UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSO DE BOVINOS

TATICIA LIEH IKEDA

Botucatu – SP

Janeiro, 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSO DE BOVINOS

TATICIA LIEH IKEDA

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ikeda, Taticia Lieh.
Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de bovinos / Taticia Lieh Ikeda. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Fernanda da Cruz Landim
Capes: 50500007

1. Bovino. 2. Vaca. 3. Expressão gênica. 4. Tecido adiposo. 5. Células-tronco.

Palavras-chave: Expressão gênica; Marcadores de superfície celular; Potencial de diferenciação; Vaca.

Nome do autor: Taticia Lieh Ikeda

Título: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSO DE BOVINOS

Data: 26 de janeiro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Edson Lo Turco

Membro

Departamento de Urologia

Universidade Federal de São Paulo – São Paulo

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de agradecer a Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim pela confiança e suporte dado durante todo o curso de mestrado, pela disponibilidade em me ajudar quando e onde eu estivesse e pelo apoio dado em todas as minhas decisões profissionais.

A todos os integrantes, estagiários e colaboradores do Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular que me acompanharam durante meu mestrado e que contribuíram de alguma forma com o meu projeto, seja com protocolos, reagentes ou “apoio moral”. Em especial, gostaria de agradecer a Amanda, Bianca, Isadora, Loreta e Midyan que além da ajuda técnica me ofereceram a amizade.

A Carol “Guapa”, que merece um parágrafo a parte, pela enorme ajuda durante os meus experimentos e com os (vários) documentos que precisavam ser entregues na Seção de Pós-graduação. Mas, acima de tudo, gostaria de agradecer pelo ombro amigo sempre à disposição.

Ao Prof. Dr. João Pessoa, Camila e Jaqueline pelos primeiros ensinamentos sobre PCR.

Ao Prof. Dr. João Pesquero por disponibilizar o laboratório para que eu realizasse meus experimentos de expressão gênica. Agradeço ao Giscard e a Paola pela grande ajuda durante essa etapa.

A Fazenda Marino por disponibilizar os animais utilizados nesse estudo.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Instituto de Biociências por todos os ensinamentos que complementaram minha formação.

A todos os funcionários da Seção de Pós-graduação e do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária que contribuíram de alguma forma com meu mestrado.

Ao Marcello pelas análises estatísticas, pela paciência e conselhos.

Aos membros da banca pela disponibilidade e inestimáveis recomendações.

A CNPq pelo apoio financeiro recebido durante o curso de mestrado.

A Camila, Ivy e Ana pela amizade e por terem sido ótimas companheiras de república. Ao Paulo por ter sido essa surpresa boa na minha vida. A todos meus amigos (novos e antigos) que de alguma forma tornaram essa jornada mais agradável.

Por fim, gostaria de agradecer minha família que, mesmo não entendendo direito o tema do meu mestrado, me apoiou de todas as formas possíveis.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequência de oligonucleotídeos empregados na análise de qPCR

TABELA 2. Avaliação da eficiência de UFC-F. Número de UFC e valores de eficiência (%) estão descritos como média e desvio padrão

TABELA 3. Avaliação da eficiência de UFC-F de acordo com a morfologia. Valores descritos como média e desvio padrão

TABELA 4. Média e desvio padrão do perfil imunofenotípico das CTM-AD (%) nos momentos P0 e P2

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Delineamento experimental

FIGURA 2. Coleta de tecido adiposo subcutâneo

FIGURA 3. Fracionamento da amostra de tecido adiposo (A) para facilitar a digestão enzimática. (B) Amostra pós-fracionamento

FIGURA 4. Morfologia das ASC bovinas em cultivo primário: característica fibroblastóide das células com 72h (A) e 96h (B), no aumento de 100 X. Confluência de 80% obtida após aproximadamente 216h, no aumento de 100 X (C) e 200 X(D).

FIGURA 5. Avaliação morfológica das UFC-F coradas com cristal violeta. (A) Avaliação macroscópica. (B) Imagem microscópica representativa de colônias densas, no aumento de 40 X. (C) Imagem microscópica representativa de colônias dispersas, no aumento de 40 X.

FIGURA 6. Histrograma representativo da citometria de fluxo dos marcadores CD44, MHC II, CD34 e vimentina nos momentos P0 e P2. Marcação positiva para CD44 em P0 (média de 86,6 % - A) e em P2 (média de 76,6 % - B). Marcação negativa para MHC II em P0 (média de 2,1 % - C) e em P2 (média 2,3 % -D). Baixa marcação de CD34 em P0 (média de 8,7 % - E) e em P2 (média de 1,8 % - F). Marcação positiva para vimentina em P2 (média de 82,48 % - G).

FIGURA 7. Diferenciação osteogênica, após 10 dias de cultivo, coradas com *Alizarin Red*: células mantidas em meio de cultivo (células não-induzidas), no aumento de 100 X (A) e 200X (B), e células mantidas em meio indutor apresentando deposição de cálcio corada em vermelho, no aumento de 100 X (C) e 200 X (D).

FIGURA 8. Diferenciação adipogênica, após 10 dias de cultivo, corada em *Oil Red*: células mantidas em meio de cultivo (células não-induzidas), no aumento de 200 X(A) e 400 X (B), e células mantidas em meio indutor apresentando

lipídios intracitoplasmáticos corados em vermelho, no aumento de 200 X (C) e 400 X.

FIGURA 9. Análise quantitativa da expressão relativa (em unidades arbitrárias – u.a.) dos genes colágeno tipo I (A), osteopontina (B) e PPAR-γ (C) das CTM-AD cultivadas em meio de diferenciação osteogênica e adipogênica. O RNA total das células foi obtido após 3 (D3) e 15 dias (D15) do início da indução da diferenciação. A expressão dos genes alvos foi normalizada com a expressão de GAPDH. As células não-induzidas (mantidas em meio de cultivo), nos respectivos tempos, foram utilizadas como amostra calibradora (valor = 1). Valores expressos em média e desvio padrão do parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (n=6, em triplicata).

LISTA DE ABREVIATURAS

CTM - células-tronco mesenquimais

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

UFC-F - unidade formadora de colônia fibroblastóide

FVE- fração vascular do estroma

ISCT – do inglês *International Society of Cell Therapy* (Sociedade Internacional de Terapia Celular)

CTM-MO - células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

CTM-AD - células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

IFATS – do inglês *International Federation for Adipose Therapeutics and Science* (Federação Internacional de Pesquisa e Terapia com Tecido Adiposo)

TNF - fator de necrose tumoral

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

IGF - fator semelhante à insulina

EGF - fator de crescimento epidérmico

IL - interleucina

IFN - interferon

IDO - indoleamina 2,3 dioxigenase

NO - óxido nítrico

SCNT - transferência nuclear de células somáticas

PBS - solução tampão salina-fosfato

PPAR - receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

OCN - osteocalcina

SSP1 - osteopontina

COL I - colágeno tipo 1

qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

C/EBP - proteína estimuladora de ligação a CCAAT

SFB - soro fetal bovino

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO 3

2 REVISÃO DE LITERATURA 5

2.1 Células-tronco 5

2.2 Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo 6

2.3 Medicina Regenerativa 9

2.4 CTM na espécie bovina 12

3 OBJETIVOS 14

4 MATERIAIS E MÉTODOS 15

4.1 Local 15

4.2 Animais 15

4.3 Reagentes 15

4.4 Delineamento 15

4.5 Colheita de Material 16

4.6 Isolamento e Cultivo Celular 17

4.7 Avaliação de UFC-F 18

4.8 Passagens 19

4.9 Caracterização 19

4.10 Diferenciações osteogênica e adipogênica 20

4.10.1 Preparo de células e indução da diferenciação 20

4.10.2 Avaliação microscópica 21

4.10.3 Avaliação da expressão gênica 21

4.11 Análise estatística 23

5 RESULTADOS 24

5.1 Morfologia 24

5.2 Avaliação de UFC-F 25

5.3 Caracterização 26

5.4 Diferenciação osteogênica e adipogênica 28

5.4.1 Avaliação microscópica 28

5.4.2 Análise da expressão gênica 29

6 DISCUSSÃO 31

7 CONCLUSÃO 37

8 REFERÊNCIAS 38

9 TRABALHO CIENTÍFICO 47

IKEDA, T.L. Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de bovinos. Botucatu, 2016. 54 páginas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

As células-tronco mesenquimais (CTM) representam uma atrativa ferramenta para a medicina regenerativa, a engenharia de tecidos e a terapia celular. Na espécie bovina, as pesquisas sobre a caracterização de CTM ainda são raras, principalmente utilizando-se o tecido adiposo como fonte de obtenção. Com o objetivo de isolar e caracterizar CTM derivadas do tecido adiposo de bovinos, foram utilizadas amostras de seis vacas e isoladas CTM por meio de digestão enzimática e cultivo celular em monocamada. As células em primeira (P0) e terceira passagem (P3) foram, então, submetidas a caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo. A diferenciação osteogênica e adipogênica foi avaliada microscopicamente após 10 dias de indução e por qPCR em tempo real após 3 e 15 dias de indução. Foram obtidas células fibroblastóides e aderentes ao plástico. Estas apresentaram, na citometria de fluxo, marcação positiva para CD44 (86,6 % em P0 e 76,6 % em P2) e vimentina (82,48 % em P2), baixa marcação de CD34 (8,7 % em P0 e 1,8 % em P2) e marcação negativa para MHC II (2,1 % em P0 e 2,3 % em P2). Na avaliação microscópica, todas as amostras responderam positivamente às diferenciações nas linhagens osteogênica e adipogênica, além de apresentarem expressão de osteopontina e colágeno tipo I e PPAR-γ, respectivamente, pelo qPCR em tempo real. Não foi observada a expressão de osteocalcina em nenhuma amostra submetida a indução osteogênica. Os resultados obtidos indicam o tecido adiposo de bovinos como uma fonte viável de CTM para medicina regenerativa e terapia celular.

Palavras-chave: vaca, marcadores de superfície celular, citometria de fluxo, potencial de diferenciação, expressão gênica

IKEDA, T.L. Isolation and characterization of bovine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. Botucatu, 2016. 54 páginas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Mesenchymal stem cells (MSC) are an interesting tool for regenerative medicine, tissue engineering and cell therapy. In bovine species, MSC are not well described. Therefore, the aim of this study was to isolate and characterize bovine MSC obtained from adipose tissue. Samples from six cows were used to isolate MSC by enzymatic digestion followed by monolayer culture. These cells were, then, submitted to immunophenotyping by flow cytometer at first (P0) and third (P2) passages. Osteogenic and adipogenic differentiation potential was evaluated microscopically after 10 days of induction and by Real Time qPCR after 3 and 15 days of induction. Cells showed plastic-adherent characteristic and fibroblastoid morphology. They expressed CD 34 (8,7 % at P0 e 1,8 % at P2), CD44 (86,6 % at P0 e 76,6 % at P2)and vimentin (82,48 % at P2) and did not express MHC II (2,1 % at P0 e 2,3 % at P2). All samples showed potential to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages and expressed osteopontin and collagen type I and PPAR-γ, respectively. Osteocalcin was not expressed in any sample. Our results shows the possibility of using bovine adipose tissue as a source of MSC for regenerative medicine and cell therapy.

Key words: cow, surface makers, flow cytometer, differentiation potential, gene expression

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco são consideradas uma grande promessa na terapia celular, medicina regenerativa e engenharia de tecidos (FIGUEROA; KOCH; BETTS, 2011). Essas células apresentam capacidade de autorrenovação e de diferenciação em outras linhagens celulares, sendo responsáveis por substituir células danificadas ou mortas (BUNNEL et. al, 2008; FIGUEROA; KOCH; BETTS, 2011). Além disso, as células-tronco secretam fatores parácrinos que ajudam na reparação de tecidos feridos (FIGUEROA; KOCH; BETTS, 2011) e sua propriedade imunomoduladora torna-as atrativas para o tratamento de doenças autoimunes e no auxílio contra a rejeição de tecidos e/ou órgãos transplantados (SENSEBÉ et al., 2010; SHI; LIU; WANG, 2011).

Atualmente, os mecanismos biológicos pelos quais as CTM atuam durante o processo inflamatório ou de reparação tecidual são foco de extensa pesquisa. O melhor conhecimento da biologia e do comportamento dessas células nas diversas espécies não apenas favorece seu uso como ferramenta terapêutica na medicina veterinária, como também representa uma importante etapa para testes pré-clinicos de distúrbios em humanos. Tradicionalmente, utiliza-se a espécie murina como modelo experimental, entretanto, o uso de animais de grande porte filogeneticamente mais próximos aos humanos tornou-se cada vez mais interessante (BERNARDO; PAGLIARA; LOCATELLI, 2012). O emprego desses animais torna-se atrativo principalmente em pesquisas de longa duração, pois, além de apresentarem similaridades em fisiologia e tamanho de órgãos com humanos, possuem uma expectativa de vida maior que os animais de laboratório tradicionalmente utilizados (PATTERSON-KANE; BECKER; RICH, 2012).

O bovino é um importante animal de produção e com alto impacto econômico. Problemas reprodutivos e musculoesqueléticos, como baixa fertilidade, mastite e doenças articulares, resultam em prejuízos na indústria leiteira e de carne (HERATH, et al., 2006; BARBOSA et al., 2014). Neste contexto, as CTM podem ser consideradas uma alternativa para o tratamento dessas enfermidades, melhorando a produção e diminuindo o descarte de

animais. Além disso, as CTM podem ser empregadas para aumentar a eficiência de biotécnicas ligadas a reprodução animal como produção *in vitro* de embriões e transferência nuclear de células somáticas (SCNT – KUMAR et al., 2007).

Apesar de sua importância como modelo experimental *in vivo* e de ser uma promissora ferramenta terapêutica, pouco se conhece sobre as características biológicas das células-tronco na espécie bovina. Por esta razão, esse experimento teve como principal objetivo avaliar o comportamento das CTM bovinas provenientes do tecido adiposo, visando empregá-las futuramente no tratamento de distúrbios reprodutivos e musculoesqueléticos em bovinos, bem como utilizar essas células como modelo experimental para doenças de outros animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células-tronco

As células-tronco podem ser isoladas tanto na fase embrionária e fetal quanto na fase adulta e, de acordo com sua capacidade de diferenciação, podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. As células totipotentes são capazes de formar todas as células diferenciadas presentes em um organismo, incluindo as células dos anexos fetais, e essa característica é apenas observada em zigotos. A partir da massa celular interna do blastocisto, é possível isolar células que apresentam pluripotência, ou seja, possuem a habilidade de se diferenciar nas células dos três folhetos germinativos: ectoderme, mesoderme e endoderme (FIGUEROA; KOCH; BETTS, 2011). Por sua vez, as células multipotentes apresentam uma ampla capacidade de diferenciação, porém mais restrita quando comparadas com células-tronco embrionárias, e podem ser encontradas em tecidos adultos e fetais (BUNNEL et al*.,* 2008; CASADO-DIAZ; PÉREZ; QUESADA-GÓMEZ, 2011; FIGUEROA; KOCH; BETTS, 2011).

Friedenstein *et al.* (1960) foram os primeiros a observar que células presentes na medula óssea eram capazes de formar tecidos mesenquimais (cartilagem e osso). Esse grupo de células foi denominado, primeiramente, de unidade formadora de colônia fibroblástica (UFC-F). Atualmente, se aceita a nomenclatura de células-tronco mesenquimais (CTM) ou células multipotentes do estroma mesenquimal (DOMINICI et al*.*, 2006; OH; CHOO, 2011).

