

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

**TOXICIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS ESTROMAIS DE TECIDO ADIPOSEO DE
CÃO EM DIFERENTES PASSAGENS DE CULTURA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Arícia Gomes Sprada

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**TOXICIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS ESTROMAIS DE TECIDO ADIPOSEO DE CÃO
EM DIFERENTES PASSAGENS DE CULTURA**

Arícia Gomes Sprada

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica e Cirurgia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Luis Ney Pippi

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A comissão Examinadora, abaixo assinadas, aprova a Dissertação de
Mestrado

**TOXICIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS
ESTROMAIS DE TECIDO ADIPOSEO DE CÃO EM DIFERENTES
PASSAGENS DE CULTURA**

elaborada por

Arícia Gomes Sprada

como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ney Luis Pippi
(Presidente/Orientador)

Alexandre Mazzanti

Daniel Curvello de Mendonça Müller

Santa Maria, 04 de setembro de 2014

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Jackson e Eliane, pelo apoio, incentivo e carinho dedicado durante todos esses anos. Também à minha irmã, Alana, pela amizade. O amor de vocês é a minha fonte de energia.

Ao meu professor orientador, Ney Luis Pippi, pela oportunidade e confiança, mas principalmente pelo exemplo. Sinto-me orgulhosa de ter sido orientada por um dos maiores nomes da medicina veterinária.

À equipe, Saulo Pinto, Jaime Aramburú, Tiago Treichel, Priscila Kasper, Gabriele Serafini, Pedro Marchan e Francieli Marconato pelas experiências compartilhadas e pela amizade. Principalmente ao Saulo e Priscila que me ajudaram muito nos meus momentos de crise e dúvidas, e ao Jaime pelos sábios conselhos.

Ao meu estagiário Matheus Pippi que foi fundamental na fase experimental, sem ele esse trabalho não seria possível.

Aos meus colegas e amigos da Pós-Graduação, gostaria de agradecer pela força que me deram em todos os momentos e que as amizades que fiz (ou que mantive) durante esses anos de pós durem uma vida inteira e que a gente mantenha contato. Em especial gostaria de agradecer Bernardo Schmitt, Fernando Wiecheteck, Rafael Chaves (Valeu também pelo material, Rafa), Marília Oliveira, João Pedro Scussel e Renato Libardoni.

Aos colegas do Biorep da UFSM que disponibilizaram seu tempo e recursos para que este trabalho tivesse continuidade, principalmente ao Werner Glandzner e ao Professor Paulo Bayard.

À equipe do laboratório de Biogenômica da UFSM que fizeram as análises deste experimento. Obrigada Alencar, Verônica, Francine e Thalís pela disponibilidade, sempre sendo muito atenciosos e pacientes comigo. Também a professora Ivana Cruz por me emprestar a equipe e o laboratório.

Um obrigado imenso aos meus queridos amigos: Carlos Cavalheiro, Hellen Hartmann, Raquel Baumhardt, Maurício Borges e Alisson Silveira, e ao meu primo Jeferson, vocês foram essenciais para minha sanidade.

Ao Rafael Huppés que me deu apoio durante essa fase e por compreender minha ausência. Obrigada por estar na minha vida.

Aos demais professores da pós-graduação pelo conhecimento compartilhado.

Ao CNPQ pela bolsa e recursos para o experimento e à Universidade Federal de Santa Maria.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

Toxicidade e estresse oxidativo das células mesenquimais estromais de tecido adiposo de cão em diferentes passagens de cultura

Autora: Arícia Gomes Sprada

Orientador: Prof. Dr. Ney Luis Pippi

Santa Maria, Setembro 2014.

As células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação e diferenciação em diversas linhagens celulares. Estas células podem ser encontradas nos mais variados tecidos, como medula óssea, pele, tecido nervoso, tecido adiposo e polpa dentária. O tecido adiposo é fonte alternativa de células-tronco mesenquimais, apresentando-se como método menos invasivo e permitindo coleta de maior quantidade celular em comparação a medula óssea. Nos humanos, o tecido adiposo apresenta diferenças de metabolismo, conforme a localização anatômica. Em camundongos, foram observadas diferenças em relação à composição celular e à capacidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs), de acordo com as regiões anatômicas. Com o intuito de auxiliar pesquisadores na escolha do sítio de coleta e as melhores linhagens celulares, este trabalho teve como objetivo comparar a viabilidade e a qualidade de células mesenquimais estromais multipotentes (CMEM) derivadas do tecido adiposo subcutâneo e do omento maior de cão através de indicadores de citotoxicidade e estresse oxidativo em seis diferentes passagens de cultura. Para isso foram coletados tecido adiposo do omento e subcutâneo de um cadáver fresco de cão oriundo da rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria. As células foram processadas e cultivadas em atmosfera umidificada a CO₂ 5%, sendo posteriormente coradas com Azul de Tripán e contadas em câmara de Neubauer. Para avaliar a citotoxicidade foi utilizada a técnica de fragmentação e fluorimetria com corante Picogreen. O nível de estresse oxidativo foi medido através do ensaio fluorimétrico do 2-70-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) e níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados mostraram que a primeira e última passagem em ambos os grupos são as passagens mais submetidas ao estresse oxidativo ficando mais sujeitas à citotoxicidade.

Palavras-chave: Terapia Celular, Cultura, Membrana, Espécies Reativas.

ABSTRACT

Master thesis

Post-graduate Program in Veterinary

Federal University of Santa Maria

Toxicity and oxidative stress of canine mesenchymal stromal cells from adipose tissue in different culture passages

Author: Arícia Gomes Sprada

Adviser: Prof. Dr. Ney Luis Pippi

Santa Maria, Setembro 2014.

Stem cells are undifferentiated cells capable of autorenewal and differentiation in several cell lines. These cells can be found in various tissues such as bone marrow, skin, nervous tissue, adipose tissue and dental pulp. Adipose tissue is an alternative source of mesenchymal stem cells because it consists in a less invasive collection and provides higher number of cells when compared to bone marrow. In humans, adipose tissue metabolism differs according to the anatomical location. In mice, differences in the cellular composition and differentiation capacity of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (ADSCs) were observed according to the anatomical regions. In order to assist researchers in choosing the site of collection and the best cell passage, this study aimed to compare the viability and quality of multipotent mesenchymal stromal (CMEM) derived from subcutaneous and omentum of a dog through indicator of cytotoxicity and oxidative stress in six different passages of culture. The samples of adipose tissue from the both sites were collected from a dog corpse. Cells were processed and cultured in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and subsequently stained with Trypan Blue and counted in a Neubauer chamber. To assess cytotoxicity the technique of fragmentation and fluorimetry with picogreen dye was used. Also, oxidative stress assays were performed by using fluorimetric assay 2-70-dichlorofluorescein diacetate technique (DCFH-DA) and measuring the levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS). The results showed greater levels of oxidative stress in the first and last passages of both groups, favoring cytotoxicity and cell death.

