ANDRESSA INABA DE MAGALHÃES

**Caracterização imunofenotípica de células-
tronco/progenitoras hematopoiéticas da fração estromal vascular
de tecido adiposo de cães**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Prof^a. Dr^a Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3031
FMVZ

Magalhães, Andressa Inaba

Caracterização imunofenotípica de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas da fração
estromal vascular de tecido adiposo de cães / Andressa Inaba de Magalhães. -- 2014.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profª. Drª. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes.

1. Células-tronco. 2. Hematopoiese. 3. Tecido adiposo. 4. Imunofenotipagem. 5. Canino.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Caracterização imunofenotípica de células tronco/progenitoras hematopoiéticas da fração estromal vascular de tecido adiposo de cães”, protocolado sob o nº 2685/2012, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research “Phenotypic characterization of stem/progenitor hematopoietic cells of the stromal vascular portion of adipose tissue of dogs”, protocol number 2685/2012, utilizing 10 (ten) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 27 de junho de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MAGALHÃES, Andressa Inaba de Magalhães

Título: Caracterização imunofenotípica de células-tronco/progenitoras
hematopoiéticas da fração estromal vascular de tecido adiposo de cães

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A minha mãe Fidalma Maria Inaba de Magalhães, por todo seu amor incondicional. Por todo o seu apoio ao longo de todos os anos em que esteve presente em minha vida. Esse trabalho é dedicado a você, minha querida mãe. Hoje não mais presente nesse mundo, mas com certeza uma estrela brilhante no céu. Para sempre no meu coração.

Ao meu pai, Célio Anibal de Magalhães, um “sábio”, companheiro e amigo para todas as horas. Um bom papo a qualquer hora sempre pode ser um enorme ensinamento. Te amo “véio”.

Ao meu namorado, Gustavo Duarte dos Santos por seu enorme amor e afeto. Por me compreender em todas as horas, mesmo naquelas em que eu achei que nada daria certo. Obrigada por fazer parte da minha vida. Te amo pra sempre.

A minha orientadora Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, por não ser somente uma orientadora, mas uma verdadeira “mãezona” a me tranquilizar em momentos difíceis. Foi uma grande honra ser sua orientada. Obrigada.

AGRADECIMENTOS

A minha querida funcionária Carina, que me ajudou na confecção dessa dissertação com seu trabalho dedicado. Obrigada por todo carinho a mim dispensado ao longo desses tantos anos de parceria.

As minhas amigas Eliane e Patricia pelo apoio, pelas caronas, pela sua sempre prontidão em ajudar.

A todos os amigos do Instituto Veterinário de Imagem (IVI) pelos tantos anos de parceria e aprendizado. Meu obrigada especial ao Dr. Benedicto, à Patricia e Salvador que me compreenderam quando tive que deixá-los...

A querida Simone Gonçalves (HEMOVET) por ter feito parte da embriogênese desse projeto. Obrigada pelo grande incentivo.

Aos amigos do Hospital Veterinário Pompéia pelo convívio e aprendizado ao longo desses anos.

Aos colegas das clínicas Pró Vida Animal, Hospital Veterinário Pompéia, Clínica Veterinária Dr. Alcione A. Silva, HOVET-USP setor de ginecologia e obstetrícia pelas amostras cedidas. Obrigada especial a minha amiga Mariane por ser a maior contribuinte.

Aos técnicos do laboratório Herculano e Vagner pela ajuda cedida e pela amizade construída ao longo desses dois anos de convívio.

A especialista Nicolle por participar ativamente desse projeto desde o início, me ajudando a sanar dúvidas e sempre empenhada em ajudar e aprender junto comigo. Por tornar esse trabalho ainda melhor.

Ao especialista Tulio, do NUCEL, por realizar o *sorting* das células e se mostrar extremamente paciente para explicar o processo.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Patologia por me acolherem mesmo após tantos anos de formação e me fornecer os meios necessários para a execução desse projeto. Obrigada pelo crédito.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas, o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	CÉLULAS-TRONCO	15
2.2	CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS	16
2.3	FONTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS	18
2.4	HEMATOPOIESE E O NICHOS DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS	20
2.5	CITOMETRIA DE FLUXO E MARCADORES PARA CÉLULAS-TRONCO- HEMATOPOIÉTICAS	23
2.6	ENSAIO CLONOGÊNICO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (CFU)	25
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	ANIMAIS E OBTENÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO	31
4.2	PROCESSAMENTO DO TECIDO ADIPOSEO	32
4.3	DESCONGELAMENTO DAS AMOSTRAS	35
4.4	IMUNOFENOTIPAGEM	36
4.5	CITOMETRIA DE FLUXO	38
4.5.1	<i>Estratégia de gate</i>	39
4.5.2	<i>Sorting (separação celular)</i>	43
4.6	ENSAIO CFU	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	PROCESSAMENTO DOS TECIDOS ADIPOSEOS: CONTAGEM TOTAL E VIABILIDADE CELULAR APÓS DESCONGELAMENTO	48
5.2	IMUNOFENOTIPAGEM	50
5.3	ENSAIO CFU	52
6	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57