As CTM constituem uma população heterogênea de células estromais não-hematopoiéticas que podem se diferenciar e contribuir para a regeneração dos tecidos mesenquimais (HOWITZ et al., 2005; CHAMBERLAIN et al., 2007). Essas células, embora não imortais, são capazes de expandir diversas vezes em cultivo *in vitro* sem que ocorram alterações na taxa de crescimento e capacidade de diferenciação (CHAMBERLAIN et al, 2007; OH; CHOO, 2011). As CTM tem despertado grande interesse da comunidade médica, pois apresentam disponibilidade e fácil obtenção em diversos tecidos adultos;

isolamento e expansão *in vitro* em escalas clínicas dentro de um tempo relativamente curto; possibilidade de ser biopreservadas sem perda de sua capacidade terapêutica; e atividade imunomoduladora (CASADO-DIAZ; PÉREZ; QUESADA-GÓMEZ, 2011; SERAKINCI; FAHRIOGLU; CHRISTENSEN, 2014)

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) descreve as CTM isoladas da medula óssea e outros tecidos como células plástico-aderentes, capazes de se diferenciar nas três linhas mesenquimais (osso, cartilagem e gordura) e que expressam os marcadores de superfície CD 105, CD 73 e CD90 e não expressam CD 45, CD 34, CD 14 (ou CD 11b), CD 79 α (ou CD 19) e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006). A expressão dos marcadores de superfície de CTM, entretanto, pode variar tanto com a espécie quanto com o tecido isolado (CHAMBERLAIN et al., 2007; LIU et al., 2007).

2.2 Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

O tecido adiposo é um tecido conjuntivo bem vascularizado, derivado do folheto mesenquimal e localizado no subcutâneo, ao redor de órgãos internos, na medula óssea e no tecido mamário. Tem, como função, proteger ou amortecer o organismo de lesões mecânicas, servir de isolante térmico e atuar como reserva energética. Recentemente, foi reconhecido como um dos principais órgãos endócrinos, produzindo hormônios como leptina, estrógeno, resistina e citocina TNF-α (Fator de Necrose Tumoral) (KOKAI; MARRA; RUBIN, 2014; LU et al., 2014). É composto por adipócitos e uma população heterogênea de células que os circundam, servindo-lhes de suporte (LINDROOS; SUURONEN; MIETTINE, 2011). O conjunto dessas células é chamado de fração vascular do estroma (FVE) e é consituído por pré-adipócitos, células-tronco multipotentes, células endoteliais e murais, fibroblastos e células sanguíneas (ETO et al., 2009; KOKAI; MARRA; RUBIN, 2014), podendo ser facilmente isolado (IZADPANAH et al., 2006).

CTM semelhantes àquelas provenientes da medula óssea podem ser isoladas do tecido adiposo (IM; SHIN; LEE, 2005; REN et al., 2012). Zuk *et al.*

(2002) foram os primeiros a identificarem, em humanos, que células fibroblastóides isoladas de aspirados de gordura possuíam a capacidade de se diferenciar em células dos tecidos adiposo, cartilaginoso, ósseo e muscular sob condições apropriadas de cultivo *in vitro* (IM; SHIN; LEE, 2005).

Desde então, o interesse, na medicina, pelas CTM presentes no tecido adiposo aumentou, intensificando o número de pesquisas na área para melhor caracterizar a população de células do tecido adiposo e identificar a subpopulação com o melhor potencial terapêutico (BOURIN et al., 2013; NAGATA; MITSUMORI; IWAGURO, 2013). As CTM podem ser isoladas pela digestão enzimática do tecido adiposo e separadas dos adipócitos flutuantes por centrifugação. Após o processamento do tecido adiposo, pode-se obter uma população mais homogênea pelo cultivo *in vitro*, sob condições que estimulam o crescimento de CTM (STREM et al., 2005; NAGATA; MITSUMORI; IWAGURO, 2013). Dessa forma, é possível isolar células plástico-aderentes de caráter fibroblastóide, denominadas de células-tronco estromais derivadas do tecido adiposo (CTM-AD) (BOURIN et al*.,* 2013).

CTM-AD são similares as CTM derivadas da medula óssea (CTM-MO), apresentando expressão semelhante de marcadores de superfície e capacidade de se diferenciar em outros tecidos. De acordo com a declaração conjunta da Federação Internacional de Terapêutica e Ciência do Tecido Adiposo (IFATS) e a ISCT, pode-se identificar fenotipicamente o conjunto de células da FVE, ao qual pertencem as CTM-AD , por seus marcadores de superfície: CD 45-, CD235a-, CD31-, CD34+ (BOURIN et al., 2013). Em cultura, CTM-AD expressam de forma consistente os marcadores CD13, CD29, CD73, CD90, CD133, MHC I e MHC II, sendo comum a expressão dos marcadores CD90, CD73, CD105 e CD44 com outras CTM. , Além disso, este tipo celular não expressam os marcadores CD45, CD31 e MHC II (LINDROOS; SUURONEN; MIETTINE, 2011; BOURIN et al., 2013). Elas podem ainda ser distinguidas das CTM-MO por expressarem CD36 e não expressarem CD106 (BOURIN et al*.,* 2013).

De Ugarte *et al.* (2003), examinando o fenótipo de superfície de CTM derivadas da medula óssea e tecido adiposo em humanos, observaram diferente expressão de marcadores relacionados com a função de migração

para o tecido de origem (*homing*) e de mobilização de células hematopoiéticas, tais como CD 49d, CD 106, CD 54, CD 34 e CD 44. Como hipótese, formulou-se que as CTM-AD representam uma população de CTM periféricas e que, devido sua expressão distinta de moléculas de adesão, possuem propriedades de migração diferentes das CTM-MO, o que acarretaria importantes implicações na terapia celular.

A expressão dos marcadores de superfície ainda pode variar durante o cultivo e número de passagens das células. Por exemplo, o nível de expressão dos marcadores CD29, CD44, CD73, CD90 e CD166 aumenta até a segunda passagem, quando ocorre estabilidade de expressão em um alto nível. O contrário ocorre com os marcadores de células hematopoiéticas, no qual a expressão diminuiu ou é perdida conforme são realizadas as passagens (MITCHELL et al., 2006; LINDROOS; SUURONEN; MIETTINE, 2011).

As CTM-AD, quando cultivadas em meio contendo os fatores de indução adequados, são capazes de se diferenciar em células da mesoderme como adipócitos, fibroblastos, miócitos, osteócitos e condrócitos. Esse processo é denominado diferenciação linhagem-específica (LIN et al., 2008). Além disso, pesquisas básicas e pré-clínicas revelaram que as CTM-AD possuem o potencial de se diferenciarem em células originadas da endoderme e ectoderme, como neurônios, células endócrinas do pâncreas, hepatócitos, células endoteliais e cardiomiócitos (SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007; MIZUNO; TOBITA; UYSAL, 2012).

A capacidade de diferenciação das CTM-AD pode ser comparada a das CTM-MO e diversos estudos demonstraram que CTM-AD e CTM-MO possuem propriedades funcionais muito similares, porém nem sempre idênticas (STREM et al., 2005). Im *et al.* (2005) observaram que o tecido adiposo, em humanos, apresenta uma menor habilidade de diferenciação osteogênica e condrogênica quando comparado à medula óssea, sugerindo um limitado emprego de CTM-AD na engenharia de tecidos para lesões ósseas e cartilaginosas. Resultado semelhante foi observado por Liu *et al*. (2007) em estudo com CTM humanas, no qual também foi demonstrado que CTM-AD se diferenciam melhor em adipócitos. De acordo com os autores, essas diferenças, entretanto, podem não estar relacionadas com características inerentes às CTM de ambas as fontes. Considerando que a fração estromal dessas é composta por uma

população heterogênea de células tronco multipotentes e células progenitoras, pode-se supor que culturas de CTM-MO possuam uma maior predominância de progenitores osteogênicos e condrogênicos, enquanto que as culturas de CTM-AD são compostas principalmente por progenitores adipogênicos. Além dos diferentes microambientes ou “nichos” nos quais essas células residem em seus respectivos tecidos de origem, as diferenças entre CTM-AD e CTM-MO podem também estar relacionadas com os diferentes protocolos utilizados para sua expansão *ex vivo* (BOURIN et al*.,* 2013).

Outras vantagens apresentadas pelo tecido adiposo são a obtenção de grandes volumes de tecido com baixa taxa de morbidade do local doador ou desconforto do paciente, a alta concentração de CTM por coleta e a alta taxa de expansão e proliferação dessas células em cultivo *in vitro* (REN et al*.*, 2012; BURK et al*.*, 2013; NAGATA; MITSUMORI; IWAGURO, 2013). Strem *et al.* (2005) relataram que a concentração média de CTM-AD é de aproximadamente 5000 UFC-F por grama de tecido adiposo, enquanto estima-se que aproximadamente 100 – 1000 UFC-F sejam obtidas por mililitro de medula óssea. Sugere-se ainda que a frequência média de CTM-AD por lipoaspirado processado seja igual a 2% das células nucleadas. A alta concentração de células disponíveis e viáveis permite a aplicação clínica de um número adequado de células sem a necessidade de prévia expansão em cultivo *in vitro* (BURK et al, 2013; KOKAI; MARRA; RUBIN, 2014) e a alta disponibilidade de CTM também favorece a criopreservação destas (BURK et al, 2013).

2.3 Medicina Regenerativa

A capacidade de se diferenciar em outros tecidos e a possibilidade de enxerto a longo prazo foram inicialmente o principal interesse em utilizar as CTM na medicina regenerativa, visando principalmente os distúrbios ósseos e cartilaginosos. Entretanto, acredita-se que essas características possuem uma função relativamente pequena na atividade terapêutica das CTM pois há indícios que essas células possuem uma baixa capacidade de permanência no

local desejado no organismo do receptor (VON BAHR et al., 2012). Atualmente, atribui-se o principal potencial terapêutico das CTM na regeneração e proteção de tecidos a ação de fatores solúveis sintetizados por estas células, sua propriedade de migração para tecidos lesionados e atividade imunomoduladora (KIM *et al.*, 2009; BERNARDO; PAGLIARA; LOCATELLI, 2012; VON BAHR et al*.,* 2012).

As CTM atuam tanto pelo contato intercelular, assimcomo via fatores solúveis, influenciando diretamente ou indiretamente o microambiente local. Entre os fatores secretados pelas CTM, pode-se citar fatores de crescimentos como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento similar à insulina tipo 1 (IGF-1) e fator de crescimento epidérmico (EGF), além de citocinas, proteases da matriz extracelular, hormônios e mediadores de lipídios. Muitas dessas proteínas auxiliam na regeneração de tecidos lesionados, sendo capazes de induzir a proliferação celular e angiogênese; reduzir a inflamação e formação de tecido granular; recrutar macrófagos para o local lesionado, auxiliando na remoção de debris celulares da lesão; e reverter a apoptose em células expostas a hipóxia, radiação e lesões químicas e mecânicas (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013; KOKAI, MARRA; RUBIN, 2014; FARINAZZO et al., 2015).

Para que o emprego das CTM como ferramenta terapêutica seja considerado eficiente e confiável é necessário que essas células possuam uma habilidade intrínseca em migrar para tecidos inflamados ou isquêmicos. As CTM possuem a capacidade de liberar mediadores em níveis suficientes na circulação sistêmica e alguns autores defendem a hipótese que a presença dessas células são desnecessárias e que apenas a aplicação do meio no qual as CTM foram cultivadas, denominado de meio condicionado, ou de seus componentes é suficiente para se beneficiar da atividade terapêutica das CTM. Entretanto, a meia-vida da maioria das citocinas secretadas é relativamente curta e suas ações, consequentemente, permanecem limitadas ao tecido onde foram liberadas. Dessa forma, acredita-se que a capacidade de migração aumentaria a eficácia da utilização clinica das CTM (KAVANAGH; ROBINSON; KALIA, 2014).

Pouco se conhece sobre os mecanismos utilizados pelas CTM para migrar ao local lesionado. Já foi demostrado que as CTM expressam diversas moléculas de adesão em comum com leucócitos, como L-selectina, CD44, CD24, CD49a-f, CD29 e CD18. Acredita-se que essas proteínas presentes na superfície celular das CTM interajam com citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento liberados durante a inflamação (CHAMBERLAIN et al., 2007; BERNARDO; PAGLIARA; LOCATELLI, 2012) em um processo similar ao da migração transendotelial de linfócitos e células progenitoras hematopoéticas, presentes na circulação sanguínea (RÜSTER et al., 2006).

A ação imunomoduladora das CTM tem sido alvo de grande interesse da comunidade médica e diversos testes pré-clínicos utilizam as CTM para o controle de doenças autoimunes ou degenerativas, visando principalmente as propriedades anti-inflamatórias dessas células. As CTM agem tanto sobre a imunidade adaptativa quanto inata, sendo capazes de inibir a proliferação de linfócitos T e B bem como inibir a maturação de monócitos e regulam a atividade de células dendríticas. Além disso, as CTM possuem a capacidade de diminuir a produção de citocinas pró- inflamatórias, como interleucina (IL) -2, IL-6, IL- 17, IFN- γ e TNF-α, e de estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4 (revisado por BEN-AMI; BERRIH-AKNIN; MILLER, 2011). Em estudo realizado por Larocca *et al.* (2013) com CTM-AD humanas, estas foram capazes de inibir a proliferação de células T CD4+ *naive*, restringir a polarização das subpopulações de células Th-1 e Th-17 refletindo na diminuição da produção de IFN-γ e IL-17.

Embora exista um grande número de estudos demostrando a atividade imunossupressora das CTM, os mecanismos envolvidos ainda são parcialmente conhecidos (BEN-AMI; BERRIH-AKNIN; MILLER, 2011). As CTM atuam sobre o sistema imune provavelmente pela liberação de diversas moléculas, como prostaglandina E2, IL-6, IL-10, indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), óxido nitrico (NO), entre outros (revisado por SHI; LIU; WANG, 2012). A habilidade imunossupressora das CTM, entretanto, não é inata e depende da indução por citocinas pró-inflamatórias (REN et al., 2008; MOHAMMADPOUR et al.,2015)

2.4 CTM na espécie bovina

Além de possuir importância econômica, o bovino pode ser considerado um atrativo modelo experimental para a pesquisa nas áreas de biotecnologia e biomedicina. Apresentam como vantagem o fácil manejo e a facilidade de obtenção de amostras a partir de abatedouros. Além disso, possuem similaridades fisiológicas e patológicas com os humanos, principalmente no sistema reprodutivo e, em menor extensão, no sistema musculoesquelético (HERATH et al., 2006; BAHR; WOLF, 2012; ROSSI et al., 2014). A espécie bovina também deve ser considerada como uma possível alternativa para pesquisas relacionadas a distúrbios imunológicos. Frequentemente utilizam-se ratos e camundongos como modelos experimentais, entretanto foi observado que estas espécies apresentam mecanismos imunossupressores diferentes aos humanos (REN et al., 2009; SU et al., 2014).

As áreas nas quais as CTM podem ser aplicadas na espécie bovina são extensas, abrangendo desde o tratamento de disturbios articulares e reprodutivos até o emprego dessas células em biotecnologias da reprodução como a transferência nuclear de células somáticas (SCNT). As pesquisas com CTM bovinas, entretanto, ainda são recentes e apresentam resultados contraditórios principalmente em relação a caracterização imunofenotípica dessas células. Até o presente momento, a maioria dos estudos focam no isolamento e caracterização de CTM derivadas de anexos fetais, como membrana amniótica e fluído amniótico (CORRADETI et al., 2013; GAO et al., 2014; ROSSI et al., 2014), saco vitelínico (MANÇANARES et al., 2015), sangue do cordão umbilical (RAOUFI et al., 2011) e gelatina de Wharton (CARDOSO et al., 2012, XIONG et al., 2014; CARDOSO et al., 2016; LANGE-CONSIGLIO et al., 2016), ou de órgãos provenientes de fetos (DUEÑAS et al., 2014; LU et al., 2014). As CTM derivadas de tecidos fetais apresentam, como vantagem, alta habilidade proliferativa e senescência tardia, além de expressar marcadores de pluripotência, como OCT4, NANOG e SOX2, o que pode indicar uma maior capacidade de diferenciação em outras linhagens celulares (ROSSI et al., 2014; DUEÑAS et al., 2014).