Key Words: Cell therapy, DNA, culture

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Porcentagem de estresse oxidativo medido pelo ensaio de DCFH-DA durante seis passagens de cultura de células-tronco mesenquimais de origem adiposa de subcutâneo e omento de cão.....24
- Figura 2 – Peroxidação lipídica medida pelo ensaio TBARS durante seis passagens de cultura de células-tronco mesenquimais de origem adiposa de subcutâneo e omento de cão.....25
- Figura 3 – Porcentagem de DNA livre medido pelo ensaio de Fragmentação do DNA por análise fluorimétrica com corante Picogreen.....25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tempo (dias) para confluência celular atingir 90% da capacidade da garrafa de cultivo, número de células por milímetros e porcentagem de viabilidade em cada passagem do cultivo de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo do subcutâneo e omento de cão.....	23
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Células-Tronco.....	11
2.2 Células Mesenquimais Estromais de Tecido Adiposo.....	12
2.3 Estresse Oxidativo.....	13
2.4 Citotoxicidade.....	14
2.5 Fragmentação do DNA.....	15
2.6 DCFH-DA.....	16
2.7 TBARS.....	16
3 ARTIGO.....	17
4 CONCLUSÃO.....	31
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos, ramo das ciências biomédicas que mais tem recebido atenção na atualidade, apresenta, entre outros objetivos, a possibilidade de restaurar a função de um órgão ou reparar um tecido danificado por doenças ou traumas ou mesmo prejudicados pelo envelhecimento através da combinação de células, materiais e engenharia. Esta prática possibilita o desenvolvimento de um grande número de pesquisas envolvendo as células-tronco como ferramenta para alcançar a regeneração tecidual (LANGER & VACANTI, 1993).

As células-tronco, devido sua habilidade de autorrenovação e diferenciação, representam uma estratégia terapêutica importante no âmbito da terapia celular. A possibilidade de isolar e expandir estas células em cultivo para posterior utilização no tratamento clínico de diversas doenças em humanos e animais ou no desenvolvimento e avaliação de novas drogas tem atraído a atenção da comunidade científica (MAITRA et al., 2005). A cultura celular consiste na manutenção e expansão de células *in vitro* onde se pode induzir ou não a diferenciação celular. Esta cultura permite a análise de comportamento, metabolismo, mecanismos de regulação, síntese, destino de produtos celulares e outros aspectos de funcionamento da célula (LUISI et al., 2004).

No entanto, é importante ressaltar que células-tronco mantidas em cultura estão submetidas a um ambiente de estresse (HALLIWEEL & WHITEMAN, 2004). Portanto, longos períodos de cultura podem causar alterações celulares importantes, levando à morte celular ou o desenvolvimento de anormalidades cromossômicas (MAITRA et al., 2005). Essas complicações devem ser atentamente estudadas, pois alterações como estas podem resultar em carcinogênese, impedindo a aplicação terapêutica destas células (FURLANI et al., 2009).

Tendo isso em vista, células-tronco cultivadas devem ser estudadas quanto a sua estabilidade genômica, viabilidade e função a fim de garantir sua segurança no tratamento e reconstrução de tecidos e órgão (BOCHKOV et al., 2007). Este trabalho tem por objetivo avaliar o nível de estresse oxidativo a qual as células-tronco mesenquimais estromais de origem adiposa de cão estão submetidas ao longo de seis passagens. Além disso, também foram avaliados os danos causados por este estresse em cada passagem da cultura celular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células-tronco

As células-tronco apresentam duas características que as tornam promissoras no ramo da terapia celular, a sua capacidade de se autorrenovar e de se diferenciar em diversos tecidos (LEMISCHKA, 2005). Por esse motivo acredita-se que as células-tronco desempenham papel fundamental no processo regenerativo dos tecidos frente a uma lesão ou perda tecidual (FODOR, 2003). Essas células podem ser encontradas em diferentes tecidos e são classificadas quanto ao seu potencial de diferenciação em células totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. As células-tronco totipotentes e pluripotentes são encontradas no embrião, e por isso, são consideradas células embrionárias (CTE). As CTE são consideradas as mais plásticas e com maior capacidade de autorrenovação, porém, fatores éticos envolvendo a obtenção desse tipo celular, formação de teratomas e reações imunológicas induzidas pelo seu transplante limitam sua aplicação na clínica e em pesquisa (JUNG, 2009).

As células-tronco multipotentes e unipotentes são encontradas em uma variedade de tecidos pós-natal, sendo chamadas de células-tronco adultas (CTA). Dentre os tecidos e órgãos descritos como fontes dessas células estão: medula óssea, tecido adiposo, rim, fígado, tendões, membrana sinovial e polpa dentária (FORTIER, 2005). Por permitirem seu isolamento de maneira mais conveniente e apresentarem baixa imunogenicidade as CTA representam uma ótima opção no âmbito da terapia celular (TOMA, 2002).

Primeiramente, as CTA foram isoladas da medula óssea e colocadas em placas Petri de plástico onde aderiram e cresceram em colônias com morfologia fibroblásticas. Essas colônias foram denominadas colônia de fibroblasto ou de células estromais medulares. Hoje em dia, essas células são chamadas de células-tronco mesenquimais ou células-tronco mesenquimais estromais (CTME) baseado na sua capacidade de se diferenciar em tecidos mesodérmicos, como por exemplo, osso, cartilagem e gordura (ZUK, 2002).

Para a classificação de uma célula como célula mesenquimal estromal a International Society for Cellular Therapy exige três requerimentos mínimos a serem apresentadas: as CTME devem ser isoladas de uma população de células mononucleares com base à sua aderência seletiva, em cultura, à superfície de plástico; Devem expressar CD 105, CD 73 e CD 90 e não expressar CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79, CD19 e HLA-DR em mais de 95% das células em cultura; devem ser capazes de se diferenciar em células ósseas, de gordura e cartilagem (HORWITZ, 2005).

O grande fator limitador na caracterização das CTME é a ausência de um marcador positivo específico. Há uma variedade de expressão de marcadores e cada grupo de estudo usa diferentes marcadores. Essa diversificação de expressões pode ser justificada pelos diferentes métodos de culturas e isolamento celular, bem como, diferentes origens de tecido e espécie (HORWITZ, 2005). Embora oito marcadores já tenham sido descritos, a International Society For Cellular Therapy concorda que apenas a identificação dos marcadores CD 105, CD73 e CD90 seja o suficiente para a imunofenotipagem dessas células. No entanto, é importante que a aderência celular em plástico e a diferenciação em, pelo menos, duas linhagens distintas estejam presentes (HORWITZ, 2005).

2.2 Células mesenquimais estromais originadas de tecido adiposo

A medula óssea foi considerada a principal fonte de células-tronco durante muitos anos. Atualmente, sabe-se que as células-tronco mesenquimais adultas estão presentes em praticamente todos os órgãos e tecido como cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea músculo e gordura (MEIRELLES et al, 2006). Devido à facilidade de colheita e abundância de células, as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMTA) tornam-se uma ótima alternativa para pesquisas em terapia celular (KERN et al, 2006).