RESUMO

MAGALHÃES, A. I. **Caracterização imunofenotípica de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas da fração estromal vascular de tecido adiposo de cães.** [Phenotypic characterization of stem/progenitor cells of the stromal vascular portion of adipose tissue of dogs]. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A caracterização fenotípica e o isolamento de células-tronco hematopoiéticas (CTH) podem fornecer informações relevantes quanto ao desenvolvimento biológico do sistema hematopoiético. A habilidade em detectar e purificar essas células implica no desenvolvimento de condições para manutenção e expansão dessas células em culturas *in vitro*. Na medicina veterinária, a purificação de células-tronco hematopoiéticas caninas (CTHc) vem de encontro com interesses em estabelecer métodos para o desenvolvimento de terapias celulares, principalmente em doenças que levam à aplasia medular ou anemia aplástica nesta espécie animal. Neste cenário, a escassez de informação acerca da caracterização fenotípica bem como sobre a capacidade de proliferação e pluripotência celular de CTHc precisa ser superada. O presente projeto visou o isolamento, a caracterização e a expansão, por meio da análise imunofenotípica e de ensaios CFU de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas provenientes da fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo de cães. Os resultados demonstraram que o painel de imunofenotipagem CD45⁻/CD117⁺/CD34⁺ constitui uma melhor estratégia de isolamento destas células em comparação ao painel CD45⁻/CD38^{-low}/CD34⁺. Além disso, a detecção da atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) também pode representar uma grande aliada no enriquecimento desta fração celular. Por meio das técnicas empregadas no presente projeto foi possível verificar que a frequência de CTH é baixa em tecido adiposo canino.

Palavras-chave: Células-tronco. Hematopoiese. Tecido adiposo. Imunofenotipagem. Canino.

ABSTRACT

MAGALHÃES, A. I. **Phenotypic characterization of stem/progenitor cells of the stromal vascular portion of adipose tissue of dogs.** [Caracterização imunofenotípica de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas da fração estromal vascular de tecido adiposo de cães]. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Phenotypic characterization and isolation of hematopoietic stem cells (HSC) provide relevant information to allow us to elucidate the biological development of the hematopoietic system. The ability to detect and purify these cells involves the development of conditions for maintenance and expansion of these cells in in vitro cultures. In veterinary medicine, purification of canine hematopoietic stem cells (CTHc) is of interesting to provide methods for the development of cell-based therapies, particularly in diseases causing bone marrow aplasia or aplastic anemia in this species. In this scenario, the lack of information about the phenotypic characterization as well as on the ability of cell proliferation and pluripotency of CTHc needs to be overcome. The present study aimed at the isolation, characterization, and expansion, by means of immunophenotyping and CFU assays of stem cells/progenitor hematopoietic from stromal vascular fraction (SVF) from adipose tissue of dogs. The results showed that immunophenotyping panel CD45⁻/CD117⁺/CD34⁺ is a better strategy for isolation of these cells compared to CD45⁻/CD38^{-/low}/CD34⁺. Furthermore, the detection of the enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity may also represent a great enrichment coupled to this cell fraction. By the techniques employed in this project we found that the frequency of CTH is low in canine adipose tissue.

Keywords: Stem cells. Hematopoiesis. Adipose tissue. Immunophenotyping. Canine.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os estudos com células-tronco despontam no cenário científico mundial demonstrando sua grande aplicabilidade nos variados campos da medicina (JANZ, 2010). A tendência atual de se pesquisar células-tronco vem, sobretudo, da esperança destas células revolucionarem as formas de tratamentos convencionais em enfermidades que cursam com morte celular, principalmente em larga escala (MOARES, 2009). Em cães, a falência de células-tronco hematopoiéticas pode ser resultado de processos patológicos como toxicidade por drogas, doenças imunomediadas, agentes infecciosos (parvovírus, *Ehrlichia spp.*), mielofitose, isquemias e inflamações (OVERMANN et al., 2010).

A noção de célula-tronco é um conceito em desenvolvimento. Por definição, células-tronco são células indiferenciadas, com capacidade de autorregeneração e diferenciação em linhagens celulares específicas (MIHU et al., 2008). Essas células são especializadas em fornecer um suprimento indefinido de células diferenciadas frescas quando estas são perdidas, descartadas ou necessárias em grande número (ALBERTS et al., 2010). Além de apresentar a multifuncionalidade de se transformar em diversos tipos celulares, as células-tronco podem ser obtidas de vários locais. Os tecidos adultos nos quais células-tronco foram localizadas são: encéfalo, medula óssea, sangue periférico, vasos sanguíneos, músculo esquelético, pele, fígado, polpa dos dentes e tecido adiposo (AFFONSO, 2006).

As células-tronco mais estudadas são aquelas responsáveis pela hematopoiese. Todas as estratégias experimentais e paradigmas conceituais que são aplicáveis às células-tronco foram, em geral, definidos primeiramente no sistema hematopoiético (BONNET et al., 2002). A pesquisa de células-tronco hematopoiéticas começou quando foi reconhecido que em roedores com falência medular por irradiação letal tinham o quadro revertido pela injeção de células da medula óssea de animais não irradiados. Mais tarde demonstrou-se que esses animais tiveram a reconstituição plena da medula óssea pelas células do doador (SPANGRUDE et al., 1988).

As células-tronco hematopoiéticas correspondem a aproximadamente 0,05% das células da medula óssea. A identificação de propriedades celulares únicas (capacidade de autorrenovação e expansão clonal de multilinhagens) e antígenos de superfície tem possibilitado o enriquecimento desta fração celular em camundongos e humanos com propósitos de caracterização molecular e transplantes (NIEMEYER et al., 2001). Apesar de o cão ser um modelo bem descrito para o desenvolvimento de novas estratégias para o transplante de medula óssea em humanos, no que diz respeito à enxertia dos transplantes e a doença enxerto *versus* hospedeiro (LADIGES et al., 1990) e embora existam muitos progressos na caracterização das células-tronco/progenitoras hematopoiéticas de humanos e camundongos, informações para o isolamento e caracterização de progenitores hematopoiéticos caninos e seus antígenos de superfície ainda permanecem limitadas (NIEMEYER et al., 2001).

