1,8 mM de KH₂PO₄ – PBS) para cada 1 cm² de área de cultivo. O PBS foi então descartado por inversão ou aspiração e, em seguida, foi usada aproximadamente 0,05 mL da solução de Tripsina-EDTA (0,025% de tripsina e 1 mM de EDTA em PBS) (Vitrocell, Brasil) para cada 1 cm² de área de cultivo e incubadas por aproximadamente 3 minutos na incubadora de CO₂ a 37°C. Para inativação da tripsina, utilizou-se aproximadamente 0,1 mL de meio DMEM suplementado para

cada 1 cm² de área de cultivo celular. Em seguida todo o conteúdo dos frascos de cultivo foi aspirado e disposto em tubos de polipropileno de 15 mL (BIOFIL, China) e centrifugados a 200 xg por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspenso em 1 mL de meio DMEM. Foi então retirada uma alíquota de 20 µL da suspensão de células para a realização da contagem utilizando hemocitômetro. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 10.000 células por poço. Após 48 h, os poços tiveram seus meios trocados para o tratamento de suplementação adequado, incluindo um tratamento sem qualquer suplementação. A contagem do número de células por poço foi realizada a cada 2 ou 3 dias em triplicata para cada tratamento. Para realização da contagem, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se em cada poço 250 µL da solução de Tripsina-EDTA e incubou-se em estufa a 37 °C por 3 minutos. Em seguida, a tripsina foi inativada pela adição de 250 µL de meio suplementado adequadamente. Em um tubo de polipropileno de 1,5 mL (Axygen®, EUA), 10 µL da suspensão celular foi misturado com 10 µL da solução de Azul de Tripiano, em seguida 10 µL da mistura foi disposta na câmara de Neubauer e procedeu-se a contagem das células viáveis e inviáveis, permitindo averiguar a quantidade de células viáveis em cada poço. Os números obtidos foram anotados e os gráficos da curva de crescimento e o tempo de dobramento foram gerados utilizando o modelo de crescimento exponencial do *software* GraphPad Prism 5.

5.4.2. EXPRESSÃO DE MARCADORES DE MEMBRANA DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

Para a análise de expressão de marcadores de membrana de células-tronco derivadas do tecido adiposo canino, foi utilizada a técnica de imunofluorescência, o que permitiu uma análise qualitativa da presença desses marcadores. Levando-se em consideração os painéis de marcadores preconizados pela ISCT para MSCs humanas da IFATs para ASCs e os trabalhos publicados envolvendo imunofenotipagem de ASCs caninas, foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-CD105, anti-CD90 e anti-CD73 (**Tabela 1**) como marcadores positivos, obtidos a partir do kit *BD Stemflow™ Human MSC Analysis* (DB bioscience, EUA).

Tabela 1 – Anticorpos utilizados no ensaio de imunofenotipagem

Marcador de superfície	Anticorpo / Clone / Marca	Fluoróforo	Filtro de excitação utilizado	Filtro de barreira utilizado
CD73	Anti-CD73 / AD2 / BD Bioscience	APC	560/40 nm	660/20 nm
CD90	Anti-CD90 / 5E10 / BD Bioscience	FITC	480/30 nm	535/40 nm
CD105	CD105 / 266 / BD Bioscience)	PerCP-Cy™5.5	480/30 nm	660/20 nm

Anticorpos utilizados no ensaio de imunofenotipagem por microscopia de imunofluorescência.

Para a análise, as células foram cultivadas da passagem 1 (P1) até a passagem 2 (P2) em frascos de cultivo celular de 25 cm² com o tratamento de suplementação previamente descrito. Posteriormente, como previamente descrito, a monocamada foi desagregada e as células plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de 3 x 10⁵ células por poço, com cada poço contendo 2 lamínulas circulares. As células foram mantidas por 5 dias, com troca de meio de cultivo (com a suplementação adequada) a cada 48h. Ao atingirem a confluência de aproximadamente 80%, o meio de cultivo foi removido e as células lavadas com PBS por duas vezes. Em seguida, as células foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 1% por 20 minutos a temperatura ambiente. A solução fixadora foi removida e as células foram permeabilizadas com uma solução de PBS-Tween 0,05% por 3 minutos. A solução foi removida dos poços e as lamínulas lavadas três vezes com PBS. O bloqueio foi realizado com solução de 5% SFB em PBS por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, em cada lamínula foram adicionados 100 µL da solução mix de anticorpos devidamente diluída, segundo instruções do fabricante, de modo que a solução cobrisse toda a face da lamínula, e incubada por 3h a temperatura ambiente. Após o período de incubação, a solução com os anticorpos foi removida e as lamínulas lavadas 3 vezes com PBS. A coloração do núcleo foi realizada utilizando o corante de DNA DAPI (Thermo Fisher, EUA) na diluição de 1:1000 por 5 minutos, seguida de uma lavagem tripla com água destilada. As lamínulas foram retiradas dos poços e dispostas sobre papel para secar e, em seguida, montadas em lâminas de vidro para microscopia com uma gota do produto

ProLong®Gold Antifade Reagent (Invitrogen™, EUA). As lâminas foram analisadas utilizando o microscópio de fluorescência Eclipse Ni (Nikon, Japão) utilizando as combinações de filtro para cada fluoróforo descritos na **Tabela 1**.

5.4.3. ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO

O processo de diferenciação induzida é um dos ensaios preconizados para a caracterização das ASCs humanas e também é performado para a caracterização de ASCs caninas. O processo de diferenciação induzida permite não só demonstrar que a célula é indiferenciada, mas também demonstrar que estas células conseguem dar origem a outras linhagens, assegurando que as ASCs possuem plasticidade e a potência necessária para o desempenho de suas atribuições terapêuticas (BOURIN *et al.*, 2013).