Além da baixa morbidade da coleta de tecido adiposo (TA), as células extraídas desse tecido apresentam taxa de sucesso de isolamento, frequência de colônia, potencial de expansão, capacidade de diferenciação e fenótipo imunológico similares às aquelas obtidas através da medula óssea (KERN et al., 2006).

Nos humanos, o tecido adiposo apresenta diferenças de metabolismo, conforme a localização anatômica. Em camundongos, pesquisadores observaram diferenças em relação à composição celular e à capacidade de diferenciação das CTMTA de acordo com as regiões anatômicas (FRÜHBECK *et al.*, 2001). Assim, parece provável que o tecido adiposo seja composto de diferentes subtipos de células-tronco, dependendo da localização anatômica. No entanto, são necessários mais estudos comparativos acerca da natureza celular e do potencial de diferenciação das CTMTA isoladas de regiões anatômicas distintas.

Segundo Prunet-Marcassus *et al.* (2006), tecido adiposo branco e marrom são amplamente reconhecidos como diferentes em termos de metabolismo e composição celular. Os depósitos de tecido adiposo branco de sítios anatômicos diferentes, especialmente do espaço subcutâneo em relação aos sítios internos, também exibe

propriedades metabólicas e funções diferentes. Os autores concluíram em seus estudos que o tecido adiposo aparece como tecido complexo, composto de subconjuntos de células diferentes de acordo com a natureza e o local anatômico. Também sugerem que outras investigações deste tipo levarão ao surgimento de novas idéias fundamentais para fazer progredir o conhecimento da biologia do tecido adiposo.

2.3 Estresse oxidativo

Radical livre (RL) é o termo utilizado para definir qualquer espécie de átomo ou molécula que possua um ou mais elétrons de valência desemparelhados. Este desemparelhamento pode decorrer pela perda (oxidação) ou ganho (redução) de um elétron de uma substância. Devido a esta característica são altamente instáveis, quimicamente muito reativos e com meia vida curta (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, mitocôndria ou membranas celulares. Estão também intimamente envolvidos nos processos fisiológicos dos organismos, pois atuam como mediadores para transferência de elétrons em diversas reações, possibilitando geração de ATP, ativação de genes e participando de mecanismos de defesas, regeneração tecidual, sinalização hormonal, regulação redox intracelular e embriogênese (SHAMI & MOREIRA, 2004; AGARWAL, A. et al., 2008)

Porém, quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos antioxidantes (AO) ocorre um processo denominado estresse oxidativo (EO). Este desequilíbrio pode ser resultante de um aumento na produção de RL, ou ainda, devido à diminuição de AO (FANG, Y.Z., et al., 2002). Este excesso de RL reage com qualquer componente celular como proteínas, lipídios e ácido nucléico, dependendo do seu sítio de formação (ROSENFELDT, F., et al., 2013). Estas reações desencadeiam danos celulares que, dependendo da intensidade do estresse, podem acionar o mecanismo de apoptose ou necrose celular (CULOTTA, V.C., 2000). A longo prazo, a exposição ao estresse oxidativo pode implicar no aparecimento de doenças crônicas como aterosclerose, diabetes, distúrbios degenerativos e câncer (GREEN, K., et al., 2004). O acúmulo de dano oxidativo intracelular está relacionado ao envelhecimento da célula *in vitro* e conseqüentemente à diminuição do potencial de proliferação e diferenciação (RAO & MATTSON, 2001).

Os radicais livres podem ser classificados em espécies reativas e oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). As EROS ainda são subdivididas em radicalares, como: o superóxido (O_2), hidroxil (OH), peróxil (RO_2) e hidroperoxil (HRO_2); e não

radicalares, como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hidrocloreto. As espécies não radicalares não possuem elétron desemparelhado, porém são consideradas radicais livres devido a sua alta instabilidade. As ERN são compostas pelo óxido nítrico (ON) e dióxido de nitrogênio (NO_2) (EVANS et al., 2002).

Para melhor compreensão do comportamento dos radicais livres e estresse oxidativo é importante entender a ação dos antioxidantes. AO é qualquer substância endógena ou exógena capaz de neutralizar um radical livre (VANNUCCHI H et al., 1998). Os mecanismos de inibição ou redução dos danos causados pelos radicais livres podem ser preventivos, ou seja, impedindo a formação destes, ou ainda, reconstrutivos, favorecendo o reparo das estruturas lesadas (KOURY & DONANGELO, 2003). Os antioxidantes podem ser de origem enzimática, como o superóxido dismutase, a catalase, a glutatona peroxidase e a glutatona redutase. E também, de origem não enzimática, incluindo a glutatona tripeptídeo e as vitaminas A, C e E (SIES, 1997).

2.4 Citotoxicidade

Diferentes fatores podem levar à lesão celular, como privação de oxigênio, isquemia, agentes físicos, químicos e infecciosos, defeitos genéticos, reações imunológicas e desequilíbrio nutricional. Esta lesão pode ser reversível, levando à alterações morfológicas, porém quando o estímulo é removido há a recuperação celular. Ou ainda, irreversível, quando estes estímulos ultrapassam o limiar de reversibilidade causando a morte celular através de dois mecanismos possíveis: necrose ou apoptose (ROBBINS & COTRAN, 2005). A necrose é um processo no qual ocorre edema celular e destruição das membranas. Assim, há a liberação de enzimas dos lisossomos que degradam o restante dos componentes celulares, incluindo o núcleo (BURLACU et al., 2001). Diferentemente da necrose, a apoptose é um processo de morte programada, desta forma as membranas celulares permanecem íntegras enquanto o citoplasma e o núcleo são degradados por enzimas (McCONKEY, 1998).

O quadro de estresse oxidativo é um dos principais contribuintes para a toxicidade da célula, pois excede a capacidade de defesa celular causando dano às biomoléculas. As principais lesões celulares na presença de radicais livres são a peroxidação dos lipídios das membranas, oxidação de proteínas e lesões ao DNA (PUJATLÉ et al., 2011). Dentre essas alterações, a peroxidação lipídica é a mais comum, pois as membranas celulares são mais susceptíveis a ação dos radicais livres. As membranas celulares e organelas são formadas por uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados.

Essas estruturas sofrem a abstração do átomo de hidrogênio pelos radicais livres, iniciando o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL & GUITTERIDGE, 2007). A permeabilidade das membranas se altera prejudicando sua seletividade nas trocas iônicas e na liberação do conteúdo das organelas, culminando na formação de outros produtos citotóxicos, como o malonaldeído, e conseqüentemente na morte celular (HALLIWELL & GUITTERIDGE, 2007).

A oxidação das proteínas é mediada, principalmente, pelo radical superóxido que reduz o Fe^{3+} das proteínas inativando-as. Proteínas oxidadas perdem sua função e ficam susceptíveis à ação das proteinases sendo removidas do organismo. No entanto, a oxidação exagerada de proteínas está relacionada a doenças como diabetes, aterosclerose e neurodegeneração. Além disso, a oxidação proteica pode ter algum papel controlador no remodelamento e crescimento celular. O principal produto deste oxidação é a liberação de radicais aldeídos (DEAN et al., 1997).