Entre os tecidos adultos, CTM bovinas foram isoladas da medula óssea (BOSNAKOVSKI et al., 2004; BOSNAKOVSKI et al., 2005; MAUCK, YUAN & TUAN, 2006) e tecido adiposo (ZHAO; WALDMAN; FLYNN, 2012; RESHAK; SHAHIMIN; BUANG., 2013; LU et al., 2014; SAMPAIO et al., 2015). Zhao, Wildman e Flynn (2012) foram capazes de isolar CTM derivadas da gordura interdigital e avaliaram principalmente o efeito do cultivo *in vitro* prolongado sobre a diferenciação dessas células. No ano seguinte, Reshak, Shahimin e Buang (2013) relataram o isolamento e cultivo inicial de CTM-AD a partir do tecido adiposo visceral, porém os autores não avaliaram o potencial de a diferenciação nas três linhagens mesenquimais dessas células. Nenhum desses estudos citados, entretanto, realizaram análises de caracterização das proteínas presentes na membrana plasmática das CTM-AD.

Lu *et al.* (2014) isolaram CTM-AD de bovinos com dois anos de idade e observaram expressão de β-integrina, CD44 e CD73 e ausência de expressão de CD34. As CTM-AD isoladas mostraram-se capazes de se expandirem até 25 passagens sem sofrer alterações morfológicas, além de responderem efetivamente as induções de diferenciação osteogênica e adipogênica. Sampaio *et al*. (2015), por sua vez, foram capazes de demostrar a habilidade das CTM-AD em se diferenciar na linhagem condrogênica e expressar os marcadores CD105, CD90 e CD73 e não expressar CD34, CD45 e CD79.

Embora esses estudos tenham demostrado a capacidade de diferenciação das CTM-AD de forma consistente e similar a CTM derivadas de outras fontes e espécies, os resultados obtidos referentes a expressão gênica dessas análises não avalia as alterações temporais da expressão dos genes envolvidos na diferenciação celular. Além do mais, nenhum estudo foi realizado com CTM-AD bovinas avaliando o efeito da expansão *in vitro* inicial sobre o perfil imunofenotípico dessas células. Dessa forma, as análises realizadas neste experimento buscaram preencher lacunas ainda presentes sobre o compartamento das CTM-AD bovinas quando cultivadas *in vitro*, visando obter resultados para colaborar e complementar os dados já existentes na literatura atual.

3 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos:

1) Estudar o isolamento e observar o comportamento das CTM-AD bovinasdurante o cultivo *in vitro.*
2) Avaliar a expressão dos marcadores de superfície CD44, CD34 e MHC classe II, bem como o marcador intracelular vimentina.
3) Avaliar o potencial de diferenciação das CTM-AD em células da linhagem osteogênica e adipogênica.
4) Avaliar a expressão de genes relacionados com a diferenciação osteogênica (colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina) e adipogênica (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma – PPAR-γ).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. As análises de expressão gênica foram realizadas no Centro de Diagnóstico e Pesquisa de Doenças Moleculares, localizado na Universidade Federal de São Paulo – São Paulo.

4.2 Animais

Foram utilizadas seis vacas da Fazenda Marino, localizada no município de Avaré, São Paulo, Brasil. Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comissão de Ética da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu, sob o número de protocolo 151/2014.

4.3 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no presente estudo foram de alto grau de pureza e obtidos nas empresas Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e Sigma (St. Louis, MO, EUA), quando não foram citados.

4.4 Delineamento

As CTM bovinas foram isoladas do tecido adiposo subcutâneo e submetidas ao cultivo in vitro. A avaliação de unidades formadoras de colônia fibroblástica foi realizada logo após o isolamento das células, sendo dividido em três grupos de acordo com a densidade celular inicial empregada (grupos 500, 750 e 1000). A caracterização imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo durante a primeira (grupo P0) e terceira passagem (grupo P2). No momento da terceira passagem, as células foram também submetidas aos testes de diferenciação osteogênica e adipogênica. Para avaliação da

expressão de genes relacionados com as diferenciações, o RNA total foi extraído das células incubadas em meio indutor após 3 e 15 dias de cultivo (Figura 1).

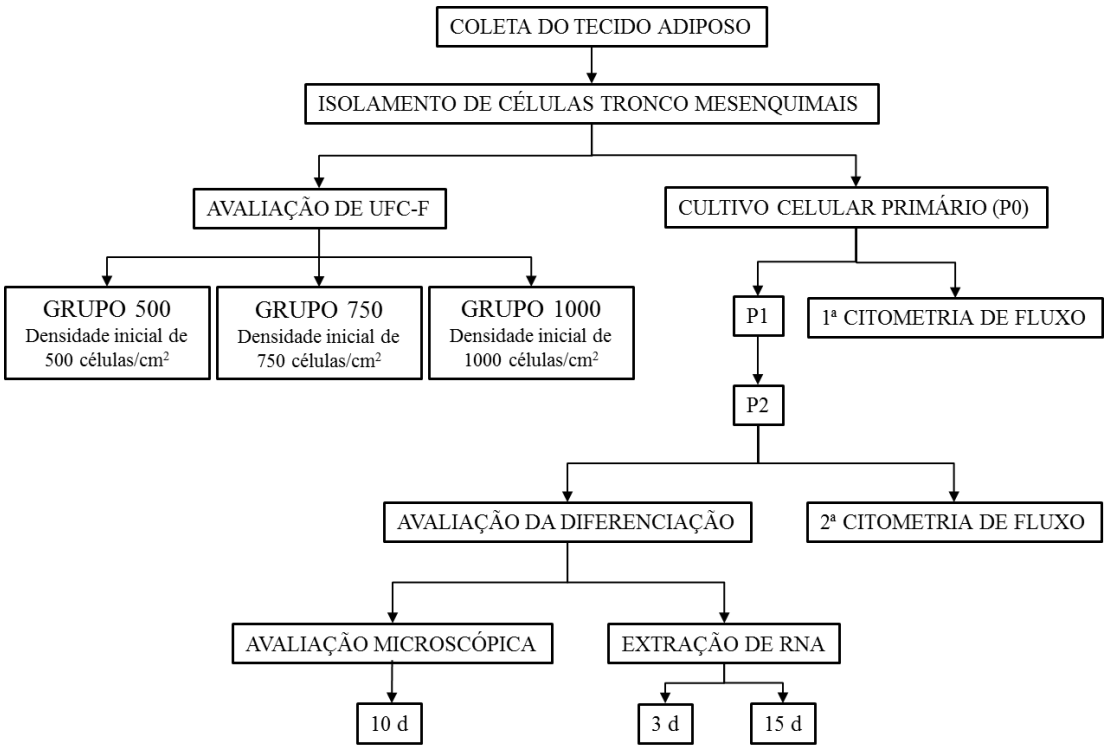


FIGURA 1. Delineamento experimental

4.5 Colheita de Material

O local escolhido para a obtenção das amostras foi a região lateral a base de cauda. Para isso, foi utilizado bloqueio anestésico infiltrativo em retângulo e foi realizada incisão de aproximadamente 4 cm paralelamente a medula espinhal e isolada a camada de tecido adiposo entre a pele e a musculatura (Figura 2). O tecido adiposo colhido foi armazenado em tubos cônicos de 50 mL contendo solução tampão salina-fosfato (PBS) com 1% de penicilina/estreptomicina e amicacina (22µg/mL).

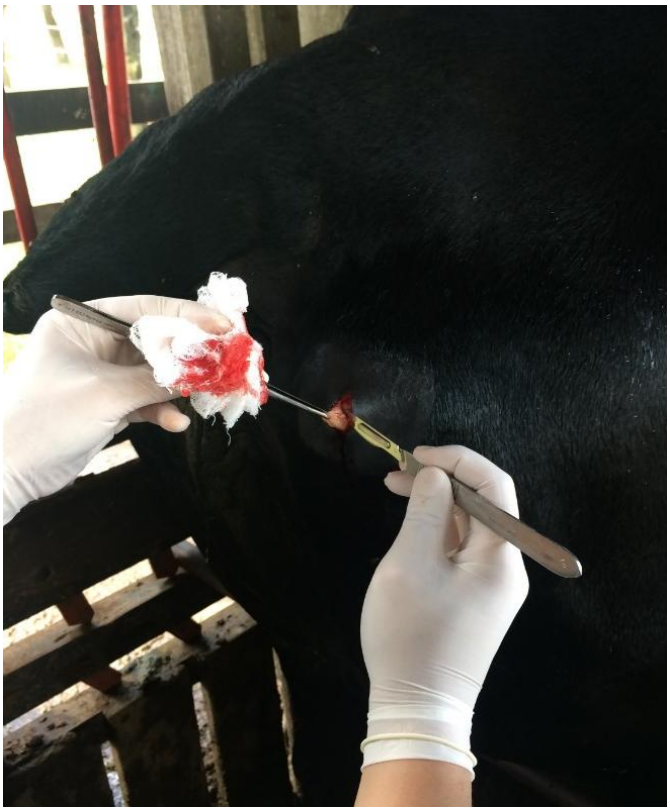


FIGURA 2. Coleta de tecido adiposo subcutâneo

4.6 Isolamento e Cultivo Celular

No laboratório, as amostras foram lavadas em PBS acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina e amicacina (22 µg/mL) e fragmentadas com auxílio de bisturi e pinça anatômica (Figura 3. A e B). As amostras foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL e adicionou-se solução de 0,04% de colagenase tipo 1 (cod. C0130, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na proporção de 10 mL/g de amostra. A digestão enzimática foi realizada por 30 minutos em banho seco a 37°C. Durante este período as amostras foram agitadas em vórtex a cada 5 minutos.

Após a digestão, foram acrescidos 5mL de meio de cultivo composto por DMEM baixa glicose/F12 (1:1), 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1,2% de anfotericina B e amicacina (11µg/mL) para bloqueio da colagenase. A porção líquida foi aspirada e transferida para outro

tubo cônico, evitando-se os fragmentos teciduais maiores. As amostras foram centrifugadas a 500 x g por 6 minutos e o *pellet* obtido foi desfeito de forma vigorosa com o auxílio de pipeta de 1 mL para que ocorresse separação da FVE dos adipócitos. As amostras foram lavadas a 500 x g por 6 minutos, por duas vezes, para total remoção da solução de colagenase. O *pellet* celular final foi ressuspendido em meio de cultivo e filtrado em membrana de 70 µm (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). O cultivo foi realizado em garrafas plásticas (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) a 37,5°C em atmosfera com 90% de umidade e 5% de CO_2. A primeira troca do meio de cultivo foi realizada após 72 horas e, então, a cada 48 horas até alcançar confluência de 80%.

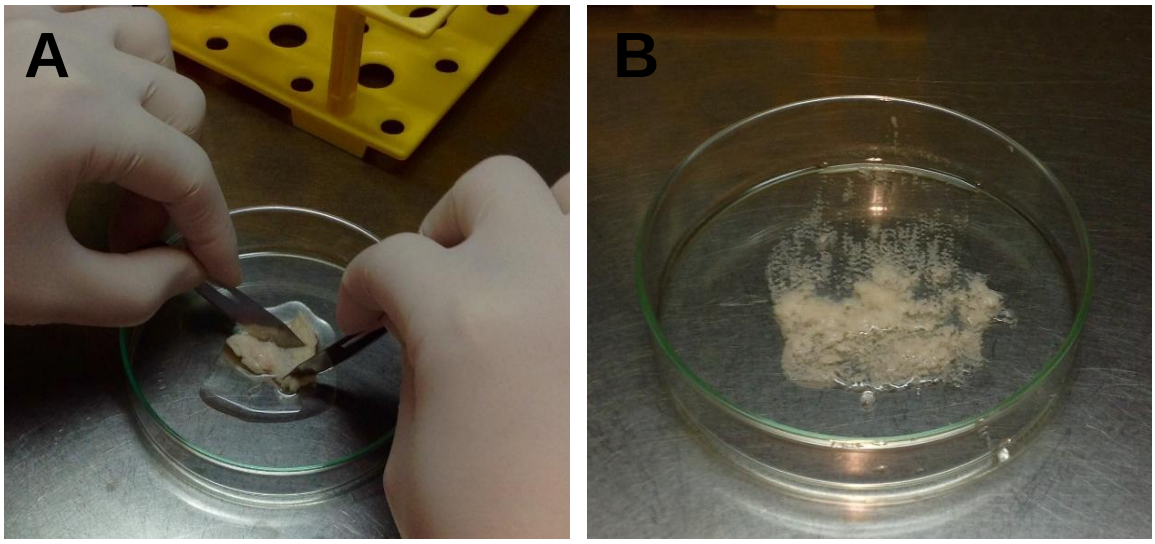


FIGURA 3. Fracionamento da amostra de tecido adiposo (A) para facilitar a digestão enzimática. (B) Amostra pós-fracionamento

4.7 Avaliação de UFC-F

Células provenientes da FVE foram transferidas para placas de 6 poços (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), divididas em grupos de acordo com as diferentes densidades (500, 750 e 1000 células/cm^2) e incubadas em meio de cultivo, por 10 dias, a 37,5°C em atmosfera com 90% de umidade e 5% de CO_2. A avaliação de UFC-F foi realizada em duplicatas. Após esse período, as

monocamadas de células foram lavadas com PBS e coradas com solução de 1% cristal violeta em metanol. Colônias formadas com mais de 20 células foram contadas sob microscopia de luz invertida (modelo DMI RB, Leica, Alemanha). A eficiência da formação de UFC-F foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Eficiência } (\%) = \left(\frac{\text{número de colônias}}{\text{número inicial de células}}\right) \times 100$$

4.8 Passagens

Após atingirem confluência de 80%, foi realizado o desprendimento das células das garrafas de cultura com o emprego de solução de tripsina-EDTA 0,05%. As células recuperadas foram centrifugadas a 600 x g por 8 minutos, ressuspendidas em meio de cultivo e submetidas novamente a centrifugação para remoção da tripsina. Antes de serem transferidas para nova garrafa, foi realizada a concentração e viabilidade celular na câmara de Neubauer, utilizando-se o corante de exclusão (azul de tripan). Foi realizada a contagem nos quatro quadrantes da extremidade da câmara de Neubauer, de forma que a diferença no número de células, em cada hemicamara, não ultrapassasse 10%. Calculou-se o número de células/mL de acordo com a fórmula abaixo. Este procedimento foi repetido em todas as passagens.

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{média núm de células}}{\text{núm quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

4.9 Caracterização

A caracterização imunofenotípica das CTM foi realizada por citometria de fluxo, utilizando-se os marcadores relacionados com a linhagem mesenquimal CD44 e vimentina, o marcador hematopoiético CD34 e o

marcador MHC II. A citometria de fluxo para os marcadores CD44, CD34 e MHC II foi realizada no momento da primeira (grupo P0) e terceira passagem (grupo P2). Foram utilizados anticorpos bovinos para os marcadores das proteínas de superfície celular CD34:FITC (policlonal, orb247244, Biorbyt, EUA) e CD44:FITC (clone IL-A118, MCA2433F, AbD Serotec, Reino Unido). A marcação de MHC II:FITC (clone CVS20, MCA1085F, AbD Serotec, Reino Unido) foi baseada em reações cruzadas com utilização de anticorpos eqinos com os antígenos de superfície bovinos.