Para a realização do ensaio de diferenciação, as células após o cultivo da P1 até a P2 com seu respectivo tratamento, foram desagregadas com a solução de tripsina-EDTA, conforme previamente descrito, e plaqueadas em placas de 12 poços, com uma lamínula circular em cada poço, na densidade de 3×10^4 células por poço. A indução da adipogênese, condrogênese e osteogênese foi realizada empregando *StemPro™ Differentiation Kit* (Gibco, EUA) específico para cada tipo de diferenciação. Os meios de diferenciação foram trocados de 2 a 3 vezes por semana.

Para a confirmação da diferenciação osteogênica, 21 dias após o início do ensaio de diferenciação, os meios foram aspirados dos poços e as lamínulas lavadas 2 vezes com PBS. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavadas duas vezes com água destilada. As células foram coradas com a solução de *Alizarin Red S* 2% (pH 4,2) (INLAB, Brasil) por 2-3 minutos, em temperatura ambiente, e lavadas 3 vezes com água destilada. As lamínulas foram secas sobre papel absorvente e montadas em lâminas de microscopia.

Para a confirmação da diferenciação condrogênica, após 21 dias os meios de diferenciação foram removidos dos poços e as lamínulas lavadas 1 vez com PBS. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavadas 2 vezes

com PBS. Em seguida, as células foram coradas com a solução de *Alcian Blue* (INLAB, Brasil) 1% em HCl 0,1 M por 30 minutos em temperatura ambiente. A solução de coloração foi descartada e as células lavadas 3 vezes com água destilada. As lamínulas foram deixadas sobre papel absorvente para que secassem e montadas em lâminas para microscopia.

Para a confirmação do sucesso da diferenciação adipogênica, após 14 dias o meio para diferenciação adipogênica foi removido dos poços e as células lavadas 1 vez com PBS. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavadas 2 vezes com PBS. As células foram coradas com solução de *Oil Red O* (Sigma-Aldrich, Alemanha) 0,3% em 60% isopropanol e 40% água destilada por 5 minutos em temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas 3 vezes com água destilada e deixadas secar sobre papel absorvente. Após secas, foram montadas em lâminas para microscopia.

As lâminas montadas foram analisadas utilizando microscópio invertido Eclipse TI-S (Nikon, Japão), no qual foram feitas as aquisições das imagens no *software* específico.

5.5 ANÁLISE DO PRP COMO COMPONENTE DE MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO

O meio de criopreservação é o meio que é utilizado para preservar células congeladas por longos períodos. Um meio de criopreservação deve permitir que as células sejam congeladas sem sofrer tanto estresse físico. Dentre as diferentes formulações dos meios de criopreservação, o mais comumente utilizado é composto por 70% de meio de cultivo sem suplementação, 20% SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, um agente criopreservante).

Nesse ensaio, além do SFB e do PRP, também foi utilizado plasma pobre em plaquetas (PPP) para avaliar se este tem características semelhantes ao PRP ou SFB nessa aplicação. Para a realização desse ensaio, as células na passagem 3 (P3), cultivadas com meio DMEM com suplementação de SFB foram tripsinizadas e centrifugadas conforme previamente descrito. O *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultivo sem suplementação e uma alíquota de 10 µL da suspensão

de células foi retirada para a contagem do número de células. As células foram então divididas em três tubos de polipropileno de 15 mL (BIOFIL, China) na quantidade de $1,25 \times 10^6$ por tubo. No tubo 1, foram adicionados 500 μ L de SFB, 250 μ L de DMSO e o volume ajustado até 2,5 mL com meio DMEM sem suplementação. No tubo 2, foram adicionados 500 μ L de PRP, 250 μ L de DMSO e o volume ajustado até 2,5 mL com meio DMEM sem suplementação. No tubo 3, foram adicionados 500 μ L de PPP, 250 μ L de DMSO e o volume ajustado até 2,5 mL com meio DMEM sem suplementação. Em cada tubo foi obtido um volume de 2,5 mL de suspensão de células em meio de criopreservação, com densidade de 5×10^5 células por mL. O volume de cada um dos tubos foi distribuído em 5 criotubos (500 μ L por criotubo) e estes acondicionados em *container* de congelamento (Nalgene®, Alemanha) que foi levado imediatamente para o *freezer* -80°C. Após 24h, os tubos foram removidos do *container* e dispostos em caixas de armazenamento de tubos, do tipo *criobox*, onde permaneceram até o momento da análise.

Para a análise da viabilidade, os criotubos foram descongelados a 37°C e uma alíquota de 10 μ L foi retirada para a realização do ensaio por exclusão com Azul de Tripano. Para isso, a alíquota de suspensão celular foi misturada com 10 μ L da solução de Azul de Tripano, e 10 μ L da mistura foram dispostos na câmara de Neubauer, onde procedeu-se a contagem das células viáveis e inviáveis, permitindo avaliar a porcentagem de viabilidade celular pós-congelamento, a análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunns utilizando o *software GraphPad Prism 5*.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CURVA DE CRESCIMENTO E TEMPO DE DOBRAMENTO

A curva de crescimento pode ser dividida em três fases, que correspondem aos padrões de crescimento celular. Essas fases são: (i) fase log, sendo caracterizada como uma etapa de adaptação celular após os estresses decorrentes da manipulação, onde não é observada grande proliferação celular; (ii) fase log, ou fase exponencial, onde as células atingem sua capacidade máxima de crescimento após adaptação ao meio de cultivo; e (iii) fase estacionária, ou *plateau*, onde ocorre a limitação de espaço e/ou nutrientes, causando uma significativa diminuição no crescimento celular (URIO *et al.*, 2013).