Estudos recentes demonstram que a fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo também constitui um reservatório de células-tronco hematopoiéticas (BLOGOWSKI et al., 2011). Como a abordagem cirúrgica desse tecido é muito simples e sua quantidade quase não restritiva, a sua utilização pode ser muito conveniente para aplicações no tratamento de doenças hematopoiéticas (COUSIN et al., 2003). Na espécie canina, devido à maior facilidade de obtenção do tecido adiposo em comparação com a medula óssea, essa fonte de células-tronco hematopoiéticas deve ser considerada embora o número de células encontrado na FEV do tecido adiposo seja menor quando comparado à medula óssea (HAN et al., 2010). Na medicina veterinária, a purificação de células-tronco hematopoiéticas em cães vem de encontro com interesses em estabelecer métodos para o desenvolvimento de terapias celulares, principalmente em doenças que levam à aplasia medular ou anemia aplástica. Além disso, pesquisas demonstram que à semelhança de humanos, o transplante de células-tronco hematopoiéticas também pode ser uma alternativa terapêutica para doenças hematopoiéticas em cães (SUTER et al., 2004).

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS-TRONCO

Existem três tipos de células-tronco a serem considerados: as células-tronco totipotentes (embrionárias), as pluripotentes, que embora em menor número, estão presentes no indivíduo adulto, como as oriundas da medula óssea, e as células-tronco multipotentes ou as do indivíduo adulto com capacidade de gerar apenas um limitado número de tecidos, com a função de manter e reparar os tecidos nos quais elas são encontradas (JANZ, 2010).

A medula óssea é frequentemente usada como um provedor de células-tronco para terapias celulares em humanos. As células-tronco da medula óssea incluem as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células-tronco mesenquimais (CTM). As CTH dão origem a todas as linhagens celulares sanguíneas, enquanto as CTM dão origem às células do estroma, as quais pertencem às linhagens condrogênica, osteogênica, adipogênica, miogênica e fibroblástica (REISER et al., 2005). As CTH são consideradas uma célula primitiva de origem embrionária mesenquimal, que durante a vida intrauterina encontram-se primeiramente no saco vitelínico e depois no fígado fetal, baço e medula óssea (JAIN, 1993).

Durante a vida adulta, as células-tronco hematopoiéticas residem na medula óssea em estado quiescente. Em contraste, no crescimento embrionário a hematopoiese é encontrada em vários nichos. Em mamíferos, as primeiras células sanguíneas emergem do saco vitelínico. Com o início da organogênese, as células hematopoiéticas são observadas na região aorta-gônada-mesonefros, placenta e artérias umbilical e vitelínica. Mais tarde, durante a gestação, o fígado fetal torna-se o principal órgão de atividade hematopoiética, onde esta é mantida até antes do nascimento, quando as células sanguíneas migram para a medula óssea (COSTA et al., 2012).

Células-tronco hematopoiéticas são definidas por três características principais que foram originalmente postuladas por Siminovitch e colaboradores em

1963. Primeiro, estas células devem ser pluripotentes e capazes de originar todas as linhagens maduras mielóide e linfóide do sistema hematopoiético. Segundo, essas células são profundamente quiescentes, e quando ativadas possuem uma alta capacidade proliferativa. Terceiro, e mais importante, na presença de estímulos de proliferação e maturação, elas devem manter a habilidade de auto-regeneração e manter a sua posição no ápice da hierarquia hematopoiética (RECTOR et al., 2013).

Dois tipos de células-tronco na medula óssea têm sido definidos: as células *long term*, capazes de produzir todos os tipos celulares durante toda a vida do indivíduo adulto e gerar progênie com similar potencial em transplantes secundários e as células *short term* capazes de reconstituir em um limitado espaço de tempo, células de origem mieloide e linfóide. A progênie imediata destas células na medula óssea são as células progenitoras multipotentes, as quais possuem atividade de diferenciação pluripotente (se diferenciam em todas as linhagens hematopoiéticas), mas não a capacidade de autorrenovação. Durante o comprometimento, as células são submetidas à extensiva proliferação e diferenciação sequencial, acompanhadas de uma diminuição da capacidade de autorrenovação para produzir as células maduras (BELLANTUONO, 2004).

2.2 CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

A pesquisa com CTH começou em 1956 por Ford e colaboradores quando foi reconhecido que camundongos que recebiam doses letais de irradiação desenvolviam falência da medula óssea e essa mesma falência poderia ser revertida pela injeção de células da medula óssea de animais não irradiados. Mais tarde, demonstrou-se que estes animais tiveram todas as linhagens sanguíneas reconstituídas pelas células da medula óssea do doador. Dessa forma, o isolamento de uma população pura de CTH com potencial de autorrenovação é requerimento para o entendimento do desenvolvimento biológico do sistema hematopoiético (SPANGRUDE et al., 1988). O esquema representado na figura 1 demonstra a

hematopoiese normal mantida ao longo de toda a vida do indivíduo a partir das células *long term* que possuem a capacidade de autorregeneração além de diferenciação em todas as linhagens celulares hematopoiéticas.

Figura 1 - Esquema da hematopoiese normal

Legenda: A partir das células-tronco *long term* a hematopoiese é mantida durante toda a vida do indivíduo devido a sua capacidade de autorregeneração e capacidade de diferenciação em todas as linhagens sanguíneas. Durante a diferenciação, as células *long term* transitam entre células *short term* e progenitores comprometidos (caracterizado pelo potencial restrito de linhagem e reduzida capacidade de autorregeneração) antes de se diferenciar nas linhagens mielóide e linfóide

Fonte: (Adaptado de DU et al., 2008)

2.3 FONTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

Atualmente, as fontes mais estudadas de CTH são: medula óssea, cordão umbilical e sangue periférico. Em indivíduos adultos, o principal sítio de obtenção dessas células é a medula óssea e mais recentemente o sangue periférico através da mobilização destas células da medula óssea (MENDES et al., 2010).