A marcação por vimentina (clone V9, MCA862, AbD Serotec-Rad, Reino Unido) foi realizada somente nas células da terceira passagem para confirmar a linhagem mesenquimal destas. Para tanto, as células foram fixadas em paraformol tamponado 10% e permeabilizadas com solução 0,01% de triton X-100 em PBS. O anticorpo primário anti-vimentina foi detectado por meio da incubação com o anticorpo secundário anti-*goat*:FITC (ab7064, abcam, EUA).

Foi utilizado o protocolo padrão sugerido pelo fabricante para cada um dos anticorpos. Todas as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) e analisados no programa FACSDiva (BD, EUA). Durante a análise foram contadas 10.000 eventos e valores menores que 3% foram considerados marcação ausente.

4.10 Diferenciações osteogênica e adipogênica

4.10.1 Preparo de células e indução da diferenciação

Para os testes de diferenciação osteogênica e adipogênica, utilizou-se células de terceira passagem cultivadas em placas de 24 poços (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), para análise histológica, e 6 poços (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), para análise da expressão gênica. Foi utilizada a densidade de 2,5 x 10^3 células/cm^2 para diferenciação osteogênica e de 5 x 10^3 células/cm^2 para diferenciação adipogênica. As células foram primeiramente mantidas em meio de cultivo e incubadas a 37,5°C em atmosfera com 90% de umidade e 5% de CO_2. Após 72h, o meio de cultivo foi substituído pelos

respectivos meios de indução de diferenciação (StemPro Osteogenesis e StemPro Adipogenesis- Gibco, EUA).

4.10.2 Avaliação microscópica

As diferenciações osteogênica e adipogênica foram analisadas após 10 dias de cultivo em meio indutor. Após esse período, as amostras contidas nas placas foram fixadas em formol tamponado a 10% por 30 minutos a 4°C.

Para a avaliação da diferenciação osteogênica, as monocamadas foram cobertas com solução 2% de *Alizarin Red* em água destilada e pH 4,2 por 3 minutos e, então, lavadas quatro vezes em água ultrapura. As amostras foram analisadas sob microscopia de luz invertida (modelo DMI RB, Leica, Alemanha) para observação de depósitos da matriz de cálcio, corados em vermelho.

Para a diferenciação adipogênica, as monocamadas foram coradas com *Oil Red O* por 20 minutos, seguido de lavagem com água ultrapura e analisadas sob microscopia de luz invertida (modelo DMI RB, Leica, Alemanha) para observação de gotículas de lipídeo intracitoplasmático, corados em vermelho.

4.10.3 Avaliação da expressão gênica

A expressão dos genes relacionados com as diferenciações osteogênica e adipogênica foi analisada no terceiro (D3) e décimo quinto (D15) dia do cultivo em meio indutor de diferenciação. O RNA total foi isolado utilizando o kit de purificação de RNA total (Total RNA Purification kit, cat. 37500, Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Canadá) e tratado com DNase (RQ1, cat M6101, Promega, Madison, WI, EUA) para a remoção de possíveis contaminações por DNA genômico, de acordo com as instruções dos fabricantes. Após esse processo, o cDNA foi obtido a partir de 400 ng de RNA total utilizando o kit de transcrição reversa Impron II (cat A3802, Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante.

A análise da expressão gênica, por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) em tempo real, foi realizada no equipamento 7500

Standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se master mix GoTAq (cat A6001, Promega, Madison, WI, EUA) e concentração final de 5 mM de cada *primer*. As reações foram realizadas em triplicatas, sendo composta por um ciclo a 95^0 C por 5 minutos seguido por 40 ciclos a 95^0 C por 15 segundos e 60^0 C por 1 minuto.A expressão dos genes de interesse foi normalizada com os níveis de mRNA de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A expressão gênica das células cultivadas em meio indutor de diferenciação em relação às células não induzidas (incubadas em meio de cultivo) foi calculada com o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando o programa Applied Biosystems™ Analysis (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Amostras de tecidos provenientes de feto bovino (osso e gordura) foram utilizadas como controle positivo para a expressão dos genes ostepontina (SSP1), osteocalcina (OCN) e colágeno tipo I (COL I) para ostegênese e PPAR-γ para adipogênese. As sequências dos *primers* estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1. Sequência de oligonucleotídeos empregados na análise de qPCR

Gene	**Sequência (5' – 3')**	**Número de Acesso**
GAPDH	**For** AAGGTCGGAGTGAACGGATTC **Rev** ATTGATGGCGACGATGTCCA	NM_001034034.2
PPAR	**For** AAGAGCTGACCCGATGGTTG **Rev** GCTCCACTTTGATTGCACTTTG	NM_181024.2
SSP1	**For** CGCCCTTCCAGTTAAACCGA **Rev** TGCTTCTGAGATGGGTCAGG	NM_174187.2
Osteocalcina	**For** TAGCTGACCACATCGGCTTC **Rev** TTCTAGAGCAGCGGGGATGA	NM_174249.2
COL I	**For** TGCTGGCCAACCATGCCTCT **Rev** CGACATCATTGGATCCTTGCAG	NM_174520

4.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo Software R versão 3.3.2. (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Os resultados da avaliação de UFC-F, citometria de fluxo e expressão gênica foram submetidos primeiro ao teste de adesão à distribuição normal de Shapiro-Wilk e ao teste de Barlett. Posteriormente, optou-se uma abordagem não-paramétrica para a análise estatística dos dados obtidos. Foi utilizado o teste Wilcoxon para os dados de citometria de fluxo e expressão gênica. Para os dados de eficiênica de UFC-F, foi utilizado o teste de de U de Mann-Whitney. A probabilidade de $p \leq 0,05$ indica que houve diferença significativa, e probabilidade entre $p > 0,05$ e $\leq 0,1$ indica que a diferença aproximou-se de ser significativa (tendência).

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia

A adesão inicial de células à superfície plástica das garrafas de cultivo foi detectada entre 48 e 72 horas, as quais apresentaram morfologia fibroblastóide e presença de pequenos prolongamentos (Figura 4. A). Prestes a atingir 80% de confluencia, as células tornaram-se mais alongadas e organizavam-se em colônias (Figura 4. C e D). A presença das primeiras colônias com mais de 20 células foi observada após 120 horas.

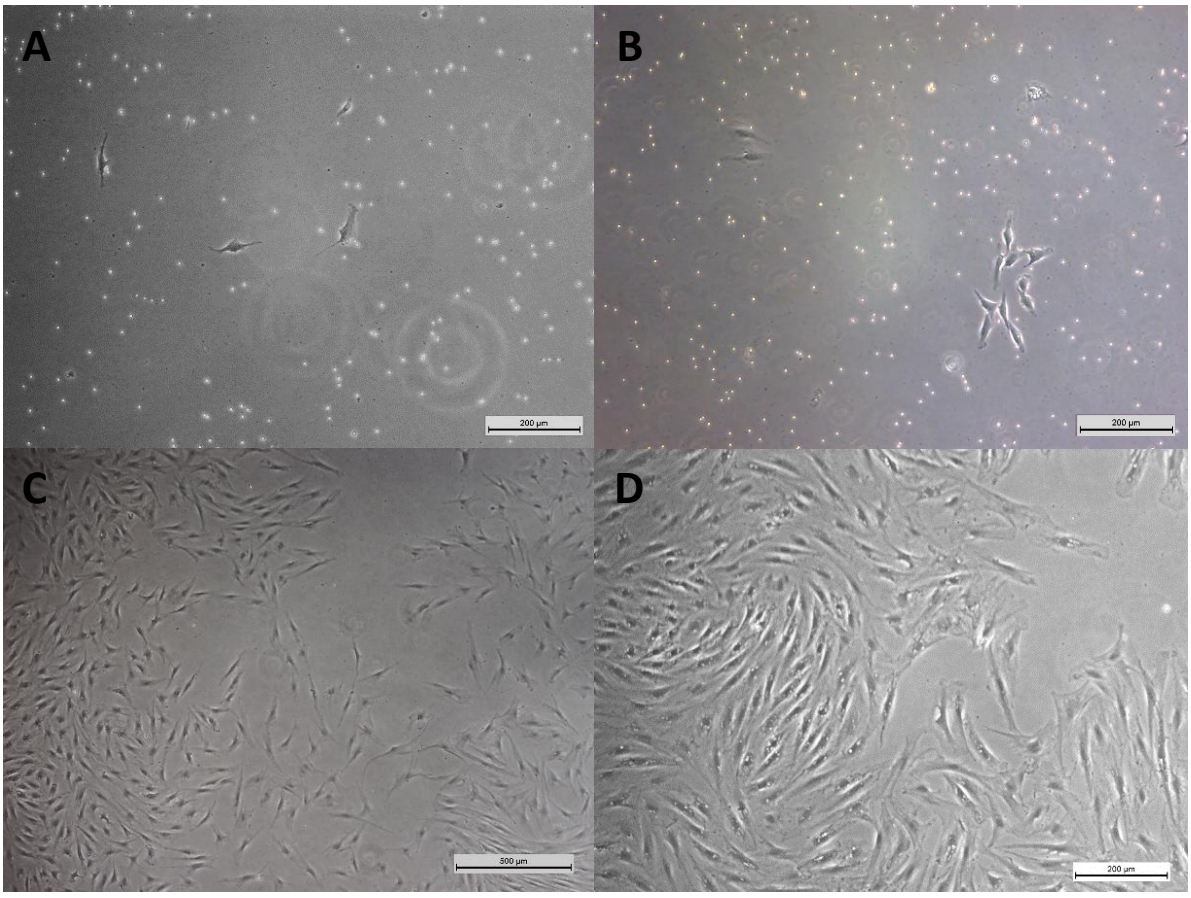


FIGURA 4. Morfologia das CTM-AD bovinas em cultivo primário: característica fibroblastóide das células com 72h (A) e 96h (B), no aumento de 100 X. Confluência de 80% obtida após aproximadamente 216h, no aumento de 100 X (C) e 200 X(D).

5.2 Avaliação de UFC-F

Após 14 dias de cultivo, não foi observado diferença estatisticamente significativa ($p>0.05$) na porcentagem de UFC-F obtidas entre os grupos quando utilizadas diferentes concentrações iniciais de células do FVE por cm^2 (Tabela 2). Foi possível observar dois tipos de colônias com características morfológicas distintas, cujas eficiências estão descritas na Tabela 3.

TABELA 2. Avaliação da eficiência de UFC-F. Número de UFC e valores de eficiência (%) estão descritos como média e desvio padrão

Densidade (células/cm2)	**Total de Células**	**Número de UFC**	**UFC (%)**
500	4500	10,67 ± 12,78	0,24 ± 0,30
750	6750	16,67 ± 16,46	0,25 ± 0,25
1000	9000	20,67 ± 19,68	0,23 ± 0,23

TABELA 3. Avaliação da eficiência de UFC-F de acordo com a morfologia. Valores descritos como média e desvio padrão

Densidade (células/cm2)	**Total de Células**	**% CFU (densas)**	**% CFU (dispersas)**	**Valor de P**
500	4500	0,20 ± 0,25	0,037 ± 0,47	0,1343
750	6750	0,21 ± 0,21	0,038 ± 0,47	0,02472
1000	9000	0,19 ± 0,20	0,040 ± 0,30	0,06461

Na avaliação macroscópica, observou-se a presença de colônias com alta coloração pelo cristal violeta e que, microscopicamente, formavam um padrão mais organizado e denso (Figura 5. A e B); e colônias mais claras macroscopicamente e distribuídas de forma dispersa quando observadas sob microscopia (Figura 5. A e C).

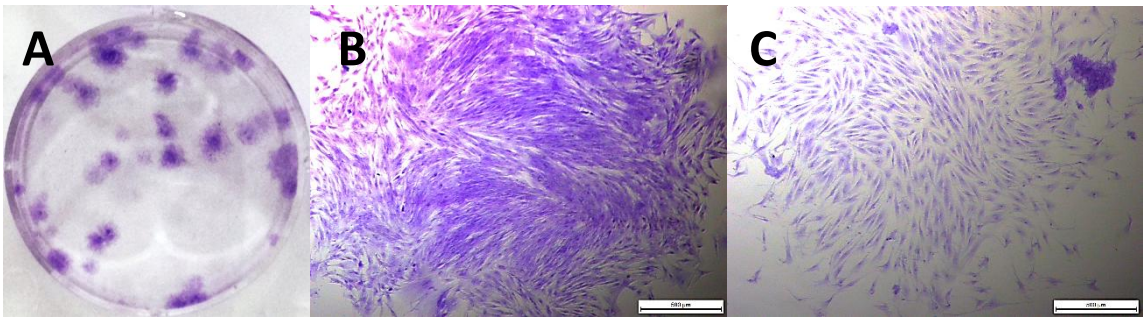


FIGURA 5. Avaliação morfológica das UFC-F coradas com cristal violeta. (A) Avaliação macroscópica. (B) Imagem microscópica representativa de colônias densas, no aumento de 40 X. (C) Imagem microscópica representativa de colônias dispersas, no aumento de 40 X.

5.3 Caracterização

Na análise por citometria de fluxo, as CTM-AD bovinas apresentaram forte marcação de CD44, baixa marcação de CD34 e ausência de expressão do marcador MHC II. Para esses marcadores, não foi observado diferença estatística (P>0,05) entre as amostras de primeira (P0) e terceira (P2) passagem (Tabela 4 e Figura 6). O marcador de linhagem mesenquimal vimentina mostrou-se positivo para todas as amostras em P2, apresentando média de 82,5 ± 5,7 %

TABELA 4. Média e desvio padrão do perfil imunofenotípico das CTM-AD (%) nos momentos P0 e P2

	P0	**P2**	**Valor de P**
CD44	86,6 ± 10,9	76,6 ± 14,2	0,20
CD34	8,7 ± 7,8	1,8 ± 0,99	0,06
MHC II	2,1 ± 1,0	2,3 ± 2,3	0,86