As análises da curva de crescimento são realizadas através da contagem de células em intervalos de tempo definidos, possibilitando assim estimar o quanto os tratamentos interferiram na proliferação das células. Além de estimar as três fases citadas anteriormente, é possível estimar, a partir da curva de crescimento, o tempo de dobramento, ou *double time*, das cASCs. Para isso, foram utilizados os pontos da fase log do gráfico de crescimento celular (**Figura 3**), correspondentes ao intervalo do dia 3 ao dia 10.

Com base no gráfico exposto na **Figura 3** é possível observar que as células cultivadas em meios suplementados com PRP e SFB apresentaram padrão de crescimento semelhante entre si, não tendo sido observadas diferenças estatísticas entre as três fases de crescimento em nenhum dos pontos analisados.

Figura 3 – Curva de crescimento celular

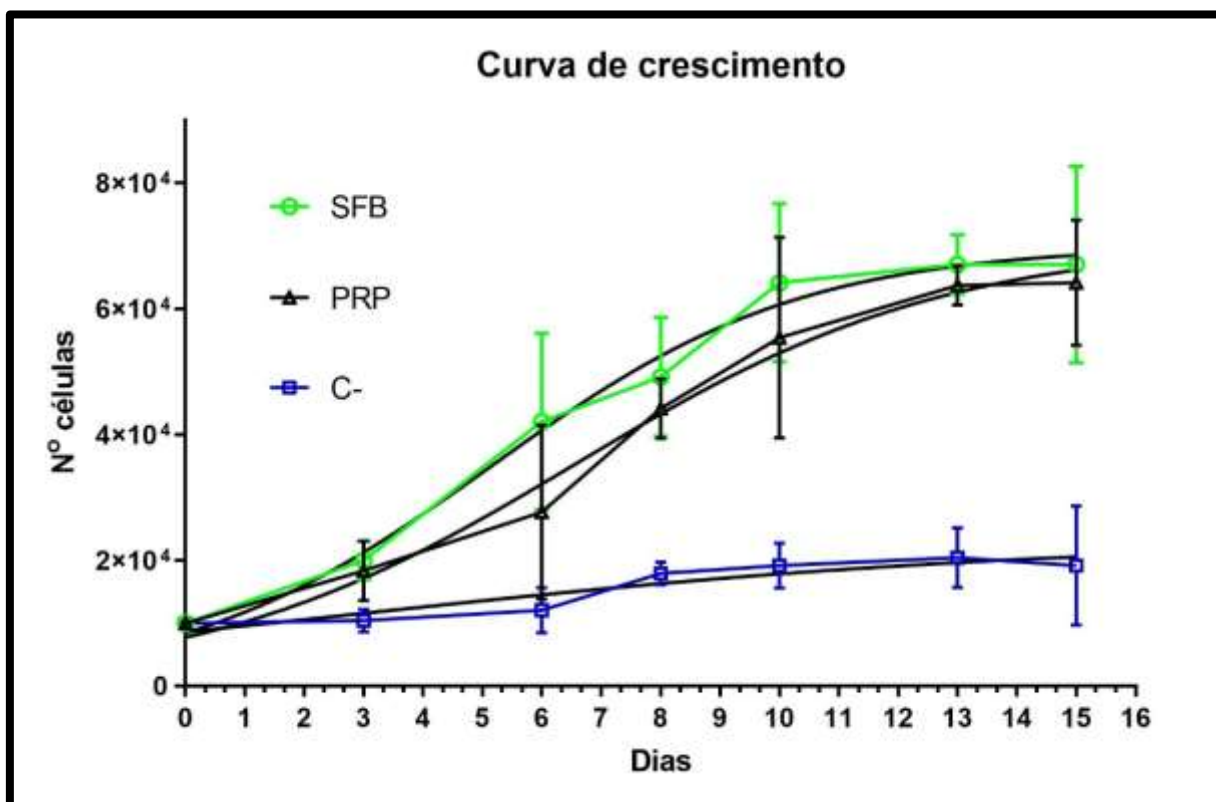


Gráfico demonstrando a curva de crescimento celular comparando os tratamentos sem suplementação (C-), suplementação com SFB e com PRP. Em verde: curva de crescimento proporcionado pela suplementação com SFB; em azul: curva de crescimento da suplementação com PRP; em preto: curva de crescimento das células cultivadas sem nenhum tipo de suplementação. Barras nos pontos demonstram intervalo de confiança de 95%. Linhas em preto acompanhando a curva de cada tratamento representam uma análise de regressão demonstrando uma curva corrigida.

Em relação ao tempo de dobramento populacional (*Doubling time*), analisado na fase log, foi observado que as células que receberam meio suplementado com PRP apresentaram um tempo de dobramento médio de 117 ± 24 horas e células cultivadas com meio suplementado com SFB apresentaram tempo de dobramento médio de 103 ± 20 horas, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Tal dado sugere que o PRP exerce estímulos proliferativos comparáveis aos da suplementação com SFB no processo de expansão de ASCs caninas. Ademais, esse achado se mostra bastante similar com dados da literatura referentes ao uso de PRP na expansão de MSCs humanas, onde foram observados potenciais proliferativos superiores do PRP sobre o uso de SFB (AMABLE *et al.*, 2013; LYKOV *et al.*, 2017; VOGEL *et al.*, 2006). Embora os dados referentes à utilização do PRP em ASCs caninas não tenham apresentado um potencial de

proliferação superior à utilização do SFB, deve-se levar em conta que o processo de isolamento das ASCs caninas foi realizado utilizando meio suplementado com SFB (P0), com os tratamentos utilizando PRP, SFB ou nenhuma suplementação sendo definidos apenas a partir da primeira passagem (P1). Isso porque, estudos apontam que o SFB apresenta capacidade de selecionar populações de células mais responsivas ao perfil de fatores de crescimento nele contido (VAN DER VALK *et al.*, 2018). Sendo assim, é possível que o processo de isolamento e cultivo das cASCs utilizando suplementação com SFB durante a P0 tenha iniciado um processo de seleção de células mais responsivas ao SFB, quando comparados ao PRP. Uma das formas de realizar essa avaliação seria a utilização de PRP desde o processo inicial de isolamento das ASCs, processo que não consta no escopo deste trabalho.