O DNA pode ser alvo de radicais livres, principalmente o radical hidroxil, peróxido nítrico e aldeídos, e as alterações causadas por esses radicais são variáveis, sendo muitas vezes corrigidas por enzimas. Porém, quando esta reparação não ocorre o DNA fica exposto à mutações levando à instabilidade do genoma e possibilitando o aparecimento de doenças genéticas e até mesmo câncer em um quadro denominado genotoxicidade (RILEY, et al., 2008).

Segundo Dualibi et al. (2012), o cultivo de às células-tronco podem levar a perda da integridade genômica, principalmente durante longos períodos de cultura e passagens *in vitro*, o que pode ocasionar a aquisição de um fenótipo similar a um tumor cancerígeno.

2.5 Fragmentação do DNA por análise fluorimétrica com corante Picogreen

Durante o processo de morte celular, seja por apoptose ou necrose, há a liberação de DNA. Este DNA livre pode ser observado no plasma e urina de pacientes com câncer ovariano, artrite reumatóide, sepse e dengue. O nível elevado de DNA livre na circulação pode estar associado à gravidade da doença e, por esse motivo, a mensuração de DNA livre tem sido estudada como um possível biomarcador capaz de auxiliar na previsão de prognóstico em diversas doenças (HA, et al., 2011).

Nos últimos anos a análise quantitativa de DNA utilizando corantes fluorescentes começou a ser feita. Recentemente, Georgiou e colaboradores (2009) desenvolveram um protocolo em que a análise da quantidade de DNA é medida por fluorimetria. Nesta técnica, corantes ultrasensíveis como o DNA picogreen ligam-se apenas ao DNA que

está em dupla-fita (doublestrand ou dsDNA). O corante consegue detectar uma quantidade mínima de dsDNA no meio (25 pg/ml).

2.6 DCFH-DA

O ensaio fluorimétrico da 2,7 dicloro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA) é baseado na desacetilação desta substância por esterases citosólicas em diclorofluorescina (DCFH). A DCFH é um produto não fluorescente que quando em contato com espécies reativas é convertido em diclorofluoresceína (DCF). A DCF, por sua vez, possui característica fluorescente e é facilmente visualizada, pois quando excitada a 488nm emite luz de 525 nm. Este ensaio é comumente utilizado para medir o nível de espécies reativas, principalmente o peróxido de hidrogênio, sendo diretamente proporcional à intensidade da fluorescência (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

2.7 TBARS

Para avaliação da peroxidação lípidica, pode-se realizar a mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método se baseia na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rósea que pode ser quantificado pela leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532nm. Esta reação ocorre em pH ácido e em temperaturas entre 90 e 100°C (BUEGE & AUST, 1978).

3 ARTIGO

TOXICIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS DE TECIDO ADIPOSEO DE CÃO EM DIFERENTES PASSAGENS DE CULTURA

Arícia Gomes Sprada e Ney Luis Pippi

(Artigo a ser submetido para publicação – Pesquisa Veterinária Brasileira)

Toxicity and oxidative stress of canine mesenchymal stromal cells from adipose tissue in different culture passages¹

Arícia Gomes Sprada², Matheus Pippi da Rosa², Alencar Kolinski Machado³, Ney Luis Pippi², Paulo Bayard², Ivana Beatrice Mânica da Cruz³

ABSTRACT.- Sprada A.G., Rosa, M.P., Machado A.K., Pippi N.L., Bayard P., Cruz I, B.M. 2014. **[Toxicity and oxidative stress of canine mesenchymal stromal cells from adipose tissue in different culture passages.]** Toxicidade e estresse oxidativo das células mesenquimais estromais do tecido adiposo de cão em diferentes passagens de cultura. *Pesquisa veterinária Brasileira 00(00)00-00*. Laboratório de Cirurgia Experimental, Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. Email: aricia.sprada@hotmail.com

Stem cells in regenerative therapy have received attention from researchers in recent decades. The culture of these cells allows studies about their behavior and metabolism. Thus, cell culture is the basis for cell therapy and tissue engineering researches. A major concern regarding the use of cultivated stem cell in human or veterinary clinical routine is the risk of carcinogenesis. Cellular activities require a balanced redox state. However, when there is an imbalance in this state, oxidative stress occurs. Oxidative stress contributes to cytotoxicity, which may result in cell death or genomic alterations, favoring the development of cancer cells. The aim of this study was to determine whether there are differences in the behavior of cultured mesenchymal stem cells from canine adipose tissue according to its site of collection (omentum and subcutaneous) evaluating the rate of proliferation, viability, level of oxidative stress and cytotoxicity over six passages. For this experiment, two samples of adipose tissue from subcutaneous and omentum were taken from a female dog corpse, 13 years old, Pitbull. The results showed greater levels of oxidative stress in the first and last passages of both groups, favoring cytotoxicity and cell death.

Index Terms: stem cell, culture, passage, cell viability, free radicals.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração clínica e cirurgia, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maira (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. * Autor para correspondência: aricia.sprada@hotmail.com

³ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria.

RESUMO.- O uso de células-tronco como terapia regenerativa tem recebido atenção de pesquisadores nas últimas décadas. A possibilidade de cultivá-las permite o estudo de seu comportamento e metabolismo. Assim, o cultivo celular representa a base para pesquisas de terapia celular e engenharia de tecidos. Uma das principais preocupações relativa ao uso de células-tronco cultivadas na rotina clínica humana ou veterinária é a reprogramação dessas células em tumores benignos ou malignos. As atividades celulares necessitam de um estado redox balanceado e quando há algum desequilíbrio nessas reações ocorre o estresse oxidativo. O quadro de estresse oxidativo contribui para a citotoxicidade podendo resultar em morte celular e até mesmo em alterações genômicas e ocorrência de células cancerígenas. O objetivo deste trabalho foi verificar se há diferenças no comportamento de células-tronco mesenquimais estromais de tecido adiposo de cão de acordo com o seu tecido de coleta (omento e subcutâneo) avaliando o cultivo dessas células quanto a sua taxa de proliferação, viabilidade, estresse oxidativo e citotoxicidade ao longo de seis passagens. Para a execução deste experimento foram utilizadas duas amostras de tecido adiposo coletas do subcutâneo e omento do cadáver de um cão, fêmea, 13 anos de idade, da raça Pitbull. O cadáver era oriundo do Hospital Veterinário Universitário e sofreu eutanásia devido a complicações no seu quadro de cardiomiopatia. As duas amostras foram encaminhadas para o isolamento e cultura celular. Os resultados mostraram que a primeira e última passagem em ambos os grupos são as passagens mais submetidas ao estresse oxidativo ficando mais sujeitas à citotoxicidade.

Termos de Indexação: células-tronco, cultura, passagem, viabilidade celular, radicais livres.