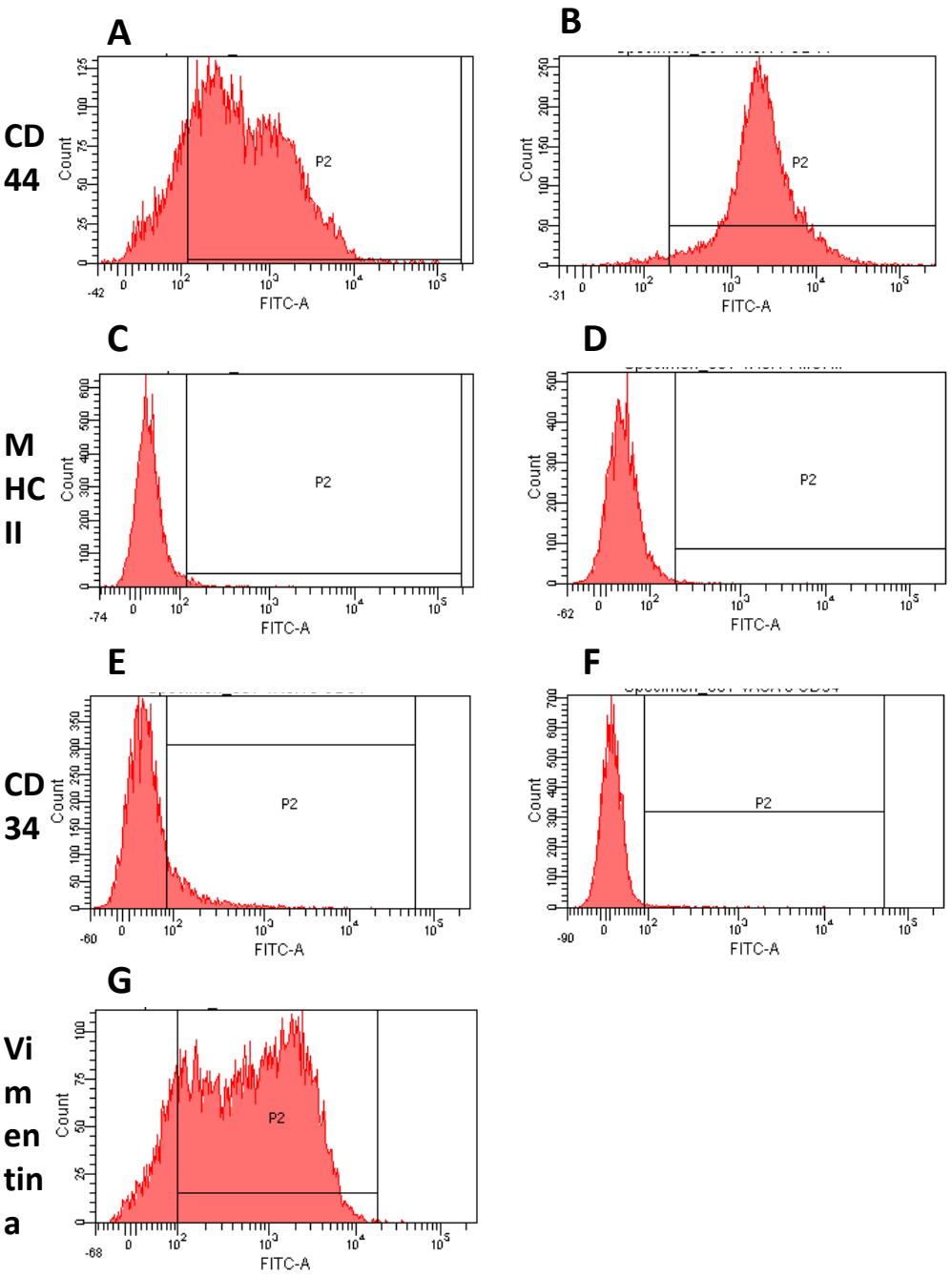


FIGURA 6. Histrograma representativo da citometria de fluxo dos marcadores CD44, MHC II, CD34 e vimentina nos momentos P0 e P2. Marcação positiva para CD44 em P0 (média de 86,6 % - A) e em P2 (média de 76,6 % - B). Marcação negativa para MHC II em P0 (média de 2,1 % - C) e em P2 (média 2,3 % -D). Baixa marcação de CD34 em P0 (média de 8,7 % - E) e em P2 (média de 1,8 % - F). Marcação positiva para vimentina em P2 (média de 82,48 % - G).

5.4 Diferenciação osteogênica e adipogênica

5.4.1 Avaliação microscópica

Após 14 dias em meio indutor, todas as amostras apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica, observando-se deposição de cálcio na matriz extracelular (Figura 7 C, D) e acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos (Figura 8 C, D), respectivamente.

O controle de ambos os testes de diferenciação manteve a aparência fibroblastóide e o crescimento em monocamada e não marcaram positivamente para nenhum dos corantes utilizados (Figura 7 A, B e 8 A, B).

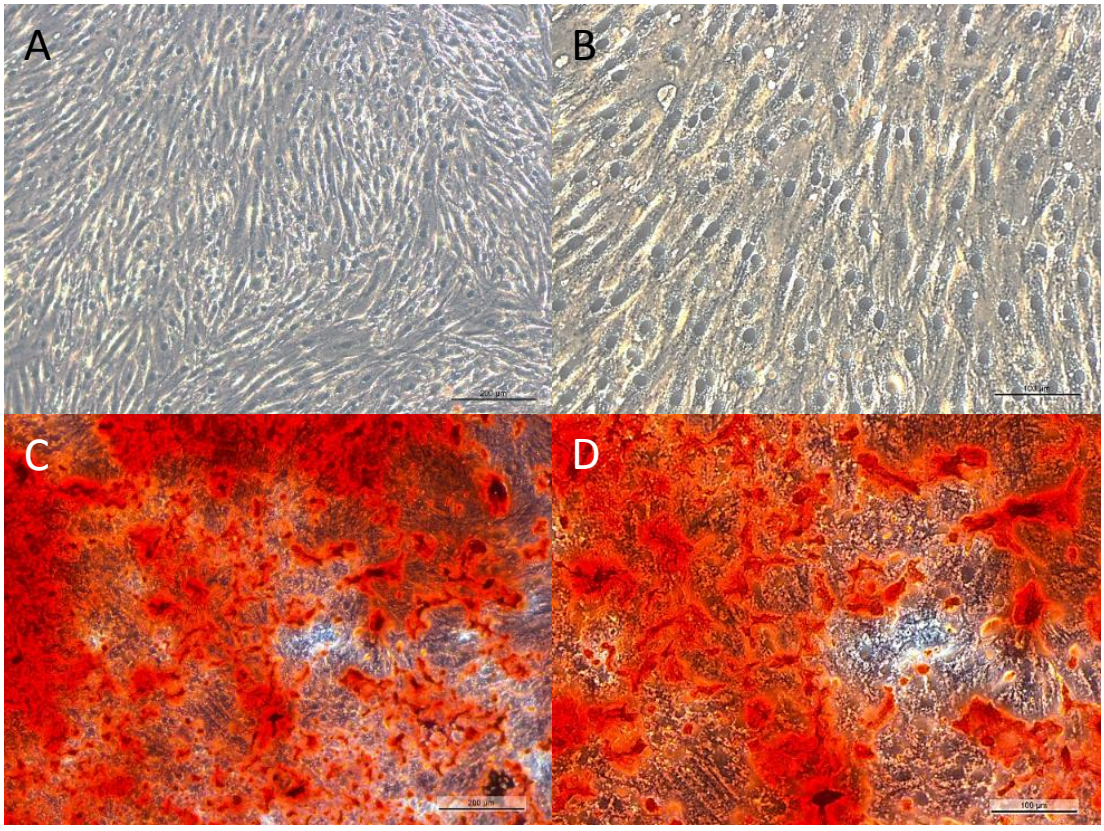


FIGURA 7. Diferenciação osteogênica, após 10 dias de cultivo, coradas com *Alizarin Red*: células mantidas em meio de cultivo (células não-induzidas), no aumento de 100 X (A) e 200X (B), e células mantidas em meio indutor apresentando deposição de cálcio corada em vermelho, no aumento de 100 X (C) e 200 X (D).

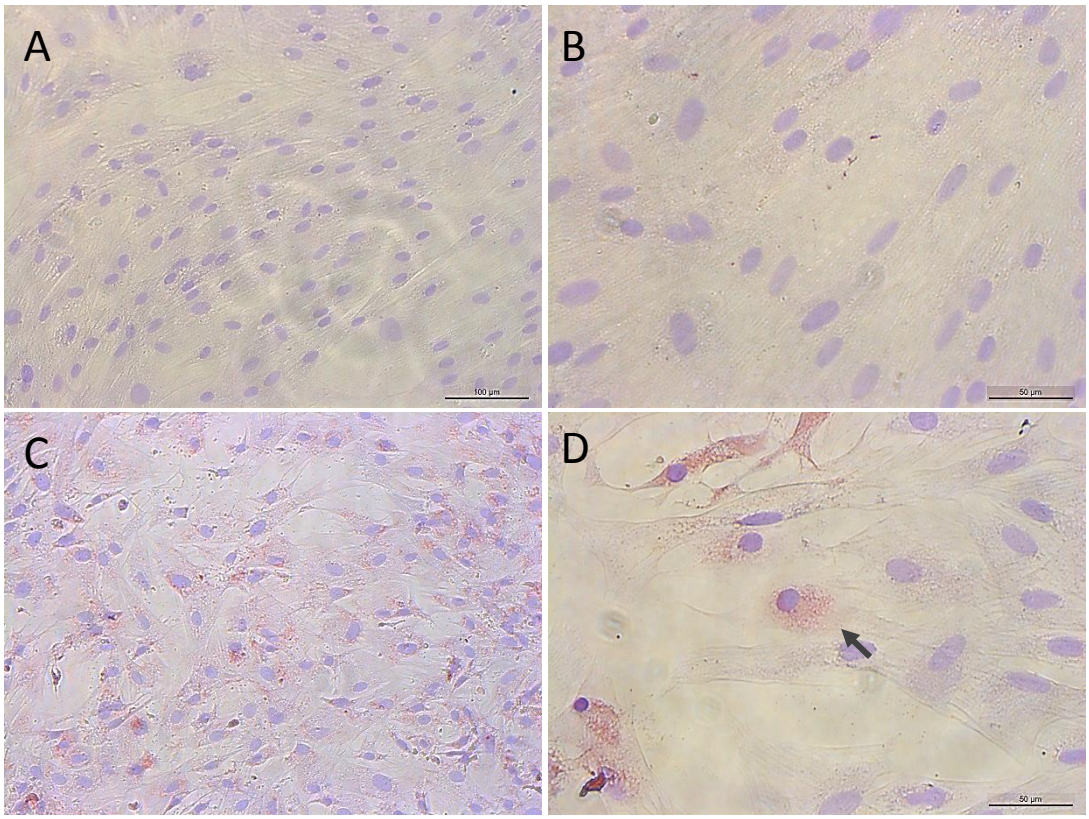


FIGURA 8. Diferenciação adipogênica, após 10 dias de cultivo, corada em *Oil Red*: células mantidas em meio de cultivo (células não-induzidas), no aumento de 200 X(A) e 400 X (B), e células mantidas em meio indutor apresentando lipídios intracitoplasmáticos corados em vermelho, no aumento de 200 X (C) e 400 X .

5.4.2 Análise da expressão gênica

Foi avaliada expressão de genes ligados a etapas iniciais e finais dos processos de osteogênese e adipogênese. Na diferenciação osteogênica, os níveis de expressão de mRNA de COL I foi maior no momento D3 quando comparado ao D15, observando-se uma diminuição de 45% da expressão desse gene ($p<0,05$; Figura 9. B). Não foi observada diferença estatística ($p>0,05$) na expressão do gene SSP1 entre D3 e D15 (Figura 9. A), enquanto

que os níveis de expressão de mRNA de OCN foram muito baixos ou nulos em ambos os tempos.

Na diferenciação adipogênica, foi observada diminuição de 46% na expressão de PPAR entre D3 e D15 ($p< 0,05$; Figura 9. C), alcançando níveis de mRNA similares ao das células não induzidas no momento D15.

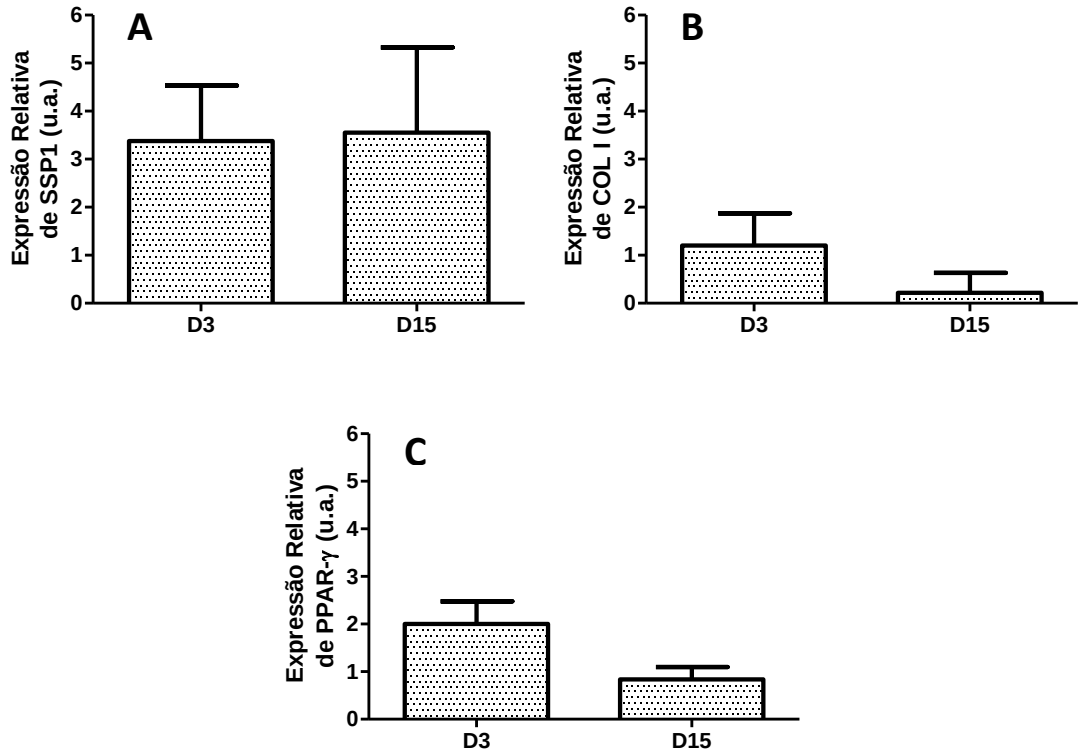


FIGURA 9. Análise quantitativa da expressão relativa (em unidades arbitrárias – u.a.) dos genes colágeno tipo I (A), osteopontina (B) e PPAR-γ (C) das CTM-AD cultivadas em meio de diferenciação osteogênica e adipogênica. O RNA total das células foi obtido após 3 (D3) e 15 dias (D15) do início da indução da diferenciação. A expressão dos genes alvos foi normalizada com a expressão de GAPDH. As células não-induzidas (mantidas apenas em meio de cultivo), dos respectivos tempos, foram utilizadas como amostra calibradora (valor = 1). Valores expressos em média e desvio padrão do parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (n=6, em triplicata).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi possível isolar CTM do tecido adiposo subcutâneo de vacasbaseada na capacidade de aderência dessas células em um substrato plástico quando cultivadas em monocamada, concordando com os critérios determinados pela ISCT (DOMINICI et al., 2006). As primeiras células fibroblastóides aderentes ao plástico foram observadas após 48-72h de cultivo celular. Esses dados diferem dos observados por Lu *et al.* (2014), em bovinos,que obtiveram as primeiras células aderentes com 24h de cultivo. Os autores, entretanto, utilizaram tecido adiposo abdominal o que expicaria a diferença entre os tempos observados para adesão das CTM-AD ao plástico. Estudos em roedores e humanos relatam a interferência do local de coleta do tecido adiposo sobre a morfologia, frequência das células estromais, cinética do crescimento celular e capacidade de diferenciação das CTM-AD (BAGLIONI et al., 2012, SCHIPPER et al., 2008; JURGENS et al, 2007; PEPTAN; HONG; MAO, 2006).

A capacidade das CTM em formar colônias é frequentemente associada com a habilidade de autorrenovação e manutenção do estado indiferenciado dessas células (LU et al., 2014), além de ser amplamente utilizada para quantificar a concentração de CTM presentes em determinado tecido (MANÇANARES et al., 2015). As taxas obtidas de UFC-F, em P0, foram menores do que as observadas em estudos com CTM-AD de humanos (JURGENS et al., 2008; BOURIN et al., 2013), equinos (VIDAL et al., 2007) e caninos (GUERCIO et al., 2013), nos quais a porcentagem de UFC-F variaram entre 1-50% da quantidade inicial de células. Na espécie bovina, o número obtido de UCF-F neste trabalho também foi inferior ao observado para gelatina de Wharton (LANGE-CONSIGLIO et al., 2016), membrana amniótica e fluído amniótico (CORRADETI et al., 2013). A baixa recuperação de CTM-AD e, consequentemente, as baixas taxas de CFU-F podem estar relacionadas com diversos fatores como técnica de isolamento empregada e local escolhido para colheita do tecido. Um fator importante a ser considerado deve ser a densidade inicial de células cultivadas pois Corradetti *et al.* (2013) e Lange-Consiglio *et al.* (2016) demostraram uma relação positiva entre o número de colônias formadas

com o aumento da densidade celular inicial, o que indicaria um possível efeito parácrino entre as células. Essa relação não foi observada no presente experimento, tornando interessante mais estudos para determinar a concentração inicial que melhor favorece o crescimento de CTM-AD bovinas *in vitro*.