Em relação ao meio de cultivo sem suplementação, o tempo de dobramento foi de 174 ± 31 horas, divergindo estatisticamente dos tratamentos de suplementação com SFB e PRP. Este dado pode ser considerado demonstração da necessidade de suplementação dos meios de cultivo convencionais para a indução da proliferação e manutenção celular, considerando que os mesmos carecem de uma série de fatores de crescimento, vitaminas e metabólitos encontrados nas diferentes fontes de suplementação. Apesar disso, considerando a possível seleção clonal, resultante do processo de isolamento utilizando meio suplementado com SFB, previamente hipotetizado, faz-se necessários testes complementares para comprovar a necessidade da suplementação.

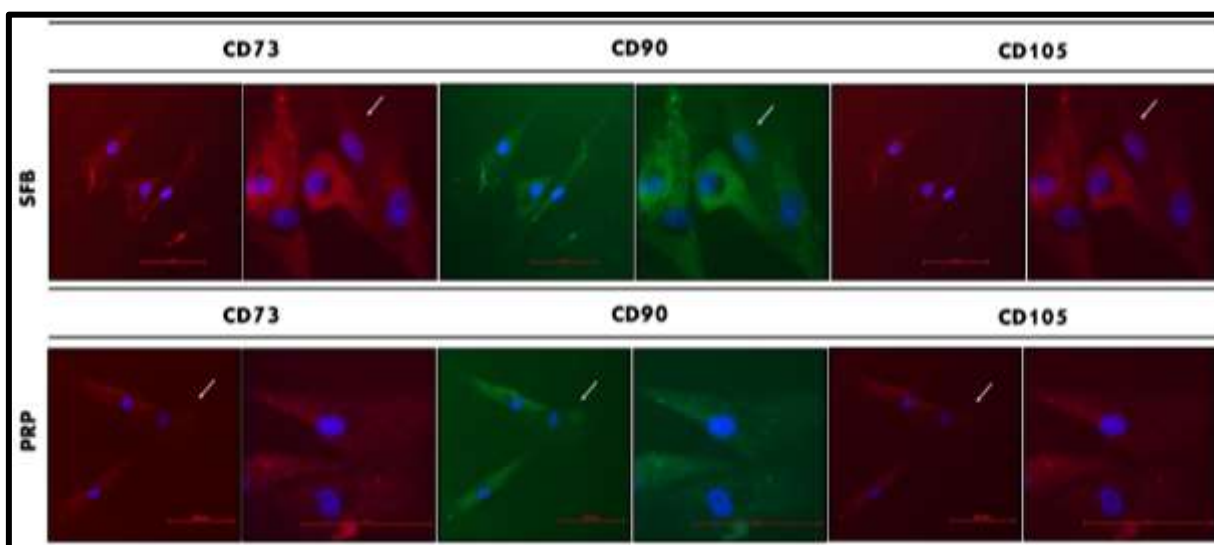
6.2 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE MEMBRANA DE ASCs

Os critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) e Sociedade Internacional de Gordura Aplicada à Tecnologia (IFATS) utilizam um vasto painel de marcadores de membrana típicos de MSCs/ASCs. Apesar disso, os marcadores CD73, CD90 e CD105 são os mais amplamente utilizados nos trabalhos científicos como marcadores positivos das MSCs e ASCs humanas e caninas (BITTENCOURT *et al.*, 2016; BOURIN *et al.*, 2013; CSAKI *et al.*, 2007; DOMINICI *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2012; KISIEL *et al.*, 2012). Desse modo, para a avaliação da expressão de marcadores de membrana típicos de ASCs, foram analisados por microscopia de

imunofluorescência os marcadores CD73, CD90 e CD105.

Tanto as cASCs expandidas com suplementação de PRP quanto as expandidas com SFB apresentaram marcação positiva na maioria das células para os marcadores positivos CD73, CD90 e CD105 (**Figura 4**). Estes resultados indicam que a expansão de cASCs utilizando a suplementação com PRP canino não afeta a expressão de marcadores relacionado ao fenótipo tronco quando comparado às células suplementadas com SFB. Esse dado condiz com informações obtidas em diferentes trabalhos utilizando PRP humano para cultivo de MSCs humanas, sendo mais um indicativo do perfil e comportamento análogo entre PRP e ASCs humanas e caninas (AMABLE *et al.*, 2014; AZOUNA *et al.*, 2012; HORN *et al.*, 2010).

Figura 4 – Imunofenotipagem de marcadores de membrana de ASCs



Células com imunomarcação para CD73 (fluoróforo vermelho APC), CD90 (fluoróforo verde FITC) e CD105 (fluoróforo vermelho PerCP-CyTM5.5). Núcleos marcados com corante azul fluorescente de DNA DAPI. Setas indicam células com pouca marcação dos marcadores de membrana investigados.