INTRODUCTION

Stem cells (SC) are investigated since 1960 when Ernest A. Mac Culloch and James E. Till observed for the first time a certain undifferentiated bone marrow cell with the ability of self-renewal, self-generation and differentiation (Bonventre & Yang et al. 2003). Since then stem cells are considered a promise in the field of regenerative medicine and many studies have been developed for their better understanding (Fortier 2005). SC can be classified according to their origin: embryonic stem cells (ESC) are derived from embryos, more specifically in the blastocyst stage, and are able to differentiate themselves in all cell types; adult stem cells (ASC) are found, virtually, in any tissue, however their differentiation is limited to their germ layer origin (Tuan, Boland & Tuli 2003).

The first studies with embryonic stem cells (EST) were performed in mice in 1981. Subsequently in 1998 a study with EST derived from a human embryo was reported and it raised ethical and religious issues (Thomson 1998). Due to the controversy involved in the use of EST, adult stem cells became an alternative to new research in cell therapy (Williams 2007). Within literature, ASC isolation has been reported in bone marrow, adipose tissue, kidney, liver, tendon, synovial membrane, amniotic fluid, placenta, umbilical cord and dental pulp (Fortier 2005). Among those, adipose tissue was shown to be a reliable and easily accessible source (Kern, Eichler & Stoeve 2006).

The expansion and cultivation of adult and embryonic stem cells allowed significant progress in the fields of regenerative medicine and tissue engineering, as well as in the pharmaceutical industry, in the development and evaluation of new drugs (Sareen 2009). Nevertheless, particular issues must be clarified before cultivated stem cells are widely used in clinical routine. The major concern regarding the cultivation of adult and embryonic stem cells is the development of chromosomal abnormalities, possibly leading to loss of function or potentiating the risk of carcinogenesis. These complications may prevent the therapeutic application of stem cells and should be investigated carefully (Sareen 2009 ; Furlani 2009).

One of the main factors that could be related to chromosomal instability in cultured cells is oxidative stress (OS) (Riley et al. 2008). Some free radicals are physiologically generated during cellular metabolism and often play an important role as messengers and regulators in proliferation, differentiation and apoptosis processes (Dröge 2002; Halliwell 2007). However, when free radical and reactive oxygen species are not regulated by a cascade of antioxidants systems, oxidative stress occurs. OS is detrimental to cells causing ruptures of membranes, protein degradation and DNA damage, which may lead to cell death or genomic abnormality, also favoring the occurrence of carcinogenesis (Pujatlé et al. 2011).

The aim of this study was to evaluate the rate of proliferation, viability, oxidative stress and damage of mesenchymal stem cell from canine subcutaneous and omental adipose tissue over six passages.

MATERIAL AND METHOD

For this work it was utilized the corpse of a 13-year-old, female, Pitbull from the Veterinary Hospital routine. The patient was euthanized due to complications of dilated cardiomyopathy and its death had no relation with this experiment. The owners donated

the corpse for research. At about 30 minutes after euthanasia, the samples of adipose tissue were removed from subcutaneous (SUB) and omentum (OM). For the transport of the material previous to cells' isolation, the adipose tissue was separately in falcon tubes containing Hanks' balanced solution (1% streptomycin, 1% amphotericin B) to avoid contamination.

Inside the laminar flow, the fragments of adipose tissue from SUB and OM were transferred to two Petri plates. Making use of two scalpel blades each fat was sectioned into small fragments. These fragments were placed separately in 50 mL falcon tube along with 2mg/mL collagenase type I in order to promote tissue degradation. The tubes remained in water bath at a temperature of 37° for 40 minutes being manually shaken every 10 minutes. After this process, the tubes were referred to laminar flow again and complete DMEN medium (1% penicillin, 1% amphotericin B, 10% fetal bovine serum) was added to the solution at a ratio of two parts of medium to one part of collagenase to neutralize the collagenase, given its cytotoxicity. The tubes were centrifuged at 600 G for ten minutes. The supernatant was discarded and a new complete medium was added to the cells pellet. The latter solution was transferred to a cell culture flask identified with SUB and OM according to the tissue origin. The flasks were maintained in a CO₂ incubator at 37° and 5% concentration of carbon dioxide. The first medium exchange was performed every 24 hours, the following exchanges were realized at every 72 hours. The cells were submitted to six passages and each passage length varied according to the cell growth. When the flask reached 90% of cell confluence, a new passage was made.

Each passage was performed after complete removal of the medium by adding 2.5mg/mL trypsin in the flask to remove cells from the plastic. The bottles were subsequently placed in the CO₂ incubator for five minutes. At the end of this process a new complete medium was placed to inactivate trypsin. The solution from the bottle was then transferred to falcon tubes and centrifuged for five minutes at a speed of 1900 rpm. The precipitate obtained was allocated in the cell culture flask along with complete medium. For every passage the rates of viability, proliferation, cytotoxicity and oxidative stress were assessed.

The viability and proliferation rates were estimated by counting viable and non-viable cells in a Neubauer chamber. For this 20 µl of the cell solution was placed in a 1mL micro tube and it was added 20 µl of trypan blue dye at 0.4%. Cells were counted in a Neubauer chamber and the estimation was performed using the following formula: Number of cell per mL = Number of cells counted x dilution coefficient x 10⁴. The number of cell

counted was divided by the number of quadrants counted. The dilution coefficient was defined by the rate of cell suspension and the amount of dye (i.e., 1:1) which results in two.

Cytotoxicity was measured by means of the DNA fragmentation by fluorimetric Picogreen analyses. A small amount of DNA picogreen was added to the samples, which remained at rest in the dark for five minutes. Soon after, the free-DNA concentration was measured by the fluorometer excited at 485 nm wavelength and fluorescence intensity at 520 nm. Samples were prepared in quadruplicate.

The production of oxidative stress was evaluated using a non-fluorescent cell-permeating compound 2-(2,2-dichlorofluorescein diacetate) (DCFH-DA assay). DCFH-DA is hydrolysed by intracellular esterases to dichlorofluorescein (DCFH), which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants. The samples of each culture passage were treated with DCFH-DA for 60 minutes at 37°C. The fluorescence was measured at an excitation wavelength of 485 nm and emission of 520 nm. The calibration curve was performed with standard DCF and the level of reactive oxide species production was calculated as nmol DCF formed/mg protein.

The lipid peroxidation was determined by measuring thiobarbituric acid reactive species (TBARS). The cell solutions were centrifuged for 10 minutes at 2000 rpm, the supernatant was discarded and saline solution (0.9% NaCl) was added, followed by two additional centrifugations at 2000 rpm for 10 minutes. After that, the supernatant was discarded and 100 ml Butylated hydroxytoluene (BHT 100 mM) and 500 µl of trichloroacetic acid (TCA 20%) were added to the sample, followed by final centrifugation at 2000 rpm for 5 minutes. Immediately after centrifugation, two samples with 900 µl of the supernatant were mixed with a reaction medium containing thiobarbituric acid (TBA 0.8%). Then, the samples were incubated at 95°C for one hour. The absorbance was measured at a wavelength of 532 nm in a spectrophotometer. The results were expressed in nmol MDA/10⁶ cells.