As CTM expressam diversas proteínas em sua membrana plasmática, sendo que muitas delas são compartilhadas por outros tipos celulares, como células da linhagem hematopoiética e células inflamatórias do sangue. Desta forma, o estabelecimento de um padrão seguro para caracterização das CTM baseado na identificação de proteínas de membrana é difícil e trabalhoso, não tendo sido obtido para a espécie bovina. No presente estudo, foi avaliada a expressão dos marcadores CD44, CD34, MHC II e vimentina.

A glicoproteína CD44 é expressa na superfície de diversos tipos celulares e é conhecida por ser uma molécula de adesão (XIONG et al., 2014). Há indícios que a proteína CD44 esteja envolvida com os mecanismos de recrutamento das CTM para a circulação sanguínea e essa capacidade de migrar para outros tecidos é essencial para que a terapia com essas células seja aplicável (KAVANAGH; ROBINSON; KALIA, 2014). As amostras mostraram-se positivas para o marcador de superfície CD 44 desde o cultivo primário das células presentes na FVE, não havendo diferença de sua expressão em relação ao número de passagens realizadas (86,6 % em P0 e 76,6 % em P2). Esses resultados colaboram com os estudos realizados com CTM bovinas provenientes de diversos tecidos, nos quais o marcador CD44 expressou-se fortemente independente da passagem utilizada (LU et al., 2014 a, b; GAO et al., 2014; XIONG et al., 2014; ROSSI et al., 2014). A uniformidade apresentada pela expressão desse marcador, portanto, torna-o um candidato apropriado para seleção e caracterização de CTM dessa espécie.

Embora a ISCT descreva as CTM como células CD34 -, a ausência de expressão desse marcador de superfície ainda é controversa, variando com a origem das CTM e com a espécie estudada. O marcador CD 34 é expresso por células endoteliais e células progenitoras hematopoéticas (BOURIN et al., 2013) e as CTM bovinas tem apresentado resultados variados em relação sua

marcação. Neste estudo foi observado marcação de 8,7±7,8 % em P0 e 1,8±0,99 % em P2, não existindo diferença estatística entre os dois momentos (p>0,05). Marcações semelhantes de CD34, por meio de citometria de fluxo, foram observadas também em CTM bovinas provenientes do alantoide (7,8%, MANÇANARES et al., 2015), gelatina de Wharton (<10%, LANGE-CONSIGLIO et al., 2016) e medula óssea de fetos (6,6%, DUEÑAS et al., 2014). Rossi *et al*. (2014) relataram expressão maior que 50% de CD34 até a sétima passagem de CTM bovinas derivadas do fluido amniótico.

Nas CTM-AD de bovinos, no entanto, Lu *et al*. (2014) e Sampaio *et al.* (2015) não observaram a expressão desse marcador pelas técnicas de imunofluorescência e RT-PCR. As diferentes técnicas empregadas para a avaliação dos marcadores de superfície dificultam a criação de um perfil imunofenotípico seguro para CTM de uma determinada espécie pois prejudicam a comparação de resultados obtidos entre os grupos de pesquisa.

Apesar de não ter sido observada diferença estatística significativa entre os dois tempos analisados, houve uma tendência estatística (P < 0,08), indicando que a expressão poderia diferir significativamente caso aumentassemos o número de amostras. Já foi demonstrado que a marcação positiva para CD34 pode ser mantida por até 20 semanas de cultivo (YOSHIMURA et al., 2006) e o tempo médio de cultivo das CTM-AD, neste experimento, foi de 3 semanas. Dessa forma, existe a possibilidade de que um maior tempo de cultivo e, consequentemente, um maior número de passagens poderiam influenciar a expressão de CD34, como já demostrado em CTM-AD humanos (MITCHELL et al., 2006). A perda de expressão durante as passagens de células pode ser resultado da diminuição na regulação celular deste marcador em consequência da adesão celular ou ocorre simplesmente uma diminuição da população de células CD 34+ durante a expansão celular (NAGATA; MITSUMORI; IWAGURO, 2013).

Em ambos os tempos de cultivo, a marcação para o MHC II apresentou-se negativa, colaborando com resultados obtidos em nosso laboratório com CTM provenientes da membrana amniótica e matriz extravascular do cordão umbilical de fetos bovinos (CAMPOS et al., 2014). A molécula MHC II é

expressa de forma constitutiva em células apresentadoras de antígeno (APC) para células T CD4+, como macrófagos, monócitos, células dendríticas e células B, possuindo um papel fundamental no reconhecimento específico do sistema imune (TING; TROWSDALE, 2002). A falta de expressão de MHC II faz com que as CTM sejam imunotoleradas e torna possível o transplante de CTM alogênicas devido as menores chances de induzir uma resposta imune pelo hospedeiro.

A capacidade de diferenciação das CTM representa uma ferramenta atrativa para a engenharia de tecidos. Todas as amostras estudadas apresentaram capacidade de se diferenciarem na linhagem osteogênica e adipogênica dentro do período de 10 dias. Os resultados obtidos nesse experimento colaboram com os estudos realizados com CTM-AD bovinas por Zhao *et al.* (2012), Lu *et al*. (2014) e Sampaio *et al*. (2015), bem como com CTM bovinas provenientes da medula óssea (BOSNAKOVSKI et al., 2004) e anexos fetais (RAOUFI et al., 2011; CARDOSO et al., 2016; LANGE-CONSIGLIO et al., 2016).

A diferenciação adipogênica foi demostrada por meio do acúmulo de lipídio intracitoplasmático e confirmada pela expressão do gene PPAR-γ no momento D3. A indução hormonal da adipogênese é seguida pela expressão de proteína beta estimuladora de ligação a CCAAT (C/EBP-β) e C/EBP-δ, os quais alcançam níveis máximos em aproximadamente 24h (YEH et al., 1995). A expressão dessas proteínas está envolvida com a indução de PPAR-γ, cujos níveis começam a aumentar logo após o pico de C/EBP-β e C/EBP-δ. O receptor nuclear PPAR-γ pertence à família PPAR e é considerado específico para o tecido adiposo, possuindo um papel fundamental e indispensável no processo de adipogênese e na manutenção do estado diferenciado (CHAWLA et al., 1994; ROSEN et al., 2001; ROSEN; MACDOUGALD, 2006). Juntamente com o fator C/EBP-α, PPAR-γ induz alterações na expressão gênica necessárias para a maturação do adipócito além de estabilizar a função metabólica destes após completa diferenciação (LEFTEROVA et al., 2008).

Analisando os resultados obtidos, observa-se uma maior expressão de PPAR-γ após 72h de cultivo em meio indutor, estando de acordo com os

eventos temporais envolvidos na adipogênese descritos na literatura. No D15, entretanto, a expressão desse gene diminuiu para níveis basais indicando que o meio indutor não tenha sido adequado para que ocorresse completa diferenciação das CTM em adipócitos ou suficiente para a manutenção das células já diferenciadas. Diferente de outros estudos, a expressão de PPAR-γ também foi observada no grupo controle, podendo indicar uma pequena contaminação por pré-adipócitos ou apenas uma característica relacionada a espécie bovina (BOSNAKOVSKI et al., 2005)

Em relação as amostras cultivadas com meio indutor osteogênico, estas foram capazes de expressar os genes SSP1 e COL I, além de sintetizar e depositar cálcio no meio extracelular. A formação do osso é um processo complexo caracterizado por uma sequência temporal e ordenada de desenvolvimento, podendo ser dividida em três fases. Na fase inicial, ocorre recrutamento e proliferação de precursores mesenquimais de osteoblastos, seguida pela diferenciação em osteoblastos e acúmulo de matriz extracelular proteica rica em colágeno, denominada osteóide. Na etapa final do processo, o osteoblasto deposita minerais, incluindo o cálcio, no osteóide e ocorre a formação de nódulos ósseos (VARY et al., 2000; BLAIR et al., 2008; GRANCHI et al., 2010).

No presente experimento, a expressão do gene OCN não foi observada em nenhuma amostra. Resultados semelhantes foram descritos em CTM bovinas provenientes da medula óssea (BOSNAKOVSKI et al., 2004) e gelatina de Wharton (LANGE-CONSIGLIO et al., 2016) mantidas em meio de diferenciação osteogênica por 27 e 21 dias, respectivamente. A OCN é uma proteína extremamente específica do osso, sendo expressa apenas por osteoblastos maduros (GÖLLNER et al., 2001). De acordo com Rickard et al. (1994), a expressão desse gene por células em cultivo só ocorre após a adição de vitamina D. Dessa forma, pode-se considerar que o período em que essas células permaneceram no meio indutor não tenha sido suficiente para que ocorresse a adequada maturação dos osteoblastos, ou que o meio indutor empregado não possuía algum dos fatores importantes para a completa diferenciação osteogênica. Vale ressaltar que a composição exata do meio de

indução utilizado não é descrita pelo fabricante e, embora recomendado para a diferenciação osteogênica, não é específico para células bovinas.

A presença do mRNA para SSP1 se manteve constante entre o momento D3 e D15 de cultivo. Este resultado já era esperado, uma vez que SSP1 é uma proteína da matriz celular, produzida tanto pelos osteoblastos como osteoclastos, e um dos principais marcadores do tecido ósseo. A SSP1 está presente em todas as fases da formação do osso, sendo expressa principalmente durante as etapas de diferenciação e de mineralização da matriz extracelular (RICKARD et al., 1994; VARY et al., 2000; STANDAL; BORSET; SUNDAN, 2004).

A expressão de COL I, por sua vez, está associada a fase intermediária de diferenciação das CTM em osteoblastos, formando uma rede proteica necessária para que a mineralização se inicie (BLAIR et al., 2008; GRANCHI et al., 2010; SOLLAZO et al., 2010). COL I é produzido por osteoclastos na superfície externa do osso e, conforme a matriz é mineralizada e os osteoclastos se tornam inseridos na matriz óssea, sua produção diminui. Desta forma, o fato da expressão de mRNA para COL I ter diminuído no D15, pode estar relacionado a evolução do processo de diferenciação, bem como a duração do cultivo. De fato, MacCallum e Lillie, (1990) observaram, em culturas de queratócitos de ratos, que a produção de fibrilas de colágeno tipo I diminuiu com o aumento da confluência, uma vez que o índice de divisão celular diminuiu.

A detecção da do mRNA para essas proteínas é compatível com a deposição de cálcio observada na avaliação microscópica das células submetidas a diferenciação osteogênica, indicando que uma parcela significativa das células em cultivo se diferenciaram para linhagem osteoblástica. Apesar disso, em qualquer sistema de indução de diferenciação, é difícil estabelecer qual a proporção de células estromais que irão responder e expressar características de osteoblastos (HEERSCHE et al., 1992).

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível isolar facilmente CTM-AD bovinas da região subcutânea, por meio de digestão enzimática do tecido adiposo seguido de cultivo *in vitro*. As células apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico, concordando com os critérios determinados pela ISCT, além de apresentarem capacidade de formar colônias.

Na avaliação do perfil imunofenotípico, o marcador CD44 mostrou-se confiável para caracterizar CTM-AD, sendo expresso de forma consistente nas CTM bovinas independentemente do número de passagem. Além disso, as CTM-AD foram capazes de expressar o marcador vimentina, confirmando sua origem mesenquimal, e não expressar o marcador MHC-II desde o cultivo primário, o que é um importante aspecto para viabilizar o uso dessas células na terapia alogênica. Por outro lado, o emprego do marcador CD34 para descartar populações por elas não serem constituídas por CTM-AD, é temerário, uma vez que sua expressão pode ser detectada por várias passagens durante os cultivos iniciais.

CTM-AD apresentaram potencial para se diferenciar nas linhagens osteogênica e adipogênica. Entretanto, nenhuma amostra foi capaz de expressar OCN, indicando que o tempo de cultivo em meio indutor ou o meio utilizado para indução não foram suficientes para que houvesse a completa diferenciação dessas células na linhagem osteogênica.

8 REFERÊNCIAS

As referências foram elaboradas de acordo com as normas da ABNT 6023.

BAGLIONI, S. et al. Functional differences in visceral and subcutaneous fat padds originate from differences in the adipose stem cell. **Plos one.** v. 7, e36569, 2012

BAHR, A.; WOLF, E. Domestic animal models for biomedical research**. Reprod Domestic Anim**, v. 47, p. 59-71, 2012

BARBOSA et al. Degenerative joint disease in cattle and buffaloes in the Amazon region: a retrospective study. **Pesq.Vet. Bras**., v,34, n.9, p. 845-850, 2014

BEN-AMI, E.; BERRIH-AKNIN, S.; MILLER, A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic sttrategy for autoimmune diseases. **Autoimmun Rev.** v. 10, p. 410-415, 2011

BERNARDO, M.E.; PAGLIARA, D.; LOCATELLI, F. Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in regenerative medicine? **Bone Marrow Transplant**. v.47, p.164-171, 2012

BLAIR, H.C. et al. The developmental basis of skeletal cell differentiation and the molecular basis of major skeletal defects. **Biol Rev Camb Philos Soc.**, v.83, p. 401-15, 2008.

BOSNAKOVSKI, D. et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. **Exp. Hematol.**, v. 32, p.502-509, 2004

BOSNAKOVSKI, D. et al. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Tissue Res.**, v.319, n.2, p. 243-253, 2005

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 Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, v.15, p.641-648, 2013

BUNNEL, B.A. et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. **Methods**, v.45, n.2, p.115–120, 2008

BURK, J. et al. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. **Vet J.**, v.195, p.98 – 106, 2013

CAMPOS, L. L. **Isolamento, cultivo, caracterização e criopreservação de células tronco mesenquimais derivadas de membrana amniótica, geléia de Wharton e sangue do cordão umbilical de fetos bovinos**. 2014. 54 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/123860>

CARDOSO, T. C. et al. Isolation and characterization of Wharton's jelly derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum free three-dimensional system. **BMC Biotechnol**, v. 12, n.18, 2012

CARDOSO, T.C. et al. Isolation, characterization and immunomodulatory-associated gene transcription of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells at different trimesters of cow pregnancy. **Cell Tissue Res.**, 2016, Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1007/s00441-016-2504-9>

CASADO-DIAZ, A.; PÉREZ, G.D.; QUESADA-GÓMEZ, J.D. Stem cell research and molecular markers in medicine. **Comprehensive Biotechnology**, 2ª Edição, v. 5, p. 455-466, 2011.

CHAMBERLAIN; G. et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cell**, v. 25, p. 2739–2749, 2007

CHAWLA, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. **Endocrinology**, v.135, n.2, p.798-800, 1994.

CORRADETTI, B. et al. Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in bovine. **Reproduction**, v.145, p. 391–400, 2013

DE UGARTE, D.A. et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. **Immunol Lett**, v.89, p. 267-270, 2003

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.