Embora a maioria das células tenha apresentado marcação positiva para os marcadores de membrana CD73, CD90 e CD105, em ambos os tratamentos de suplementação, é possível observar que algumas células não apresentaram marcação para um ou nenhum dos marcadores investigados (**Figura 4** – células indicadas pelas setas brancas). Essa falta de marcação para alguns marcadores em pequenas quantidades de células é um comportamento esperado, pois o processo de isolamento das ASCs/MSCs tende a originar populações de células levemente

heterogêneas, as quais tendem a ficar mais homogêneas com o processo de subcultivo ou passagens. Devido a isso, a positividade dos marcadores CD73, CD90 e CD105 em pelo menos 95% das células é o suficiente para que estas sejam consideradas MSCs/ASCs (BOURIN *et al.*, 2013; DOMINICI *et al.*, 2006).

Além disso, a avaliação do perfil de marcadores de membrana de MSCs/ASCs, tanto negativos quanto positivos, é usualmente realizada através da técnica de citometria de fluxo, a qual é uma técnica quantitativa com capacidade de avaliar a expressão desses marcadores em milhares de células. Apesar disso, a técnica de microscopia de imunofluorescência pode oferecer uma análise qualitativa de imunomarcação, que apesar de não substituir a técnica de citometria de fluxo, tem sido utilizada em diferentes trabalhos na imunofenotipagem de MSCs (BITTENCOURT *et al.*, 2016; KISIEL *et al.*, 2012; MATIS; YE; SHAKIBAEI, 2007).

Segundo os critérios da ISCT e IFATS, as MSCs/ASCs não devem expressar os marcadores de membrana CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA classe II (BOURIN *et al.*, 2013; DOMINICI *et al.*, 2006). Apesar da disponibilidade desses anticorpos no kit utilizado (*BD Stemflow™ Human MSC Analysis*), estes estão conjugados com o fluoróforo ficoeritrina (PE) e, devido a limitações técnicas referentes à indisponibilidade de combinação de filtros de microscopia de imunofluorescência disponíveis para uso, a avaliação desses marcadores não pôde ser realizada.

6.3 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO

No ensaio de diferenciação, as cASCs expandidas com suplementação de PRP exibiram capacidade de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica sem distinção visível em relação às cASCs expandidas com SFB. Para avaliar a diferenciação adipogênica, foi utilizado o *Oil Red S*, um corante capaz de corar vesículas com lipídeos acumulados (**Figura 5 - Adipogênica**). Para visualizar a diferenciação condrogênica, foi utilizado a corante *Alcian Blue*, um corante capaz de corar matriz extracelular rica em proteoglicanos, uma das características chave da diferenciação condrogênica (**Figura 5 - Condrogênica**). A identificação da diferenciação osteogênica foi realizada através da análise da presença de matriz

extracelular mineralizada, um dos principais marcadores desse tipo de diferenciação. Para isso foi utilizado o corante *Alizarin Red S*, o qual é capaz de corar a matriz extracelular mineralizada. As cASCs com diferenciações osteogênicas podem ser visualizadas na **Figura 5 - Osteogênica**.

Figura 5 – Coloração para confirmação do processo de diferenciação

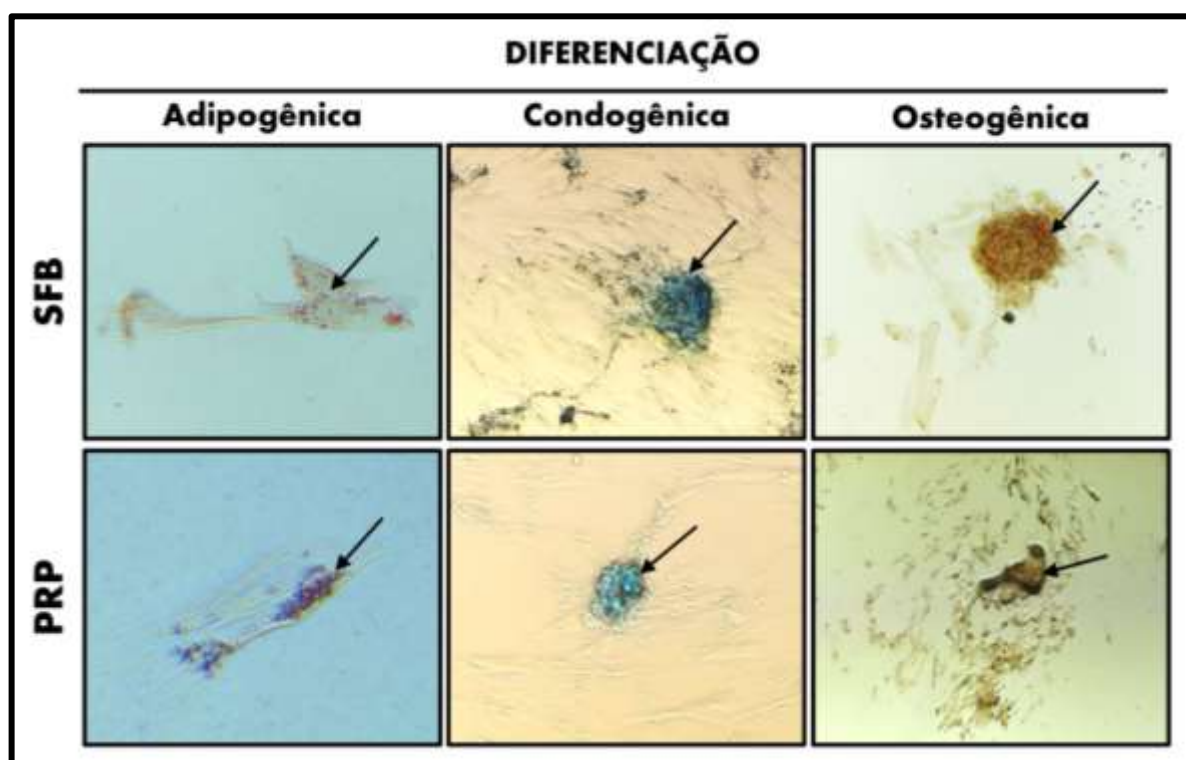


Imagem de microscopia mostrando o resultado do processo de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica das cASCs após expansão utilizando suplementação de PRP ou SFB. Na diferenciação adipogênica, setas indicam a presença de vesículas com lipídeos, corados através da coloração *Oil Red O*, em ambos os tratamentos de suplementação; Na diferenciação condrogênica, setas indicam matriz extracelular rica em proteoglicano, marcadas com a coloração *Alcian Blue* em ambos tratamentos de suplementação; Para diferenciação osteogênica, setas indicam presença de matriz extracelular mineralizada, marcada pelo corante *Alizarin Red S*, tanto no tratamento de suplementação PRP quanto SFB.