A obtenção de células-tronco da medula óssea é feita através de múltiplas punções de sítios como a crista ilíaca, esterno e úmero. Este procedimento exige internação do doador e deve ser realizado com procedimentos anestésicos (MENDES et al., 2010).

A utilização de sangue periférico para obtenção de células-tronco exige a mobilização prévia destas células da medula óssea para o sangue periférico, uma vez que em condições normais, há somente um pequeno número de células-tronco circulantes. Este procedimento é realizado através da administração de fator de crescimento hematopoiético recombinante ou fator estimulante de colônia (CSF). A coleta destas células é feita através de um processo conhecido como aférese, que consiste em um sistema de fluxo contínuo para separação de frações de interesse do sangue e o restante é reinfundido no doador (MENDES et al., 2010).

O uso potencial do sangue de cordão umbilical como fonte de células-tronco foi proposto em 1982 e o primeiro transplante utilizando esta fonte foi feito em 1988 em uma criança de cinco anos com anemia de Fanconi. Graças ao sucesso obtido, transplantes com sangue de cordão umbilical passaram a ser uma opção viável para numerosas doenças malignas e não malignas em humanos, porém, o volume obtido de cada coleta é pequeno e variável. Uma unidade de sangue de cordão, geralmente contém um número 10 vezes menor de células-tronco comparando-se com o material obtido da medula óssea ou do sangue periférico (MENDES et al., 2010).

Através do último século muitas descobertas foram gradualmente revelando que o tecido adiposo exerce influência regulatória na maioria de processos (pato) fisiológicos, colocando o tecido adiposo como um importante modulador do equilíbrio inflamatório e endócrino. O ambiente do tecido adiposo oferece condições

adequadas para desenvolvimento de populações heterogêneas de células-tronco do sangue periférico incluindo as progenitoras hematopoiéticas (OGAWA, 2012).

O tecido adiposo representa uma fonte de células-tronco e, assim como a medula óssea, esse tecido deriva da mesoderme embrionária. Essas similaridades, junto com a identificação de CTM em muitos tecidos, torna plausível o conceito de que uma população de células-tronco pode ser isolada de tecido adiposo (ZUK et al., 2001).

Estudos recentes demonstram que a fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo também contém células-tronco hematopoiéticas à semelhança do sangue periférico (OGAWA, 2012). A FEV do tecido adiposo é composta por vários tipos celulares incluindo células do sistema imune, fibroblastos, pericitos, células endoteliais, progenitores de adipócitos, células do estroma e células-tronco não definidas. Essa fração é obtida separando-se os adipócitos maduros. As células da FEV do tecido adiposo possuem similaridades com as células estromais da medula óssea em vários aspectos: em ambas, há uma população heterogênea de células com potencial de se diferenciar em várias linhagens, incluindo células adipogênicas, condrogênicas e miogênicas dependendo das condições de cultura (HAN et al., 2010).

Recentes estudos demonstraram que embora a cinética do tecido adiposo seja mais lenta quando comparada a outros tecidos, anualmente, independentemente de quaisquer fatores, cerca de 10% das células são renovadas. Essa regeneração constante tem sido justificada pela presença de uma grande quantidade de células-tronco. Todo esse processo de renovação e regeneração parece envolver diferentes populações de células-tronco, bem como o ambiente do tecido adiposo parece oferecer nichos adequados para populações heterogêneas de células-tronco circulantes no sangue periférico, incluindo as derivadas da medula óssea (BŁOGOWSKI et al., 2012).

Estudos em humanos demonstraram que, as populações celulares do tecido adiposo tais como, as células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas, mostraram-se quase idênticas àquelas obtidas da medula óssea e do cordão umbilical no que se diz respeito à expressão antigênica, morfologia e potencial de diferenciação tecidual (BŁOGOWSKI et al., 2012).

A hipóxia ambiental e a característica do sistema vascular desenvolvem importantes papéis no recrutamento e regulação das células-tronco hematopoiéticas.

Ambos os órgãos são sustentados por um sistema vascular bem organizado e único. A hipóxia ambiental e o sistema vascular singular podem desenvolver papéis cruciais para o recrutamento e regulação de CTH (HAN et al., 2010). Estudos *in vitro* demonstraram que a hematopoiese foi melhor em ambientes com baixos níveis de oxigênio (ao redor de 1%) devido a menor formação de radicais livres (subprodutos gerados a partir do oxigênio, que podem causar danos ao DNA das células e envelhecimento precoce das mesmas). Esses dados indicam que a hipóxia é necessária para a manutenção da capacidade de autorrenovação e proteção contra a exaustão das células-tronco, enquanto que os altos níveis de oxigênio no nicho vascular são importantes para facilitar sua proliferação (LILLY et al., 2011).

Análises morfológicas revelaram que células-tronco hematopoiéticas quiescentes estão localizadas próximas às zonas de hipóxia da medula óssea. Com base nesses dados, a hipótese de que o tecido adiposo é um reservatório extramedular de células-tronco hematopoiéticas deve ser considerada (HAN et al., 2010). Recentemente, Luna et al. (2014), em um estudo comparativo entre tecidos adiposos de camundongos de diferentes idades (30, 90 e 120 dias) colhidos de epidídimo e de ovários obteve em média 10% de células positivas para CD34 neste tecido. Segundo Han et al. (2010) a frequência de células-tronco hematopoiéticas na FEV do tecido adiposo foi catorze vezes menor do que a apresentada na medula óssea.