The results of this experiment were analyzed with one-way analysis of variance followed by Tukey with GraphpadPrism 5.1 software. P-values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

The adipose tissue samples from both sites studied in this experiment were considered easily accessible and presented sufficient amounts of fat for the isolation of mesenchymal stromal stem cells. The method used for cell isolation and culture was satisfactory in this study and there was no interference, such as contamination or

differentiation of cells, during the experiment. From the first to the sixth passage, the subcutaneous and omentum cells remained with fusiform morphology - similar to fibroblast cells - and adhered to the bottom of the culture flask.

Regarding the viability and proliferation of cells in each passage, there was no statistically significant difference ($P= 0.0283$) between the SC and OM group. However, it was observed that cells derived from subcutaneous tissue needed less time to reach a greater number of cells/ml when compared with the omentum group, except for the third passage. The results are shown in table 1.

Group	Proliferation	Viability	Time
Subcutaneous	(P1) 2×10^6	95,6%	7 days
	(P2) $2,2 \times 10^6$	96,4%	6 days
	(P3) 3×10^6	98,1%	3 days
	(P4) $2,5 \times 10^6$	97%	6 days
	(P5) $2,2 \times 10^6$	97,8%	7 days
	(P6) 2×10^6	96,3%	5 days
Omentum	(P1) 5×10^5	95,6%	7 days
	(P2) 8×10^5	96,2%	13 days
	(P3) $1,5 \times 10^6$	98,9%	5 days
	(P4) 1×10^6	96,2%	5 days
	(P5) 1×10^6	97,5%	7 days
	(P6) 3×10^6	96,7%	7 days

TABLE 1. Time (day) to reach 90% of cell confluence in culture cell flask (75cm^2), number of cells per mL and viability percentage of each passage (P) of cultured mesenchymal stem cell from adipose tissue of canine subcutaneous and omentum.

It was possible to observe that the first passage presented the lowest rate of cell proliferation and viability percentage in both groups. The SC group reached its maximum cell number and viability in the third passage, with a slight decreased result in the subsequent passages. It is worth noting that it took 72 hours for the third passage to reach a 90% of cell confluence. The OM group reached its maximum cell proliferation in the last passage, but the best viability was found in the third passage. The shortest time (5 days) between passages in the OM group occurred in the passages number three and four.

The rate of reactive oxygen species (ROS) was determined by testing diclorofluoresceina diacetate (DCFH-DA), in which it was observed an increase of ROS in the first passage of SC and OM group. The fifth passage of SC group showed lower rate of ROS, whereas in the OM group it was in the sixth passage. There was a statistically significant difference between groups in the fifth and sixth passages for ROS rates. The results are shown in the following figure (FIGURE 1).

Passage	Subcutaneous	Omentum
P1	94,44427 a	91,80975 a
P2	80,90575 a	73,74637 a
P3	88,25431 a	75,21389 a
P4	87,45013 a	75,19928 a
P5	46,58894 b	87,93534 a
P6	81,99699 a	5,727817 c

FIGURE 1. Reactive oxygen species percentage measured by 2-(2,2-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay over six passages of cultured mesenchymal stem cells from adipose tissue of canine subcutaneous and omentum.

Lipid peroxidation was determined by the rate of thiobarbituric acid reactive species (TBARS). The assay demonstrated higher levels of peroxidation in the first passage of the SC group. Conversely, the OM group presented a greater percentage of TBARS in the last passage. For subcutaneous cells, the third passage presented the least peroxidation levels, whereas in the omentum group this trend was observed in the fourth passage. Additional data is presented in the figure (FIGURE 2).

Passage	Subcutaneous (%)	Omentum (%)
P1	50,33436 a	34,99421 a
P2	30,45267 a	36,58749 a
P3	30,06687 a	42,4971 a
P4	30,11831 a	33,31402 a
P5	31,73868 a	40,23754 a
P6	42,23251 a	88,29664 b

FIGURE 2. Lipid peroxidation percentage measured by thiobarbituric acid reactive species (TBARS) over six passages in cultured mesenchymal stem cells from adipose tissue of canine subcutaneous and omentum. Where “a” there is no statistically difference, “b” there is statistically difference.

The percentage of free DNA present in each passage of the culture was evaluated by the DNA fragmentation with Picogreen dye assay. Free DNA has presented its lowest results in the first passage of the SC group and in the fifth passage of the OM, as presented in FIGURE 3. The free DNA greatest percentage occurred in the third and first passage in the SC and OM group, respectively.

Passage	Subcutaneous (%)	Omentum (%)
P1	22,43864 a	81,9571 c
P2	35,51861 a	71,08434 a
P3	92,31987 b	51,11666 a
P4	40,30087 a	62,00411 a
P5	33,37292 a	49,42698 a
P6	32,03484 a	61,46048 a

FIGURE 3. Free DNA percentage measured by DNA fragmentation through fluorimetric Picogreen over six passages in cultured mesenchymal stem cells from adipose tissue of canine subcutaneous and omentum. Where “a” there is no statistically difference, “b” there is statistically difference.

DISCUSSION

The omentum is an intra-abdominal adipose membrane that actively participates in the repair of injured abdominal organs by promoting neovascularization, lymphatic drainage and enhancement of wound healing (Ruffini 1992). In recent years, the omentum has been studied as a source of mesenchymal stem cells and it is known that

these cells are involved in the healing of internal organs and tissue (García-Gómez et al. 2005). In this study, the omentum proved to be a suitable source of stem cells in dogs. This result goes against the findings of Neupane et al. (2008) that did not succeed in the isolation of stem cell from omentum and inguinal fat. The disadvantage of using omentum to isolate stem cells is the need of celiotomy to obtain the material. In this case the samples were collected from a corpse, thus opening the abdominal cavity was not a challenge at present. Moreover, after the abdominal wall incision, the omentum fat was easily located and quickly removed.

Stem cells from subcutaneous adipose tissue are already well discussed in literature. The extraction of subcutaneous fat can be achieved by liposuction or lipectomy and, in both situations, the stem cells are able to be undifferentiated for long periods in culture and have high capacity of differentiation (Danoviz et al. 2010). However, Heimburg and colleagues (2004) found that subcutaneous fat liposuctioned showed a better performance when compared to those removed by excision. In this present experiment, the fat was excised with Metzemaum scissors from the abdominal middle line, and demonstrated a high proliferation capacity in all passages.

Additionally, it may be observed that although there was no statistical difference between OM and SC group, the SC cells presented a rather superior proliferation rate. The SC group presented a progressive increase in cell number, reaching its peak in the third passage with a mild reduction in the subsequent passages. This cell growth behavior was also found by Colleoni (2009) and Patrício (2013), who studied the kinetics of mesenchymal stem cells growth of adipose tissue in horses and dogs, respectively. Similarly, Patrício (2013) reported that the highest peak of proliferation also occurred in passage three. The OM group showed the same pattern of cell growth, despite having a reduced proliferation rate. However, during the sixth passage there was a considerable peak of cell proliferation for the OM group, which was not perceived in the SC group.