A manutenção da capacidade de diferenciação, além de ser um dos critérios mínimos para a definição de populações de MSCs/ASCs, é de extrema importância por ser um dos hipotéticos mecanismos pelo qual estas células exercem seu papel terapêutico (LANZA *et al.*, 2014). Portanto, a manutenção da capacidade de diferenciação das cASCs cultivadas com suplementação de PRP indica que, ao menos nesse aspecto, os potenciais terapêuticos dessas células devem se manter, se tornando mais um indicativo de que o PRP pode ser uma alternativa viável para a

substituição do SFB no cultivo celular de cASCs.

Frente aos resultados apresentados, é importante ressaltar algumas divergências encontradas na literatura ao que diz respeito a utilização da suplementação com PRP e a manutenção da capacidade de diferenciação das MSCs. Em alguns estudos, autores indicam que o cultivo de MSCs humanas utilizando a suplementação com PRP pode estimular de forma mais seletiva a diferenciação condrogênica (HILDNER *et al.*, 2015; LIOU *et al.*, 2018; MISHRA *et al.*, 2009), enquanto outros estudos mostraram que a diferenciação osteogênica pode ser favorecida (ABAZARI *et al.*, 2020; AMABLE *et al.*, 2014; DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2010). Além disso, alguns autores têm relatado que as MSCs/ASCs caninas possuem baixa capacidade de diferenciação adipogênica (KREŠIĆ *et al.*, 2017; NEUPANE *et al.*, 2008). Interessantemente, nenhum dos problemas apresentados pelos estudos citados foi observado no presente trabalho. Frente a isso, é possível que as divergências entre os autores se devam a fatores como: distinção dos processos de preparação do PRP implementados, por diferenças biológicas individuais entre os doadores e espécie utilizada como modelo de estudo, fatores esses que devem ser padronizados e levados em consideração para a implementação do PRP como alternativa para terapias celulares (AMABLE *et al.*, 2014; CHO *et al.*, 2011).

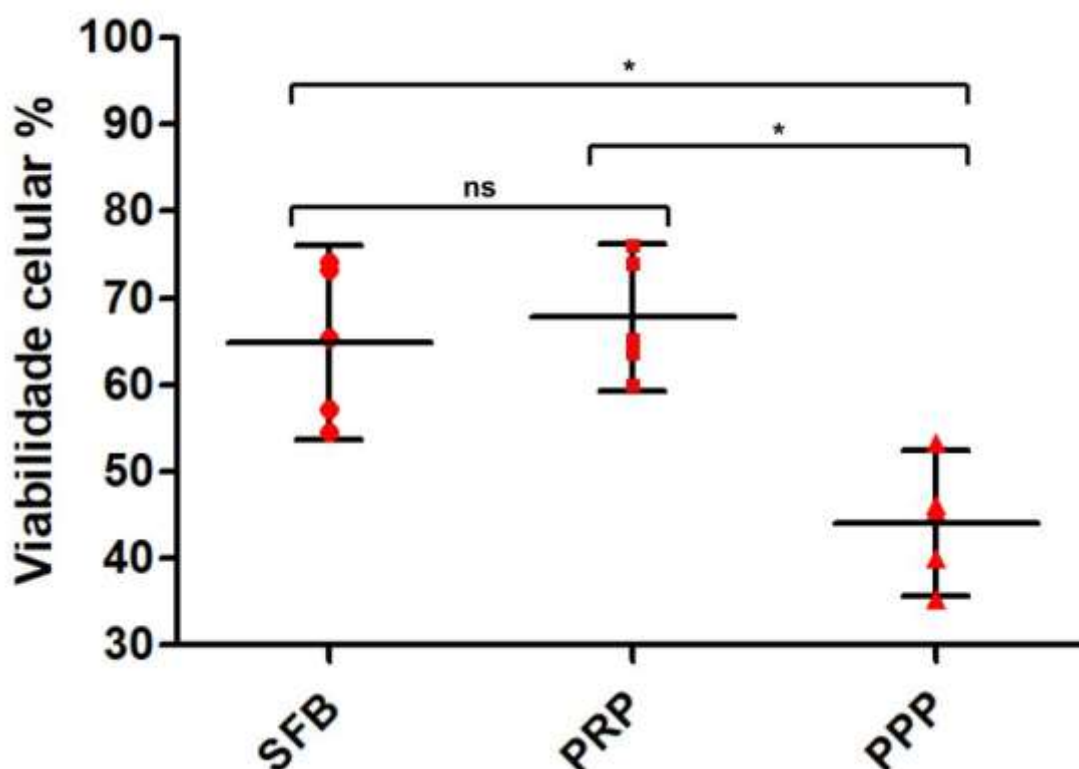
6.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE DO PRP COMO SUBSTITUTO DO SFB NA COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO

Para avaliar a viabilidade de utilização do PRP como substituto do SFB na composição do meio de criopreservação das cASCs, foi realizado o teste de viabilidade com Azul de Tripano. Além disso, um segundo candidato para a substituição do SFB foi utilizado, o plasma pobre em plaquetas (PPP).