2.4 HEMATOPOIESE E O NICHOS DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

Hematopoiese é o processo ao longo da vida pelo qual todas as células sanguíneas são produzidas de maneira hierárquica a partir de uma pequena população de células-tronco progenitoras hematopoiéticas (PIETRAS et al., 2011). Na vida adulta dos mamíferos todos os tipos celulares sanguíneos são continuamente produzidos por células-tronco. Após o nascimento, a medula óssea torna-se o local primário de hematopoiese. A manutenção, proliferação e

diferenciação das CTH são principalmente reguladas pelo microambiente medular chamado de nicho das células-tronco. Esse nicho contém dois componentes básicos: matriz extracelular e células (AGGARWAL et al., 2012). A regulação das células-tronco pelo seu nicho ocorre pelo contato físico e interações célula-célula com células adjacentes, assim como por fatores solúveis (OVERMANN et al., 2010). Enquanto a matriz extracelular provém o suporte químico e físico para a função celular, as células do nicho controlam a quiescência, proliferação e diferenciação das células-tronco (AGGARWAL et al., 2012).

Os nichos endosteal (osteoblástico) e vascular têm sido identificados como os dois maiores componentes do nicho para a manutenção, proliferação e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas (ISHIZU et al. 2013) .

O nicho endosteal situa-se na interface entre o osso e a medula óssea e tem como principal célula osteoblastos em diferentes estágios de maturação. Os osteoblastos compreendem uma população heterogênea, a qual inclui células maduras e imaturas. As células maduras contribuem para a formação óssea. Os osteoblastos são um componente crucial do nicho das CTH na medula óssea adulta. O número de CTH aumenta ou diminui de acordo com o número e/ou tipo de osteoblastos (SUDA et al., 2005). Essas células sintetizam citocinas que parecem contribuir para a manutenção e regulação das células-tronco hematopoiéticas presentes nesse local (LILLY et al., 2011).

O outro nicho é o nicho vascular. A medula óssea possui um particular sistema de vasos que culminam em capilares sinusóides, os quais possuem paredes finas com um arranjo fenestrado de células endoteliais que permite a passagem das células hematopoiéticas (LILLY et al., 2011). Embora façam parte do sistema vascular, as células endoteliais dos sinusóides da medula óssea exibem características morfológicas e fenotípicas únicas (ISHIZU et al., 2013). Existem evidências de que muitas células-tronco hematopoiéticas estão localizadas próximas a esses capilares sinusóides na medula óssea. Essa localização é importante para explicar a rápida mobilização das células-tronco após a administração de certas drogas como o fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) (LILLY et al 2011).

Os nichos das CTH estão sendo constantemente remodelados baseados no estágio de desenvolvimento e demanda do organismo, requerendo flexibilidade destas células para associar-se e dissociar-se do microambiente estromal (Figura 2).

Figura 2 - Ilustração do nicho das células tronco-hematopoiéticas

Legenda: Os nichos endosteal e vascular são componentes de um único nicho. As CTH localizadas próximas ao endósteo são mais quiescentes e tem melhor capacidade de autorrenovação. As CTH localizadas próximas aos sinusóides possuem reduzida capacidade de autorrenovação, porém entram no ciclo celular mais rápido. As células dos dois nichos e os fatores integrantes regem o comportamento das CTH

Fonte: (Adaptado de LILLY et al., 2011)

Ao contrário de outras populações de células-tronco, as células hematopoiéticas podem migrar para fora da medula óssea para a circulação periférica. A dinâmica e o comportamento de mobilização destas células dificultam a identificação de marcadores fenotípicos únicos para purificar e estudar a população de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas como uma população celular homogênea (RECTOR et al., 2013).

2.5 CITOMETRIA DE FLUXO E MARCADORES PARA CÉLULAS TRONCO-HEMATOPOIÉTICAS

A citometria de fluxo é uma tecnologia avançada que permite a avaliação simultânea de diversos parâmetros de partículas individuais, em geral células, à medida que elas passam uma a uma, num meio líquido por um feixe de luz (laser). Com a passagem da célula na frente do laser, é possível avaliar o tamanho relativo, a granulosidade relativa ou complexidade interna da partícula, e a intensidade relativa da fluorescência (BD, 2009). Para obter informações referentes às características físicas e químicas de cada célula ou partícula avaliada, o citômetro de fluxo é composto por três sistemas que atuam em conjunto. A partir deles, o instrumento combina ar, fluidos, fótons e elétrons para gerar dados relacionados ao tamanho, à granulosidade ou complexidade interna e às intensidades de fluorescências das células ou partículas suspensas na amostra avaliada (BD, 2009).

Uma abordagem para identificar células-tronco/progenitoras hematopoiéticas é o uso de anticorpos monoclonais marcados com fluoróforos que se ligam às proteínas específicas da superfície celular e assim a população celular de interesse pode ser mensurada. Além disso, baseado na diferença da ligação dos anticorpos à superfície celular (alto, baixo ou negativo), pode-se isolar seletivamente as células por *fluorescence activated cell sorting* (FACS) (RECTOR et al., 2013).

O uso da citometria de fluxo permite o isolamento e a caracterização de CTH. Por mais de 30 anos, pesquisadores procuram desenvolver um painel de marcadores que quando usados conjuntamente, aumentam significativamente a purificação das células-tronco hematopoiéticas da medula óssea de camundongos e humanos (RECTOR et al., 2013). A estratégia canônica usada para o enriquecimento da fração das células-tronco hematopoiéticas de camundongos inclui a remoção primária das células comprometidas, com marcadores para identificar células sanguíneas diferenciadas através de um “coquetel de linhagem” (seleção de linhagem ou também chamado de Lin⁻) combinado com uma seleção positiva de marcadores expressados pelas células-tronco hematopoiéticas, tais como c-Kit⁺ e Sca-1⁺. Essa estratégia seleciona uma população de células que inclui as células-

tronco hematopoiéticas, mas ainda permanece heterogênea por conter células progenitoras multipotentes e células-tronco hematopoiéticas “short term” e “long term” (MAYLE et al., 2013).