The viability rates found in both groups did not statistically differ. Despite the fact that the SC group presented rather better results, both groups were considered highly viable in this experiment. The smallest viability percentage in this experiment was 95.6% in the first passage of SC and OM groups. This was also line with former results of Patrício (2013), in which the lowest rate of viability found was 96% in the first two passages. Conversely, a previous study involving subcutaneous fat from rabbits reported viability rates close to 100% in the first passages, decreasing in the third and reaching the lowest levels in eighth (Treichel 2014).

It is noteworthy that the amount of cells and high viability rates do not necessarily mean a safe therapeutic choice. That is, particularly considering that the expansion and high density of cells *in vitro* tends to favor the development of genomically altered cells (Duailibi 2012). Equally important, oxidative stress has been linked to several cell diseases (Halliwell 2007). The assay of DCFH-DA performed in this paper suggests that the first passage of both groups presented higher rates of reactive oxygen species (ROS). However, in the subsequent passages the level of ROS did not vary significantly until the fifth passage of the SC and the sixth passage of OM group, which happened to be the lowest rate reported throughout the experiment. The authors correlate this simultaneous significant reduction of ROS in the last passage of the OM group with the highest peak of cell proliferation. This suggests that the low levels of free radicals may have influenced the increase of cells proliferation. This phenomenon did not occur in the SC group, but it is possible to argue that the decrease of ROS in SC group was not sufficient to promote a new peak of cell proliferation. Notice that the decreased level of ROS in the OM group was eight times higher than that observed in the SC group. In a similar study using adipose tissue from rabbits, the increase in ROS percentage was correlated with a lower percentage of cell viability (Treichel 2014). This relationship was also observed in the first passage of both groups in the present investigation, nonetheless it did not remain as a constant pattern throughout the passages.

When the lipid structures are damaged by the action of free radicals, there is the ultimate formation of malondialdehyde (MDA) as a subproduct of polyunsaturated acids oxidation. The TBARS analysis identifies the presence of MDA and its increased levels are associated to damage in the cell membranes (Yang et al. 2008). At present, TBARS levels varied between groups. In the SC group the highest rate of lipid peroxidation occurred in the first passage, coinciding with the lowest percentage of viability and high level of reactive oxygen species. This happens due to an alteration in cell permeability caused when the membranes are damaged and, as a result, there is loss of selectivity, thus allowing input and output of nutrients and toxic molecule (Hershko, 1989). In the following passages the percentage of lipid peroxidation varied slightly. The OM group presented higher TBARS levels, nevertheless, it was only in the last passage that it was noted a statistical difference when compared to SC group.

Furthermore, through analysis of data presented in table 3, where the percentage of free DNA was measured, it may be noticed that lipid peroxidation relates to DNA levels. That is mainly because the presence of DNA outside the nucleus implied nuclear membrane damage (Caldecott 2008). At some points, it is also perceived a relationship

between the high level of ROS and the presence of free DNA, as observed in the third passage of SC group and first pass of OM.

In this study, according to tests and assessment results the first and last passages are of particular interest in terms of viability, oxidative stress and cytotoxicity. Nikita and colleagues (2011) also showed similar results when evaluating the quality of mesenchymal cells from human bone marrow. The authors reported damaged cells in the initial and final stages of culture. Taking cell proliferation, viability, oxidative stress and cytotoxicity into account, the fifth passage of subcutaneous group displayed best results for those variables. In the OM group the best observed passages considering the mentioned variables were the fourth and fifth. In contrast with our results another study, in which the authors evaluated oxidative and DNA damages of stem cells from canine dental pulp, the first passages showed lower oxidative stress and genomic damage. From the forth passage, the levels of ROS and DNA damage began to increase considerably (Aramburú Junior 2013). This variation in results may be due to different methods of cultivation and tissue origin, suggesting that each research group should evaluate the quality of their own cultivated cells.

The data obtained here may help researchers in future studies proposed to understand the behavior of mesenchymal stromal stem cells from adipose tissue. This also may apply to conduct veterinarians who want to explore the regenerative potential of stem cells as therapy in clinical practice. Given the importance of discussing the positive and negative factors involved in cell therapy, the authors suggest that more research must be directed to the stability of cultured stem cells before clinical use. Amongst the methodological limitations related to the present study was lack of investigation of some biomarkers of viability, genetic mutation and cellular senescence.

CONCLUSION

Based on the methodology which the experiment was conducted and the obtained final data, it can be concluded that the adipose tissue from canine subcutaneous and omentum are a viable source of mesenchymal stem cells, even after 30 minutes postmortem with no significant differences between these tissues. The first and last passage should be avoided in the treatment of clinical diseases, given the large exposure of these cells to stress and oxidative damage.

REFERENCE

- Aramburu Junior J.S. 2013. Isolamento e análise de danos genômicos de células-tronco da polpa dentária de cães. 93p. Dissertação de mestrado- Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- Bonventre J. V. & Yang L. 2011. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Journal of Clinical Investigation*. 121: 4210-4221.
- Caldecott K. W. 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*. 9:619-631.
- Colleoni S., Bottani E., Tessaro I., Mari G., Merlo B., Romagnoli N., Spadari A., Galli C. & Lazzari G. 2009. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Veterinary Research Communications*. 33:811-821.
- Danoviz M.E., Bassaneza V., Nakamuta J.S., Santos-junior G.R., Saint-clair D. & Bajgelman M.C. 2010. Adipose tissue-derived stem cell from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures. *Stem Cell Dev*. 10.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82: 47-95.
- Duailibi M.T. 2012. Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. *Journal of Molecular Histology*. 43: 89-94.
- Fortier L.A. 2005. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*. 34:415-423.
- Furlani D. 2009. A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart. *Cell Transplantation*. 18:319-331.

- García-Gómez I., Goldsmith H., Angulo J., Prados A., López-Hervás P., Cuevas B., Dujovny M. & Cuevas, P. 2005. Angiogenic capacity of human neural stem cells. *Neurological Research*. 27:807-811.
- Halliwell B. 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemical Journal*. 401:1-11.
- Heimburg D.V., Hemmricha K. & Haydarlioglu S. 2004. Comparison of Viable Cell Yield from Excised versus Aspirated Adipose Tissue. *Cells Tissues Organs*. 178:87-92.
- Hershko C. 1989. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Seminars in Hematology*. 26: 277-285.
- Kern S., Eichler H. & Stoeve J. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 24:1294-1301.
- Neupane M., Chang C.C. & Kiupel M. 2008. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cell. *Tissue Eng*. 14:1007-1015.
- Nikita V.A., Chausheva A.I., Zhanataev A.K., Osipova E.Y., Durnev A.D. & Bochkov N.P. 2011. Assessment of DNA damage in human bone marrow cells and multipotent mesenchymal stromal cells. *Bull. Exp. Biol. Med*. 151: 550-552.
- Patrício L.F.L., Rebelatto C.L.K., Brofman P.R.S., Maciel B.B., Beltrame O.C., Britto H.F.V. & Locatelli-Dittrich R. 2013. Isolamento e caracterização de células mesenquimais do tecido adiposo de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 65:946-954.
- Pujalté I., Passagne I., Brouillaud B., Tréguer M., Durand E., Ohayon-Courtés C. & L'Azou B. 2011. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Particle and Fibre Toxicology*. 8:1 – 16.
- Riley T., Sontag E., Chen P.P. & Levine A. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9:402–412.
- Ruffini E. 1992. Surgical applications of the greater omentum: a critical review of the literature. *PanMinerva Med*. 34:135-140.