A avaliação da viabilidade celular após criopreservação de 18 dias não demonstrou diferenças estatisticamente relevantes entre as cASPs congeladas em meio composto por 20% de PRP ou 20% de SFB (**Figura 6**). Já as células congeladas, também por 18 dias, em PPP apresentaram diferenças significantes em relação aos tratamentos com PRP e do SFB, apresentando uma viabilidade

consideravelmente reduzida. Esse dado sugere que o PRP pode ser bom substituto ao SFB também no processo de criopreservação de cASCs, enquanto o PPP não apresenta essa capacidade.

Figura 6 – Análise da viabilidade celular pós-congelamento



Comparação da proporção de células viáveis após a criopreservação utilizando SFB, PRP e PPP como componente no meio de criopreservação; * representa diferença estatisticamente significativa; ns representa diferença estatística não significativa ($p < 0.05$)

Os resultados observados podem ter sido obtidos pelo SFB ser comumente utilizado para criopreservação devido à sua capacidade de estabilizar as membranas celulares das MSCs/ASCs, regulando a pressão osmótica intra e extracelularmente, resultando em uma taxa de viabilidade alta (YONG *et al.*, 2015). O mecanismo pelo qual o SFB exerce esse efeito é pouco compreendido. Apesar disso, algumas hipóteses sugerem a elevada concentração de proteínas e outras macromoléculas (componentes também presentes no PRP) como os principais responsáveis pelo efeito citoprotetor durante a criopreservação (CHO *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2018; VAN DER VALK *et al.*, 2018).

Ademais, a técnica de criopreservação mais indicada para as MSCs são a manutenção do congelamento em botijão criogênico com nitrogênio líquido, o que geralmente garante uma viabilidade celular maior que 80% para esse tipo de meio de criopreservação (YONG *et al.*, 2015). Entretanto, devido a indisponibilidade desse equipamento, não foi possível avaliar a viabilidade celular após criopreservação da forma mais otimizada para as cASCs, o que pode ter influenciado diretamente na viabilidade celular apresentada no presente trabalho.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os dados adquiridos nesse trabalho sugerem que o plasma rico em plaquetas (PRP) é um bom candidato na substituição do soro fetal bovino (SFB) como suplementação no cultivo de células-tronco caninas derivadas do tecido adiposo (cASCs), pois demonstrou bom potencial proliferativo, a expansão das células da P1 até a P3 com essa suplementação não alterou o perfil de marcadores de membrana e capacidade de diferenciação, além de ter se mostrado um bom substituto ao SFB como componente de meio de criopreservação, não alterando significativamente a viabilidade das células após o congelamento, em comparação ao SFB.
- Faz-se importante testes complementares das capacidades do PRP como meio de suplementação, sendo necessário a avaliação da ausência dos marcadores de membrana CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA classe II e a avaliação positiva dos marcadores CD73, CD90 e CD105 por meio da técnica de citometria de fluxo. Além disso, faz-se necessária a avaliação da viabilidade celular após criopreservação em nitrogênio líquido.
- A utilização do PRP desde o processo de isolamento pode, assim como o SFB, levar a uma seleção clonal de células mais beneficiadas pelo perfil de fatores de crescimento contidos no PRP. Isso pode resultar em maiores taxas de proliferação, viabilidade celular e também no sucesso das aplicações terapêuticas das ASCs.
- Por fim, tanto as cASCs quanto o PRP utilizados no presente estudo foram isoladas de doadores únicos, representando uma baixa variabilidade biológica.

Desse modo, fazem-se necessários estudos remanescentes utilizando diferentes doadores, possibilitando uma análise mais ampla, compreendendo uma maior variabilidade dos dados que descarte a possibilidade do acaso nos dados apresentados no presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ABAZARI, M. F. et al. Improved osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells cultured on polyvinylidene fluoride/collagen/platelet-rich plasma composite nanofibers. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 2, p. 1155–1164, 2020.
- AMABLE, P. R. et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 4, n. 3, p. 1–13, 2013.
- AMABLE, P. R. et al. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- ARORA, M. Cell Culture Media: A Review. **MATER METHODS**, 2013.
- ASTORI, G. et al. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: Present and future. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2016.
- AZOUNA, N. BEN et al. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 3, n. 1, p. 6, 2012.
- BAUMAN, E.; GRANJA, P. L.; BARRIAS, C. C. Fetal bovine serum-free culture of endothelial progenitor cells—progress and challenges. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 7, p. 1567–1578, 2018.
- BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 403–430, 2011.
- BITTENCOURT, M. K. W. et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs with Keratoconjunctivitis Sicca. **Cell Medicine**, v. 8, n. 3, p. 63–77, 2016.
- BOURIN, P. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 641–648, 2013.
- BRINDLEY, D. A. et al. Peak serum: Implications of serum supply for cell therapy manufacturing. **Regenerative Medicine**, v. 7, n. 1, p. 7–13, 2012.
- CHAMBERLAIN, G. et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.
- CHO, H. S. et al. Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich plasma and its influence on human mesenchymal stem cells. **Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 31, n. 3, p. 212–218, 2011.

CHU, D.-T. et al. Adipose Tissue Stem Cells for Therapy: An Update on the Progress of Isolation, Culture, Storage, and Clinical Application. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 7, p. 917, 2019.

DA SILVA MEIRELLES, L. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 5–6, p. 419–427, 2009.

DE BAKKER, E. et al. Canine mesenchymal stem cells: State of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. **Veterinary Quarterly**, v. 33, n. 4, p. 225–233, 2013.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. **Archives of Oral Biology**, v. 55, n. 3, p. 185–194, 2010.