O marcador de maior importância em humanos para identificar CTH é a glicoproteína de membrana CD34, o qual é expresso em 0,5 a 5% das células da medula óssea humana e é encontrado em células progenitoras. Os precursores de todas as linhagens hematopoiéticas humanas incluindo precursores linfóides são células CD34⁺. As únicas células positivas para esse marcador, além das já citadas são as células endoteliais (CIVIN et al., 1990). Segundo Carvalho et al. (2009), o antígeno CD34 é altamente expressado em células pluripotentes e sua expressão reduz gradualmente, à medida que a maturação celular aumenta, até a sua completa ausência em células totalmente maduras. Pela imunofenotipagem de células a partir do CD34, torna-se evidente que mais de 95% dessas células já estão comprometidas com uma linhagem particular, desde que haja a expressão de antígenos específicos da linhagem mieloide e linfóide. Um marcador de superfície usado em associação com o CD34 para identificar populações celulares mais primitivas é o CD38 (BELLANTUONO, 2004). É possível observar a expressão do CD38 em mais de 90% das células da fração CD34⁺. Quanto à intensidade de expressão do CD38, células progenitoras hematopoiéticas são classificadas como imaturas (baixa expressão de CD38) e progenitores diferenciados (alta expressão de CD38) (CARVALHO et al., 2009). Os marcadores utilizados em camundongos para identificação de células-tronco hematopoiéticas são Sca-1 (fator “stem cell”) e CD117 (c-Kit). Em camundongos, protocolos de enriquecimento de células progenitoras hematopoiéticas utilizam obrigatoriamente o anticorpo monoclonal Sca1 (NIEMEYER, et al., 2001). Ambos os marcadores (c-Kit e Sca1) foram identificados como positivos para a purificação de células-tronco hematopoiéticas. O CD117, usado em combinação com Sca1⁺, a partir de células negativas para marcadores de linhagens (Lin⁻), enriquece a população de células-tronco, a qual representa aproximadamente 0,05% de todas as células da medula óssea (RECTOR et al., 2013).

Embora a seleção de células-tronco baseada no fenótipo da superfície celular se mostre extremamente prática para seu isolamento e caracterização, algumas limitações como a variação entre as espécies e as fontes de células-tronco, a

variação do fenótipo dessas células com a progressão do ciclo celular, cultura *ex vivo* e transplantes *in vivo* indicam uma dissociação entre o fenótipo e a capacidade de repopulação dessas células (HESS et al., 2004).

Em camundongos, uma estratégia para isolar essas células é através da alta expressão da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (HESS et al., 2004). A ALDH é uma família de enzimas envolvida no metabolismo dos aldeídos e seus ácidos carboxílicos correspondentes. A ALDH é expressa em altos níveis nos progenitores hematopoiéticos (STORMS et al., 1999). Essa enzima é requerida na produção de ácido retinóico e desenvolve um importante papel na regulação da diferenciação de CTH (CHUTE et al., 2006). Storms et al. (2005) num estudo realizado com células de cordão umbilical em humanos, concluiu que as células hematopoiéticas mais primitivas encontradas são positivas para CD34 e para ALDH. Um método de para mensurar ALDH em células viáveis pode ser usado como parte da estratégia para isolamento de células-tronco hematopoiéticas (JONES et al., 1995). Atualmente, em cães, a expressão da atividade de ALDH também pode auxiliar na identificação de células de tumores mamários com propriedades de células-tronco (MICHISHITA et al., 2012).

Com base nestes dados, de forma a selecionar células-tronco, *long term* e *short term* hematopoiéticas da FEV do tecido adiposo, no presente trabalho serão utilizados os anticorpos de superfície CD34, CD38, CD117 (c-Kit), CD45 (antígeno leucocitário comum), e o ALDEFLUOR (ALDH).

2.6 ENSAIO CLONOGÊNICO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (CFU)

Um grande desafio na hematopoiese é conceber ensaios que possam trazer informações úteis sobre hematologia clínica e experimental. Isso significa identificar separadamente as varias classes de progenitores hematopoiéticos que são produzidos sequencialmente durante a progressão de CTH em células funcionais diferenciadas (COULOMBEL, 2004).

O teste clonogênico é um modelo clássico de avaliar a formação de colônias a partir de CTH e células pluripotentes com o potencial de ancoragem e crescimento em meio semissólido. Esse tipo de meio reduz o movimento celular e permite que as células, individualmente, desenvolvam clones que são identificados como colônias (FIEBIG et al., 2004). Todos estes testes mensuram dois parâmetros cardinais: proliferação celular (medido pelo número de células produzidas) e potencial de diferenciação (estimado pelo número de diferentes linhagens representado em sua progênie) (COULOMBEL, 2004).

Em ensaios clonais, tais como ensaios de colônias ou de culturas de células individuais, a progênie de cada progenitor permanece bem separada e o seu tamanho é mais ou menos proporcional ao potencial proliferativo das células progenitoras (COULOMBEL, 2004).

Han et al. (2010) demonstrou que células-tronco hematopoiéticas frescas isoladas a partir da FEV do tecido adiposo de camundongos deram origem a vários tipos de colônias em ensaios CFU. O tamanho e a aparência de cada colônia formada eram idênticos as colônias obtidas a partir do ensaio CFU realizado com células da medula óssea. A quantidade de células em meio foi de 5×10^5 células por placa de cultura. Na figura 3 estão representadas as unidades formadoras de colônias que podem ser observadas em ensaios CFU.