DUEÑAS, F. et al. Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. **BMC Vet. Res.** v. 10:154, 2014. doi: 10.1186/1746-6148-10-154

ETO, H. et al. Characterization of Structure and Cellular Components of Aspirated and Excised Adipose Tissue. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.124, n.4, p. 1087 – 1097, 2009

FARINAZZO, A. et al Murine adipose-derived mesenchymal stromal cell vesicles: in vitro clues for neuroprotecctive and neuroregenerative approaches. **Cytotherapy**, v. 17, p. 571-578, 2015.

FIGUEROA, R.J.; KOCH, T.G.; BETTS, D.H. Stem cells and animal therapies. **Comprehensive Biotechnology**, 2ª Edição, v. 4, p. 417-427, 2011.

GAO, Y. et al. Multilineage potential research of bovine amniotic fluid mesenchymal stem cells. **Int. J. Mol. Sci.** v. 15, p. 3698-3710, 2014.

GÖLLNER, H. et al. Impaired ossification in mice lacking the transcription factor Sp3. **Mech. Dev.**, v.106, p.77-83, 2001.

GRANCHI, D. et al. Gene expression patterns related to osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells during *ex vivo* expansion. **Tissue Eng.**, v.16, n.3, p.511-524, 2010.

GUERCIO, A. et al. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. **Cell Biol. Int.**, v.37, p.789-798, 2013.

HEERSCHE, J.N. et al. Changes in expression of alpha 1 type 1 collagen and osteocalcin mRNA in osteoblasts and odontoblasts at different stages of maturity as shown by in situ hybridization. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, v. 88, Supl. 1, p.173-182, 1992.

HERATH, S. et al. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. **J. Reprod. Immunol.** v.69, p.13-22, 2006

HOWITZ, E.M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005

IM, G.; SHIN, Y-W.; LEE, K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? **Osteoarthr. Cartil.,** v. 13, n.10, p.845–853, 2005

IZADPANAH, R. et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **J. Cell. Biochem.**, v. 99, p. 1285–1297, 2006

JURGENS, W.J.F.M. et al. Effect of tissue-haversting site on stem cells derived from aipose tissue: implications for cell-based therapies. **Cell Tissue Res.**, v.332, p. 415-426, 2008

KAVANAGH, D.P.; ROBINSON, J.; KALIA, N. Mesenchymal stem cell priming: fine-tuning adhesion and function. **Stem Cell Rev.** v.10, p. 587-599, 2014.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, p. 1294–1301, 2006

KIM, D.G. et al. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. **Cytokine**, v. 31, p. 119-12, 2005.

KOKAI, L.E.; MARRA, K.; RUBIN, J.P. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. **Transl Res.**, v. 163, n. 4, p. 399-408, 2014

KUMAR et al. Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts and mesenchymal stem cells. **Dev. Dynam**, v.236, p.435-446, 2007

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Isolation, molecular characterization and in vitro differentiation of bovine Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal cells. **Theriogenology**, 2016. No prelo.

LAROCCA, R.A. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increase skin allograft survival and inhibit Th-17 immune response. **Plos One.** v. 8, n.10, 2013 doi: 10.1371/jounal,pone,0076396

LEFTEROVA, M.I. et al. PPARγ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. **Genes and Dev.**, v. 22, p.2941-2952, 2008.

LIN, G. et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. **Stem Cells Dev.**, v.17, n.6, p. 1053-1063, 2008

LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINE, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Rev.**, v. 7, p. 269–291, 2011

LIU, T.M. et al. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. **Stem Cells**, v. 25, p. 750–760, 2007

LU, T. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from fetal bovine liver. **Cell Tissue Bank.** v. 15, p. 439-450, 2014

LU, T. et al. Isolation and characterization of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) from cattle. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 174, p.719-728, 2014.

MACCALLUM, D.K.; LILLIE, J.H. Evidence for autoregulation of cell division and cell transit in keratinocytes grown on collagen at an air-liquid interface. **Skin Pharmacol.**, v.3, n.2, p.86-96, 1990

MANÇANARES, C.A.F. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the yolk sacs of bovine embryos. **Theriogenology.** 2015. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.031>

MAUCK, R.L.; YUAN, X.; TUAN, R.S. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long term agarose culture. **Osteoarthr. Cartil.** , v. 14, p. 179-189, 2006

MITCHELL, J.B. et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell–associated marker. **Stem Cells**, v. 24, p. 376–38, 2006.

MIZUNO, H.; TOBITA, M.; UYSAL, A.C. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. **Stem Cells**, v. 30, p. 804–810, 2012.

MOHAMMADPOUR, H. et al. TNF-α modulates the immunosuppresive effects of MSC on dendritic cells and T cells. **Int Immunopharmacol.,** 2015 doi: 10.1016/j.intimp.2015.07.045

MURPHY, M.B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Exp Mol Med.,** v.45, p. 1-16, 2013

NAGATA, T.; MITSUMORI, T.; IWAGURO, H. Adipose tissue-derived stem and regenerative cells for tissue regeneration. **J Oral Biosci.**, v.55, p.127-131, 2013.

OH, S.K.W.; CHOO, A.B.H. Stem cells. **Comprehensive Biotechnology**, 2ª Edição, v.1, p. 341-365, 2011.

PATTERSON-KANE, J.C.; BECKER, D.L.; RICH, T. The pathogenesis of tendon microdamage in athletes: the horse as a natural model for basic cellular research**. J.Comp. Pathol.**, v.74, p.46-57, 2012

PEPTAN, I.A.; HONG, L.; MAO, J. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. **Plast Reconstr Surg.,** v. 117, p. 1462-1470, 2006.

RAOUFI, M.F. et al. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. **Reprod Domest Anim.**, v. 46, p. 95-99, 2011.

REN, G. et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppresion. **Stem Cells.** v.27, p. 1954-1962, 2009

REN, G. et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. **Cell Stem Cell.** v. 2, p. 141-150, 2008

REN, Y. et al. Isolation, expansion and differentiation of goat adipose-derived stem cells. **Res Vet Sci.**, v.93, p. 404-411, 2012.

RESHAK, A.H.; SHAHIMIN, M.M.; BUANG, F. Comparative study on human and bovine AT-SC isolation methods. **Prog Biophys Mol Biol.**, v.13, p. 295-298, 2013.

RICKARD, D.J. et al. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. **Dev. Biol.**, n.161, p.218-228, 1994.

ROSEN, E.D. et al. C/EBPα induces adipogenesis through PPARγ: a unified pathway. **Genes and Dev.**, v.16, p.22-26, 2001

ROSEN, E.D.; MACDOUGALD, O.A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Mol. Cell. Biol.**, v.7, p.885-896, 2006

ROSSI, B. et al. Isolation and in vitro characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells at different trimesters of pregnancy. **Stem Cell Rev.** v.10, p. 712-724, 2014

RÜSTER, B. et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. **Blood.** v.108, n.12, p.3938-3944, 2006

SAMPAIO, R.V. et al. Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: isolation, characterization, and multipotentiality. **Genet. Mol. Res.**, v.14, n.1, p.53-62, 2015.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. **Stem Cells**, v. 25, p. 818–827, 2007.

SCHIPPER, B.M. et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. **Ann Plast Surg.,** v.60, p. 538-544, 2008.

SENSEBÉ, L. et al. Mesenchymal stem cells for clinical application. **Vox Sang.,**, v. 98, p. 93–107, 2010.

SERAKINCI, N.; FAHRIOGLU, U.; CHRISTENSEN, R. Mesenchymal stem cells, cancer challenges and new directions. **Eur. J. Cancer**, v.50, p. 1522–1530, 2014

SHI, M.; LIU, Z.W.; WANG, F.S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v.164, p. 1–8, 2011.

SOLAZZO, V. et al. Engipore acts on human bone marrow stem cells. **Saudi Dent J.**, v.22, p.161-166, 2010.

STANDAL, T.; BORSET, M.; SUNDAN, A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. **Exp. Oncol.**, v.26, n.3, p.179-184, 2004

STENDERUP, K. et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, v.33, p. 919–926, 2003

STREM, B.M. et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med.**, v.54, n.3, p. 132-141, 2005

SU, J. et al. Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. **Cell Death Differ.**, v.21, p.388-396, 2014.

TING, J.P.; TROWSDALE, J. Genetic control of MHC class II expression. **Cell.** v. 109, p.s21 – s33, 2002.

VARY, C.P.H. et al. Involvement of Ets transcription factors and targets in osteoblast differentiation and matrix mineralization. **Exp. Cell. Res.**, v.257, p.213-222, 2000

VIDAL, M.A. et al. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cell: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Vet Surg.**, v.36, p.613-622, 2007.

VON BAHR, L. et al. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. **Stem Cells.**, v. 30, p.1575-1578, 2012

XIONG, H. et al. Biological characterization of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord. **Animal Cells Syst.,** v. 18, n.1, p.59-67, 2014.

YEH, W.C. et al. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. **Genes and Dev.**, n. 9, p. 168-181, 1995.

YOSHIMURA, K. et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. **J. Cell. Physiol.,** v.208, n.1, p.64-76, 2006

ZHAO, Y.; WALDMAN, S.D.; FLYNN, L.E. The effect of serial passaging on the proliferation and differentiation of bovine adipose-derived stem cells. **Cells Tissues Organs**, v.195, p.414-427, 2012.

ZUK, P.A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol. Biol. Cell**, v.13, p.4279-4295, 2002.

9 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista Veterinary Research Communications (ISSN: 0165-7380 (Print) 1573-7446 (Online)). As normas da revista se encontram no link http://www.springer.com/life+sciences/animal+sciences/journal/11259?detailsPage=pltci_1060672

Isolation and Characterization of Bovine Mesenchymal Stem Cells derived from Adipose Tissue

Tatícia L. Ikeda[1]*, Elena C. Serrano[1], Isadora Arruda[1], Camila P. Freitas-Dell'Aqua[1], Giscard Lima[2], Marcello V. Tedardi[3] e Fernanda C. Landim-Alvarenga[1]

[1]Department of Animal Reproducation and Radiology, College of Medicine Veterinary and Animal Sciences, São Paulo State University, Botucatu-SP, 18618-970, Brazil

[2]Department of Biophysics, Federal University of São Paulo, São Paulo-SP, 04039-032, Brazil.

[3]School of Arts, Science and Humanities, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil

*Corresponding author:

E-mail: taticia.ikeda@gmail.com

Tel/Fax: +55 14 3880 2119

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are an interesting tool for regenerative medicine, tissue engineering and cell therapy. In bovine species, MSC are not well described. Therefore, the aim of this study was to isolate and characterize bovine MSC obtained from adipose tissue. Samples from six cows were used to isolate MSC by enzymatic digestion followed by monolayer culture. These cells were, then, submitted to immunophenotyping by flow cytometer at first (P0) and third (P2) passages. Osteogenic and adipogenic differentiation potential was evaluated microscopically after 10 days of induction and by Real Time qPCR after 3 and 15 days of induction. Cells showed plastic-adherent characteristic and fibroblastoid morphology. They expressed CD 34 (8,7 % at P0 e 1,8 % at P2), CD44 (86,6 % at P0 e 76,6 % at P2)and vimentin (82,48 % at P2) and did not express MHC II (2,1 % at P0 e 2,3 % at P2). All samples showed potential to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages and expressed osteopontin and collagen type I and PPAR-γ, respectively. Osteocalcin was not expressed in any sample. Our results shows the possibility of using bovine adipose tissue as a source of MSC for regenerative medicine and cell therapy.

Key words: cow, surface makers, flow cytometer, differentiation potential, gene expression

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSC) are a heterogeneous population of non-hematopoietic stromal cells that differentiate and contribute to the recovery of mesenchymal tissues. Although they are not immortals, these cells are able to expand several times during in vitro culture without reducing their growth rate and differentiation ability (Howitz et al. 2005, Chamberlain et al. 2007, Oh and Choo 2011). MSC has increasingly arisen the medical community interest due to their availability and easy harvesting from several adult tissues; isolation and in vitro expansion in clinical scales within a relatively short time; possibility of being cryopreserved without losing their therapeutic ability; secretion of paracrine factors that are involved in tissue healing; and immunomodulatory potential (Casado-Diaz et al. 2011, Serakinci et al 2014).

Zuk et al. (2002) described adipose derived stromal stem cells (ASC) for the first time and, since then, the interest in these cells has increased in the medicine field, intensifying the studies that aim to better characterize and understand ASC biology in the different species. These cells show similar characteristics to MSC derived from bone marrow and can be harvested in larger amounts by a less invasive technique (Im et al. 2005, Ren et al 2012).

Bovine are important animal production and represent an attractive experimental model in the biotechnology and biomedicine fields due to their easy management and the convenience of obtaining samples from the slaughterhouse. Futhermore, they show physiological and pathological similarities with humans, especially in the reproductive system and, in a smaller range, in the musculoskeletal system (Herath et al. 2006, Bahr and Wolf 2012, Rossi et al. 2014). Although their importance as in vivo experimental models, studies with bovine MSC are still recent and show contradictory results especially regarding the immunophenotypic characterization of these cells. Until the present moment, most of researches focus on isolating and characterizing MSC obtained from fetal annexes or organs. Studies using ASC are still rare and lacking information about their in vitro characteristics and behavior. By immunofluorescence, it has been demonstrated the positive expression of β-integrina, CD44, CD73, CD90 and CD105 and negative expression of CD34, CD45 and CD79. Besides, these cells have already showed adipogenic, osteogenic and chondrogenic ability (Zhao et al 2012, Lu et al 2014, Sampaio et al 2015). In this context, this study aimed to find new insights in ASC behavior when submitted to in vitro culture and differentiation applying sensitive and quantitative techniques.

MATERIALS AND METHODS

All procedures were approved by the Ethics Committee of the College of Veterinary Medicine and Animal Sciences from São Paulo State University (n 151/2014 Botucatu, SP).

Adipose tissue harvesting

Samples were harvested from six cows at Fazenda Marino (Avaré, Sao Paulo, Brazil). Adipose tissue was collected at the basis of the tail where an incision of approximately 4 cm was performed followed by the isolation of the subcutaneous fat. Samples were then immersed into phosphate buffered saline (PBS) solution added 1% penicillin/streptomycin and amikacin (22ug/ml).

Isolation and Cell culture

Samples were washed in PBS with 1% penicillin/streptomycin and amikacin (22ug/ml), minced and enzymatically digested with 0.04% Type I collagenase (Sigma, USA) in PBS for 30 minutes at 37°C. During this period, samples were agitated by vortex every 5 minutes. After digestion, culture medium consisting of DMEM low glucose/F12 (1:1, Gibco, USA), supplemented with 20% fetal bovine serum (SFB, Gibco, USA), 1% penicillin/streptomycin (Gibco, USA) and 1,1% amphotericin B (Gibco, USA) was added. Samples were twice centrifuged at 500 G for 6 minutes and ressuspended in culture medium for total removal of the collagenase solution. Pellet was then filtered through a 70µm strainer (BD, USA) and incubated in plastic flasks at 37,5 C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Culture medium

was changed every 48 hours until 80% confluence was reached, when adherent cells were detached with trypsin and passaged to subcultures.

Colony forming units (CFU) assay

SVF cells were transferred to six wells plates in different densities (500, 750 and 1000 cells/cm²) and incubated in culture medium for 10 days at 37,5 C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Monolayer cells were washed in PBS and stained in 1% Violet Crystal in methanol. Colonies with more than 20 cells were counted under inverted light microscope (Leica Microsystems, Germany). CFU efficiency(%) was calculated by (number of CFU/number of initial cells) x 100.

Flow cytometry

Flow cytometry for the markers CD44, CD34 and MHC II was performed during first and third passage (P0 and P2). For CD44 and CD34, we used antibodies specifically for the bovine species. Expression of MHC II was based in cross-reaction between equine antibodies and bovine superficial membrane proteins.