Sareen D. 2009. Chromosome 7 and 19 trisomy in cultured human neural progenitor cells. PLoS ONE.4.

Treichel T. E. 2014. Contribuições para o uso de células estromais mesenquimais no reparo de feridas cutâneas e no transplante de pele em coelhos. 93p. Tese de doutorado – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel .J., Marshall V.S. & Jones J.M. 2008. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 282:1145–1147.

Tuan R.S., Boland G. & Tuli R. 2003. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Res Ther. 5:32–45.

Williams K.J.2008. Isolation and characterization of porcine adipose tissue-derived adult stem cells. Cells Tissues Organs. 188: 251-258.

Yang R.L., Shi Y.H., Hao G., Li, W. & Le G.W. 2008. Increasing in oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: relation between malondiladeyde and atherogenic index. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 43:154-158.

4 CONCLUSÕES

-O presente estudo demonstrou que o omento e o tecido subcutâneo são fontes de obtenção de células-tronco mesenquimais estromais em cães a ser aplicável a pesquisas de terapias regenerativas mesmo quando obtidas 30 minutos *post mortem*.

- Não há diferença estatística entre os dois tecidos quanto ao seu comportamento durante as seis passagens de cultura.

- Considerando todos os ensaios utilizados neste experimento para avaliar as seis passagens a qual as células de ambos os grupos foram submetidas, sugere-se que a quinta passagem de células derivadas do subcutâneo e quarta e quinta passagem do omento têm o maior potencial quanto à proliferação, viabilidade e menores taxas de

estresse oxidativo e citotoxicidade. Além disso, indica-se cautela no uso da primeira e sexta passagem da cultura de células do subcutâneo e omento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SEKHON, L.; SHAH, R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal**. v.10, n.1375-1403, 2008.
- BOCHKOV, N.P; VORONINA, E.S; KOSYAKOVA, N.V; LIEHR, T.; RZHANINOVA, A.A; KATOSOVA, L.D; PLATONOVA, V.I; GOL'DSHTEIN, D.V. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. **Bull Exp Biol Med**. v.143, p122–126, 2006.
- BUEGE, J.A; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**. v.52, p.302-310, 1978.
- BURLACU, A.; JINGA, V.; GAFENCU, A.V.; SIMIONESCU, M. Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cells death. **Cell and tissue research**. v. 306, p.409-416, 2001.
- CULOTTA, V.C. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. **Curr. Topics Cell Reg**. v.36, p.117-132, 2000.
- DEAN, R.; FU, S.; STROCKER, R.; DAVIES, M. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem. J**. v.324, p.1-18,1997.
- DUALIBI, M.T. et al. Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. **Journal of Molecular Histology**, v. 43, p. 89-94, 2012.
- EVANS, J.L. et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrinology Reviews**. v.23, p.599-622, 2002.
- FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**. v.82, p.47-95, 2002.
- FODOR, W.L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. **Reprod Biol Endocrinol**. v.1, n.102, 2003.
- FORTIER, L.A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**. v. 34, p. 415-423, 2005.
- FRÜHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; MURUZÁBAL, F.J.; BURRELL, M.A. The adipocyte: a model for the integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.280, p.827-847, 2001.
- FURLANI, D. A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart. **Cell Transplantation**. v.18, p.319-331, 2009.
- GEORGIU, C.D.; PAPAPOSTOULOU, I.; GRINTZALIS, K. Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks), **Nat. Protoc**. v.4, p.125-131, 2009.
- GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**. v.54, n.1, p.110-118, 2004.
- HA, T.T.N.; HUY, N.T; MURAO, L.A.; LAN, N.T.P.; THUY, T.T. et al. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **PLoS ONE**. v.6, n.10, 2011.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.MC. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. New York: Oxford University, 2007. p 851.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal Of Pharmacology**. n.142, p.231-255, 2004.

HORWITZ, E.M; LE BLANC, K; DOMINICI, M; MUELLER, I; SLAPER-CORTENBACH, I; MARINI, F.C, 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.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**. v.24, p.1294-1301, 2006

KOURY, J.C; DONANGELO, C.M. Estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr.** v.16, n.4, p.433-441, 2003.

JUNG, K.W. Perspectives on human stem cell research. **Journal of Cellular Physiology**. v. 220, n.3, p. 535-537, 2009.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue Engineering. **Science**. v.260, p.920, 1993.

LEMISCHKA, I.R. Stem cell biology: a view toward the future. **Ann N Y Acad Sci**. v.1044, p132-138, 2005.

LUISI, S.B. et al. A cultura de células como ferramenta para estudos de comportamento da polpa. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**. v. 45, n. 1, p.3-8, 2004.

MAITRA, A. et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. **Nature Genetics**. v.37, p.1099-1103, 2005.

McCONKEY, D.J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**. v.99, p.157-168, 1998.

MEIRELLES, L.S., et al. Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. v. 119, p.2204-2213, 2006.

PRUNET- MARCASSUS, B.; COUSIN, B.; ANDRÉ, M.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA, J. From heterogeneity to plasticity in adipose tissue: site-specific differences. **Exp Cell Res**. v. 312, p. 727-736, 2006.

PUJALTÉ, I.; PASSAGNE, I.; BROUILLAUD, B.; TRÉGUER, M.; DURAND, E.; OHAYON-COURTÉS, C.; L'AZOU, B. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. **Particle and Fibre Toxicology**. v.8, n.10, p.1 – 16, 2011.

RAO, S; MATTSON, M.P. Stem cells and aging: expanding the possibilities, **Mech. Ageing Dev**. v.122, p.713–734, 2001.

ROBBINS, S.T.; COTRAN, R.S. Patologia. **Bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROSENFELDT, F.; WILSON, M.; LEE, G.; KURE, C.; OU, R. Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and the therapy. **Experimental Gerontology**. v. 48, p.45-54, 2013.

RILEY, T.; SONTAG, E.; CHEN, P.P.;LEVINE, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.9, p.402–412, 2008

SHAMI, N.J.I.E; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr**. v.17, n.2, p.227-236.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**. v.82, n.2, p.291-295, 1997.

TOMA, C. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation**, v.105, n.1, p.93-98, 2002.

VANNUCCHI, H. et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**. n.31, p. 31-44,1998.

ZUK, P.A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology Cell**, v.13, n.12, p.4279-95, 2002.