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.

EHNERT, S. et al. The possible use of stem cells in regenerative medicine: Dream or reality? **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 394, n. 6, p. 985–997, 2009.

ENCISO, N. et al. Stem cell factor supports migration in canine mesenchymal stem cells. **Veterinary Research Communications**, v. 42, n. 1, p. 29–38, 2018.

FRIEDENSTEIN, A. J. . . ; CHAILAKHJAN, R. K. . . ; LALYKIN, K. S. The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells. **Cell Tissue Kinet**, p. 393–403, 1970.

GSTRAUNTHALER, G.; LINDL, T.; VAN DER VALK, J. A severe case of fraudulent blending of fetal bovine serum strengthens the case for serum-free cell and tissue culture applications. **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**, v. 42, n. 3, p. 207–209, 2014.

HELGASON, C. D. . ; MILLER, C. L. **Basic cell culture protocols**. 4th. ed. [s.l.] New York: Humana Press, 2013.

HILDNER, F. et al. Human platelet lysate successfully promotes proliferation and subsequent chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells : a comparison with articular chondrocytes. n. January 2013, p. 808–818, 2015.

HORN, P. et al. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 12, n. 7, p. 888–898, 2010.

JOCHEMS, C. E. A. et al. The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem? **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**, v. 30, n. 2, p. 219–227, 2002.

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

KISIEL, A. H. et al. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine

mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 8, p. 1305–1317, 2012.

KOCAOEMER, A. et al. Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. **Stem Cells**, v. 25, n. 5, p. 1270–1278, 2007.

KREŠIĆ, N. et al. Canine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Transcriptome Composition Alterations: A Step towards Standardizing Therapeutic. **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.

LANZA, R. et al. Essentials of Stem Cell Biology. **Essentials of Stem Cell Biology**, v. 3, 2014.

LI, N.; CLEVERS, H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. **Science**, v. 327, n. 5965, p. 542–545, 2010.

LIOU, J. J. et al. Effect of Platelet-Rich Plasma on Chondrogenic Differentiation of Adipose- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering - Part A**, v. 24, n. 19–20, p. 1432–1443, 2018.

LUBKOWSKA, A.; DOLEGOWSKA, B.; BANFI, G. Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 26, n. 2 Suppl 1, 2012.

LYKOV, A. P. et al. Comparative Effects of Platelet-Rich Plasma, Platelet Lysate, and Fetal Calf Serum on Mesenchymal Stem Cells. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 163, n. 6, p. 757–760, 2017.

MA, O. K.; CHAN, K. H. Immunomodulation by mesenchymal stem cells : Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. v. 8, n. 9, p. 268–278, 2016.

MARKOSKI, M. M. Advances in the Use of Stem Cells in Veterinary Medicine: From Basic Research to Clinical Practice. **Scientifica**, v. 2016, 2016.

MATIS, C. C. U.; YE, A. M. H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis , osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells : a biochemical , morphological and ultrastructural study. p. 507–520, 2007.

MISHRA, A. et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 15, n. 3, p. 431–435, 2009.

NEUPANE, M. et al. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering - Part A**, v. 14, n. 6, p. 1007–1015, 2008.

OIKONOMOPOULOS, A. et al. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: The effects of animal/xeno-free media. **Scientific Reports**, v. 5, n. October, p. 1–11, 2015.

- PARK, S. et al. Cryobiology Fetal bovine serum-free cryopreservation methods for clinical banking of human adipose-derived stem cells. **Cryobiology**, v. 81, n. February, p. 65–73, 2018.
- PUCK, THEODORE T.; CIECIURA, STEVEN J.; ROBINSON, A. Genetics of Somatic Mammalian Cells III. Long-Term Cultivation of Euploid Cells From Human and Animal Subjects. **THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE**, v. 108, n. 77, p. 945–959, 1958.
- QUESENBERRY, P. J.; BECKER, P. S. Commentary Stem cell homing: Rolling, crawling, and nesting. v. 95, n. 24, p. 15155–15157, 1998.
- RAMALHO-SANTOS, M.; WILLENBRING, H. Commentary On the Origin of the Term “Stem Cell”. 2007.
- 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, 2012.
- RIZVANOVA, A. A. et al. Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells in Biomedical and Clinical Applications. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.
- SCHWARZ, C. et al. Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 457–462, 2012.
- SLACK; JONATHAN M. W. **The Science of Stem Cells**. [s.l.: s.n.].
- SUBBIAHANADAR CHELLADURAI, K. et al. Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. **Heliyon**, v. 7, n. 8, p. e07686, 2021.
- TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. p. 861–872, 2007.
- TAKEMITSU, H. et al. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. **BMC Veterinary Research**, v. 8, 2012.
- URIO, M. . et al. Análise da curva de crescimento de fibroblastos com ou sem prévia exposição ao meio empregado no cultivo de embriões. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 2, 2013.
- VAN DER VALK, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 4, p. 1053–1063, 2010.
- VAN DER VALK, J. et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. **Altex**, v. 35, n. 1, p. 99–118, 2018.
- VIEIRA, N. M. et al. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 3, p. 279–289, 2010.
- VOGEL, J. P. et al. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. **Platelets**, v. 17, n. 7, p. 462–469, 2006.

WEISS, A. R. R.; DAHLKE, M. H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living , Apoptotic , and Dead MSCs. v. 10, n. June, p. 1–10, 2019.

YONG, K. W. et al. Cryopreservation of Human Mesenchymal Stem Cells for Clinical Applications: Current Methods and Challenges. **Biopreservation and Biobanking**, v. 13, n. 4, p. 231–239, 2015.