Figura 3 - Fotomicrografias do ensaio de CFU .realizado em meio semi-sólido

Legenda: Colônias observadas durante o ensaio CFU. 1 e 2 CFU-E (unidade formadora de colônia eritróide); 3- CFU-GM (unidade formadora de colônia granulocítica e monocítica); CFU-GEMM (unidade formadora de colônia multilinhagem), monocítica/macrofágica)

Fonte: (www. sciencepro.com.br)

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar o isolamento e a caracterização imunofenotípica de CTH provenientes da FEV do tecido adiposo de cães.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar fenotipicamente as células obtidas da FEV do tecido adiposo.
- Realizar ensaios de unidades formadoras de colônias (CFU) das células obtidas e avaliar o tipo e número de CFU.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E OBTENÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO

Para obtenção das amostras, cães, fêmeas, de raças diversas, de idade adulta (1 a 8 anos) foram submetidas a procedimentos cirúrgicos de cavidade abdominal (n=43). As amostras foram obtidas de cães atendidos no Hospital Veterinário Pompéia, Clínica Veterinária Dr. Alcione A. Silva, do setor de ginecologia e obstetrícia do HOVET-USP e da Clínica Pró Vida Animal.

Os procedimentos anestésicos utilizados seguiram o protocolo de cada um dos lugares colaboradores, assim como o acompanhamento pós-operatório até a alta do animal. Todas as coletas procedidas durante o experimento foram realizadas sem que houvesse quaisquer prejuízos aos animais doadores.

A coleta do tecido adiposo foi realizada no período trans cirúrgico e obtidas ou de tecido subcutâneo ou de gordura visceral (principalmente ao redor dos ovários). Todas as amostras foram obtidas de maneira asséptica e colocadas diretamente em tubo cônico de 50mL contendo 25mL de meio RPMI-1640 estéril (RPMI 1640 – Gibco®) com antibióticos (Figura 4) . As amostras permaneceram então, em geladeira até o processamento. O tempo de permanência das amostras foi de no máximo 24 horas em geladeira até o processamento da amostra.

Figura 4 - Tecido adiposo em meio RPMI

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

4.2 PROCESSAMENTO DO TECIDO ADIPOSEO

Para obtenção da FEV do tecido adiposo o material coletado foi cortado em pequenos fragmentos em placa de petri estéril, com auxílio de lâmina de bisturi nº 22. Após a fragmentação, o tecido foi colocado em frasco para cultura celular estéril, em meio RPMI (RPMI 1640 – Gibco®) e colagenase tipo IV (1mg/mL) (Life Technologies do Brasil®) (Figura 5) na proporção 1:10 e colocado sob agitação constante por 1 hora a 37°C.

Figura 5 - Tecido adiposo fragmentado para o processo de digestão

(Fonte: MAGALHÃES, 2014)

Após a digestão do tecido adiposo, a amostra foi filtrada em tubo cônico de 50mL com auxílio de uma peneira de nylon (Cell Strainer- BD®) de 100 micras e a suspensão celular foi centrifugada a 405xg por 10 minutos a 4°C. Com o processo de centrifugação, pode-se obter uma solução de duas fases: uma consistindo predominantemente de material gorduroso e outra de solução RPMI, células nucleadas e hemácias (Figura 6). A fase de material gorduroso foi então descartada com auxílio de uma pipeta Pasteur de 3 mL estéril. O restante do sobrenadante também foi removido de modo a permanecer no frasco somente o *pellet* celular contendo células nucleadas e hemácias.

Figura 6 - Tecido adiposo pós-digestão

Legenda: Observa-se a fase de material gorduroso e a fase celular.
Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

Para a lise das hemácias foi utilizada 2 mL da solução de lise Pharm Lyse-Lysing Buffer (BD®) juntamente com o *pellet* celular. Procedeu-se à incubação da amostra por 20 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz conforme orientação do fabricante. Em seguida, a amostra foi lavada em 10mL de solução PBS estéril e centrifugada por 5 minutos a 405xg a 4°C. O sobrenadante foi então descartado, de modo a permanecer somente o *pellet* celular (Figura 7).

Figura 7 - *Pellet* celular

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

O *pellet* celular foi então ressuspensionado em 1 mL de solução RPMI estéril (RPMI 1640 – Gibco®) e realizou-se a avaliação da viabilidade celular através da contagem de células viáveis em câmara de Neubauer pelo método de exclusão de células não viáveis coradas pelo Azul de *Trypan*.

Após a contagem de células viáveis, as amostras foram colocadas em criotubos estéreis em solução criopreservativa, constituída de soro fetal bovino e DMSO (10%) e congeladas imediatamente em freezer a temperatura de -80°C.

4.3 DESCONGELAMENTO DAS AMOSTRAS

Para o descongelamento, as amostras foram retiradas do *freezer* e colocadas em banho-maria a 37°C por 3 minutos, após esse procedimento, as amostras foram prontamente centrifugadas, para lavagem em tubos cônicos de 50 mL juntamente

com 20 mL de solução estéril de RPMI (RPMI 1640 – Gibco®) por 5 minutos a 405xg a 4°C. O *pellet* obtido foi então ressuspendido em 1mL de solução RPMI estéril (RPMI 1640 – Gibco®) e realizou-se a avaliação da viabilidade celular através da contagem de células viáveis em câmara de Neubauer pelo método de exclusão de células não viáveis coradas pelo Azul de *Trypan*. Desse modo, as células nucleadas da fração estromal vascular do tecido adiposo estavam preparadas para o procedimento de marcação celular com anticorpos e, posterior aquisição em citômetro de fluxo para a análise fenotípica e *sorting* (separação celular).

4.4 IMUNOFENOTIPAGEM

Após o processo de descongelamento das células da fração estromal vascular, 1×10^6 células/mL ou 100µL de suspensão celular foram diluídas em PBS para realização de marcações imunofenotípicas para aquisição em citômetro fluxo. Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 1.