Vimetin expression was only evaluated during third passage. Cells were fixed in 10% paraformol and permed with triton 0,01%. Primary antibody anti-vimetin was detected by incubation with secondary antibody anti-goat. All samples were analyzed using flow cytometer FACS Calibur BD®. Values <3% were considered negative.

Osteogenic and adipogenic differentiation

Cell preparation and differentiation induction

Cells from third passage were transferred to 24 wells plates, for histological evaluation, and six wells plates, for gene expression analysis. Cell were plated in different densities: 2,5 x 10^3 cells/cm² for osteogenic differentiation and 5 x 10^3 cells/cm² for adipogenic differentiation. Cells were incubated in culture medium at 37,5 C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. After 72h, culture medium was replaced by respective differentiation media (StemPro osteogenesis and StemPro adipogenesis- Gibco)

Microscopic evaluation

Samples were analized after 10 days of culture in differentiation media. Cells were fixed in 10% buffered formalin for 30 minutes at 4 C. For osteogenic differentiation, monolayers were stained with Alizarin Red 2% and pH 4,2 (Sigma, USA) and assessed to the presence of calcium matrix deposits. Adipogenic differentiation was confirmed by the visualization of intracytoplasmic lipid droplets with Oil red O (Sigma, USA).

Real Time qPCR

Gene expression was analyzed at the third day (D3) and fifteenth day (D15) of culture in differentiation medium. Total RNA was isolated using Total RNA purification kit (Norgen Biotek) and treated with DNase (RQ1 – Promega) according to manufacturer's instructions. cDNA was synthetized from 400ng of total RNA using reverse transcription kit Impron II (promega). Real time qPCR was performed, at 7500 Standard equipment, with GoTaq master mix under the following conditions: 40 cycles of 95 C for 15 seconds and 60 C for one minute. All genes were normalized to GAPDH expression. Primer sequences are described in table 1.

RESULTS

Morphology

The first cells to adhere to the flask surface were detected between 48 – 72 hours and showed fibroblastoid morphology with small extensions. Just before reaching 80% confluence, cells became elongated and were organized in colonies. First colonies with more than 20 cells were observed after 120h.

CFU-F assay

Seeding densities did not affect the frequency of CFU-F after 14 days in culture. We could observe two different types of colonies that differ in the morphological evaluation: microscopically dense colonies that were high stained by crystal violet and less stained colonies showing a disperse organization microscopically.

Flow cytometry

Bovine ASC showed, by flow cytometer, high expression of CD44, low expression of CD34 and lack of MHC II expression. There was not significant difference in CD44 expression of cell in primary culture and at third passage. Expression percentage of CD34 reduced between P0 and P2, but no statistical difference were observed. All samples showed vimetin expression at P2.

Osteogenic and adipogenic differentiation

Microscopic evaluation

After 14 days in differentiation media, all samples showed potential to differentiate into adipogenic and osteogenic lineages as we could observed by intracytoplasmatic lipid deposition and calcium extracellular matrix deposits.

Real time qPCR

We evaluated the expression of genes related to early and late phases of adipogenic and osteogenic differentiation. Collagen type I expression was increased at D3 and reduced 45% at D15. On the other hand, no difference was observed in the expression of SSP1 between D3 and D15. Osteocalcin levels were low or absent in both times. PPAR expression decreased 46% at D15, reaching basal levels. Expression of PPAR were also detected in the control group.

DISCUSSION

In this study, it was possible to isolate MSC from the subcutaneous adipose tissue of cows through their ability to adhere to a plastic substrate during monolayer culture. First fibroblastic cells were observed after 48-72h, which differs from results obtained by Lu et al (2014) with ASC derived from abdominal adipose tissue. Studies with murine and humans report that tissue harvest local interferes in the morphology, ASC frequency, growth kinetics and differentiation potential (Baglioni et al 2012, Schipper et al 2008, Jurgens et al. 2007, Peptan et al 2006).

Colony forming is frequently associated with renewal ability and undifferentiated status maintenance of MSC (Lu et al 2014). Besides, it is largely used to quantify MSC concentration in a given tissue. CFU-F frequency were lower than in human (Jurgens et al 2008), equine (Vidal et al 2007) and canine (Guercio et al 2013), which studies showed a rate between 1 -50%. The rates obtained in this study also were inferior to bovine MSC derived from other sources such as Wharton's jelly (Lange-Consiglio 2016), amniotic membrane and amniotic fluid (Corradetti et al 2013).

Several factors can affect ASC recover and CFU-F frequency such as isolation technique and tissue harvest local. Initial seeding density is an important factor to be considered due to a possible paracrine effect between cells as observed by Corradetti et al. (2013) and Lange-Consiglio et al (2016).

Immunophenotypic profile for bovine MSC has not been well stablished. In the present study, we evaluated the expression of CD44, CD34, MHC II and vimentin.

Glycoprotein CD44 is a known adhesion molecule, which is frequently associated to MSC recruitment and homing mechanism (Xiong et al 2014, Kavanagh et al. 2014). All samples showed positive expression for CD44 at P0 and P2. These results collaborated to studies with bovine MSC obtained from several tissues, including the adipose tissue, in which CD44 has strongly expressed independently of studied passage (Lu et al 2014 a,b, Gao et al 2014, Xiong et al 2014, Rossi et al 2014).

Although International Society of Cell Therapy describes MSC as CD34 -, the expression of this marker is still controversial, varying with MSC source and specie. CD34 is expresses in endothelial cell and hematopoietic progenitors (Bourin et al 2013) and, among bovine MSC, it has showed different results about its expression. In this experiment, CD34 expression was low at P0 and decreased numerically until P2. Similar expressions were observed by flow cytometer in bovine MSC from alantoid (Maçanares et al 2015), wharton's jelly (Lange-Consiglio et al 2016) and bone marrow from fetuses (Duenas et al 2014). However, Lu et al. (2014) and Sampaio et al. (2016) did not observe the expression of this marker in bovine ASC when analyzing by immunofluorescence and RT-PCR. Different techniques to evaluate the surface markers make difficult to determine a safe immunophenotypic profile of a given specie. Besides, it affects the comparison of results obtained by different research groups.

There is the possibility that a longer culture period and, consequently, a higher passage number may interfere with CD34 expression as demonstrated by Mitchell et al. (2006) in human ASC. Expression lost during cell passages can be a result of decreased cell regulation of the marker as consequence of adhesion or there is a reduction in CD34 + cell population during cellular expansion (Nagata et al 2013).

Lack of MHC II expression allows the use of those cells in the allogenic therapy. At any studied moment, MHC II expression was negative, which collaborates with results obtained at our laboratory with bovine MSC derived from amniotic membrane and umbilical cord extracellular matrix (Campos et al 2014).

MSC differentiation ability represents an attractive tool for tissue engineering. All samples showed potential to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages within a 10 days period. Results obtained in this experiment collaborate with studies using bovine ASC by Zhao et al (2012), Lu et al. (2014) and Sampaio et al.(2015), as well as bovine MSC derived from bone marrow and fetal annexes.

Adipogenic induced cells were able to accumulate intracytoplasmatic lipid droplets and expressed high mRNA levels of PPAR gene at D3, which indicates the potential of these cells to differentiate into adipocytes. However, ASC did not maintain the expression of PPAR at D15, reaching basal levels at this moment. PPAR has a major role in the differentiation and maintenance of adipocytes. Results obtained may represent that the induction media was not ideal to induce completely the adipogenic differentiation of bovine ASC.

Expression of osteogenic related genes SSP1 and collagen type I were compatible to calcium deposit observed in cells submitted to the induction media. Bone formation is a complex process characterized by a temporal and organized sequence, in which it occurs accumulation and posterior mineralization of the extracellular matrix (Vary et al 2000, Blair et al 2008, Granchi et al 2010). As expected, SSP1 gene expression levels were maintained at D3 and D15. SSP1 protein is produced by osteoblast and osteoclast and is involved at the intermediate and late stages of osteogenic differentiation (Rickard et al 1994, Standal et al 2004). Collagen type I has a role during intermediate stage and it reduces its levels according to the mineralization of the extracellular matrix (Blair et al. 2008), which could be observed by the decreasing in gene expression from D3 to D15.

We did not observe osteocalcin in any sample, however. Osteocalcin is extremely specific to the bone and is only expressed after mineralization begins by mature osteoblasts (Gollner et al 2001). Therefore, the induction period may not be adequate for the complete osteogenic differentiation of bovine ASC. Bonaskovski et al (2005) obtained similar results with bovine MSC derived from the bone marrow and induced to the osteogenic lineage using a medium without vitamin D. According to Rickard et al (1994), osteocalcin expression only occurs after adding vitamin D to the culture medium. Although recommended to osteogenic differentiation, the media used is not specific for bovine species and may lack essential components required by bovine MSC to differentiate successfully into osteoblasts.

CONCLUSION

In the present study, we easily isolate ASC from the subcutaneous adipose tissue. Those cells showed fibroblastoid morphology, plastic adherence and ability to form colonies when cultured in vitro. Immunophenotipical evaluation showed consistent expression of CD44, which may be considered a reliable surface marker to identify bovine ASC populations. On the other hand, CD34 may be used with cautious as cells in primary culture may still express this protein. ASC did not express MHC II enabling the use of these cells in allogenic therapy. They also showed potential to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages. More studies related to chondrogenic differentiation and immunomodulatory ability are necessary to better characterize bovine ASC and, consequently, better apply these cells in the regenerative medicine.

REFERENCES

Baglioni, S. et al. Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Padds Originate from Differences in the Adipose Stem Cell. **Plos one.** v. 7, e36569, 2012

Bahr, A.; Wolf, E. Domestic Animal Models for Biomedical Research**. Reprod Domest Anim**, v. 47, p. 59-71, 2012

BLAIR, H.C. et al. The developmental basis of skeletal cell differentiation and the molecular basis of major skeletal defects. **Biol Rev Camb Philos Soc.**, v.83, p. 401-15, 2008.

Bosnakovski, D. et al. Isolation and Multilineage Differentiation of Bovine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Cell Tissue Res.**, v.319, n.2, p. 243-253, 2005

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 Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, v.15, p.641-648, 2013

Campos, L. L. (2014) **Isolamento, cultivo, caracterização e criopreservação de células tronco mesenquimais derivadas de membrana amniótica, geléia de Wharton e sangue do cordão umbilical de fetos bovinos**. Dissertation. São Paulo State University

Casado-Diaz, A.; Pérez, G.D.; Quesada-Goméz, J.D. Stem Cell Research and Molecular Markers in Medicine. **Comprehensive Biotechnology**, 2nd edition, v. 5, p. 455-466, 2011.

Chamberlain; G. et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, v. 25, p. 2739–2749, 2007

Corradetti, B. et al. Mesenchymal Stem Cells from Amnion and Amniotic Fluid in Bovine. **Reproduction**, v.145, p. 391–400, 2013

Duenas, F. et al. Hepatogenic and Neurogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Abattoir-derived Bovine Fetuses. **BMC Vet Res.** v. 10:154, 2014. doi: 10.1186/1746-6148-10-154

Gao, Y. et al. Multilineage Potential Research of Bovine Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells. **Int. J. Mol. Sci.** v. 15, p. 3698-3710, 2014.

Gollner, H. et al. Impaired ossification in mice lacking the transcription factor Sp3. **Mech. Dev**, v.106, p.77-83, 2001.

Granchi, D. et al. Gene expression patterns related to osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells during *ex vivo* expansion. **Tissue Engineering**, v.16, n.3, p.511-524, 2010.

Guercio, A. et al. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. **Cell Biol. Int**, v.37, p.789-798, 2013.

Herath, S. et al. Use of the cow as a Large Animal Model of Uterine Infection and Immunity. **J. Reprod. Immunol..** v.69, p.13-22, 2006

Howitz, E.M. et al. Clarification of the Nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy Position Statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005

Im, G.; Shin, Y-W.; Lee, K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? **Osteoarthritis Cartilage**, v. 13, n.10, p.845–853, 2005

Jurgens, W.J.F.M. et al. Effect of tissue-haversting site on stem cells derived from aipose tissue: implications for cell-based therapies. **Cell Tissue Res**, v.332, p. 415-426, 2008

Kavanagh, D.P.; Robinson, J.; Kalia, N. Mesenchymal Stem Cell Priming: Fine-Tuning Adhesion and Function. **Stem Cell Rev Rep.** v.10, p. 587-599, 2014.

Lange-Consiglio, A. et al. Isolation, molecular characterization and in vitro differentiation of bovine Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal cells. **Theriogenology**, 2016.

439-450, 2014

Lu, T. et al. Isolation and Characterization of Adipose-derived Mesenchymal stem Cells (ADSCs) from Cattle. **Appl Biochem Biotechnol.** v. 174, p.719-728, 2014.

Mançanares, C.A.F. et al. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from the Yolk Sacs of Bovine Embryos. **Theriogenology.** 2015. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.031>

Mitchell, J.B. et al. Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell–Associated Marker. **Stem Cells**, v. 24, p. 376–38, 2006.

Nagata, T.; Mitsumori, T.; Iwaguro, H. Adipose Tissue-Derived Stem and Regenerative Cells for Tissue Regeneration. **J Oral Biosci**, v.55, p.127-131, 2013.

Oh, S.K.W.; Choo, A.B.H. Stem Cells. **Comprehensive Biotechnology**, 2ª Edição, v.1, p. 341-365, 2011.

Peptan, I.A.; Hong, L.; Mao, J. Comparison of Osteogenic Potentials of Visceral and Subcutaneous Aipose-Derived Cells of Rabbits. **Plast Reconstr Surg.** v. 117, p. 1462-1470, 2006.

Ren, G. et al. Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-mediated Immunosuppresion. **Stem Cells.** v.27, p. 1954-1962, 2009

Rickard, D.J. et al. Induction of Rapid Osteoblast Differentiation in Rat Bone Marrow Stromal Cell Cultures by Dexamethasone and BMP-2. **Dev. Biol**, n.161, p.218-228, 1994.

Rossi, B. et al. Isolation and In Vitro Characterization of Bovine Amniotic Fluid Derived Stem Cells at Different Trimesters of Pregnancy. **Stem Cell Rev Rep.** v.10, p. 712-724, 2014

Sampaio, R.V. et al. Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: isolation, characterization, and multipotentiality. **Genet. Mol. Res.**, v.14, n.1, p.53-62, 2015.

Schipper, B.M. et al. Regional Anatomic and Age Effects on Cell Function of Human Adipose-derived Stem Cells. **Ann Plast Surg.** v.60, p. 538-544, 2008.

Serakinci, N.; Fahrioglu, U.; Christensen, R. Mesenchymal Stem Cells, Cancer Challenges and New Directions. **Eur. J. Cancer**, v.50, p. 1522–1530, 2014

Standal, T.; Borset, M.; Sundan, A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. **Exp. Oncol.**, v.26, n.3, p.179-184, 2004

Vary, C.P.H. et al. Involvement of Ets transcription factors and targets in osteoblast differentiation and matrix mineralization. **Exp. Cell. Res.**, v.257, p.213-222, 2000

Vidal, M.A. et al. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cell: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v.36, p.613-622, 2007.

Zhao, Y.; Waldman, S.D.; Flynn, L.E. The effect of serial passaging on the proliferation and differentiation of bovine adipose-derived stem cells. **Cells Tissues Organs**, v.195, p.414-427, 2012.

Zuk, P.A. et al. Human Adipose Tissue is a Source of Multipotent Stem Cells. **Mol. Biol. Cell.**, v.13, p.4279-4295, 2002.

Xiong, H.et al. Biological Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Bovine Umbilical Cord. **Animal Cells and Syst.** v. 18, n.1, p.59-67, 2014.