Considerando que o CD45 (antígeno leucocitário comum) é quase completamente ausente em células medulares primitivas e que sua expressão difere progenitores comprometidos (CARVALHO et al., 2009), optou-se usá-lo para selecionar negativamente as células de interesse (CD45⁻) em substituição aos marcadores de linhagem. De acordo com Han et al (2010), selecionando-se negativamente as células através do CD45 podemos garantir que as células isoladas não são oriundas de eventual contaminação sanguínea da FEV do tecido adiposo.

Tabela 1 – Anticorpos monoclonais utilizados nos experimentos de fenotipagem

Especificidade	Clone	Marcação	Fabricante
Mouse anti pig - CD117	2B8/BM	Alexa Fluor 488	ABD SEROTEC
Rat anti dog – CD45	YKIX 16.13	PE	ABD SEROTEC
Mouse anti human - CD38	AT 13/5	FITC	ABD SEROTEC
Mouse anti dog – CD34 (biotinilado)	1H6	----	ABD SEROTEC
Estreptavidina (reagente acessório)	---	APC	ABD SEROTEC

Legenda: PE: Ficoeritrina; FITC:fluoresceína isocianetada : APC: alofocianina
 Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

Para aqueles marcadores não espécie específicos caninos, utilizou-se a ferramenta do NCBI (Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA) para a comparação de seqüências de DNA com os bancos de dados genômicos- o BLAST ou *Basic Local Alignment Search Tool*- a fim de verificar a semelhança interespecies do antígeno de superfície em questão. Foram utilizados os antígenos que demonstraram ao menos 80% de semelhança com a espécie canina.

Antes do procedimento de marcação imunofenotípica das amostras, utilizou-se *Fc receptor blocking solution-Human trustain Fcx* (BIOLEGEND®) na proporção 5µL para cada 100µL de suspensão celular e incubação das amostras a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos conforme indicação do fabricante. Para o próximo passo da marcação imunofenotípica, não foi necessária a lavagem das amostras com PBS.

Para o procedimento seguinte, que consistiu na marcação das amostras, utilizou-se os anticorpos previamente referidos na proporção de 10 µL de anticorpo para cada 100µL de suspensão celular ou 1×10^6 células/mL, conforme indicação do fabricante. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C e na ausência de luminosidade direta. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, resuspendidas em 300µL de PBS, colocadas em tubos de ensaio de 13mm,

próprios para citometria de fluxo e submetidas à leitura em um citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (*Becton & Dickinson*) (Figura 8).

Figura 8 - Citômetro de fluxo

Legenda: Citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (*Becton & Dickinson*)

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

4.5 CITOMETRIA DE FLUXO

Para aquisição das amostras foi utilizado o *software CellQuestPro versão (4.0.2)*. O formato dos citogramas escolhidos para as análises foi o *dot plot*, no qual cada evento (célula) é colocado no canal que corresponde ao seu valor de sinal, representado por um ponto, exibindo simultaneamente dois parâmetros em um mesmo gráfico. Foram adquiridos 10.000 eventos. Para a análise dos resultados foi utilizado o *software Flowjo (TreeStar) versão 10* e *Flowjo versão 7.6.1 (TreeStar)*.

4.5.1 Estratégia de *gate*

Inicialmente no projeto, dois painéis mínimos de imunofenotipagem foram estabelecidos: o primeiro consistindo de CD45, CD38 e CD34 e o segundo, de CD45, CD117 e CD34 a fim de estabelecer um comparativo entre os dois painéis no que diz respeito ao isolamento de CTH.

Para a análise e isolamento da população de CTH, a partir do primeiro painel de imunofenotipagem citado a seguinte estratégia de *gate* foi utilizada (Figura 9):

Começamos pela seleção de um *gate* abrangente denominado neste experimento de CTH (A). Através da expressão de CD45 e CD38 (B), pudemos instituir um novo *gate*, denominado de CD45⁺CD38^{-/LOW}. A partir deste último *gate*, foi feito um histograma das células CD34⁺ (C) demonstrando a porcentagem de células CD34⁺ da amostra.

Figura 9 - Demonstração da estratégia de *gate* utilizada para imunofenotipagem CD45, CD38 e CD34

Legenda: Inicialmente selecionou-se um *gate* abrangente denominado CTH (A), através da expressão de CD45 e CD38, um novo *gate* foi feito denominado CD45⁺CD38^{-LOW}. A partir deste último *gate* foi feito um histograma das células CD34⁺ demonstrando a porcentagem de células.

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

Para o segundo painel de imunofenotipagem, a mesma estratégia foi utilizada. O *gate* CTH (A) foi determinado e através da expressão de CD45 e CD117 um novo *gate*, denominado de CD45⁺CD117⁺ (B) foi estabelecido. A partir deste último *gate*, foi feito um histograma das células CD34⁺ (C) demonstrando a porcentagem de células CD34⁺ da amostra (Figura 10).

Figura 10 - Demonstração da estratégia de *gate* utilizada para imunofenotipagem CD45, CD117 e CD34

Legenda: Inicialmente selecionou-se um *gate* abrangente denominado CTH (A), através da expressão de CD45 e CD117, um novo *gate* foi feito denominado CD45⁺CD117⁺. A partir deste último *gate* foi feito um histograma das células CD34⁺ demonstrando a porcentagem de células.

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

Sabendo-se que células endoteliais imaturas expressam marcadores comuns às células-tronco hematopoiéticas e uma vez que, marcadores específicos de células endoteliais não foram utilizados, um novo experimento, com um novo marcador, desta vez de atividade celular, foi incluído. O ALDEFLUOR (*Stemcell Technologies*®) é um kit reagente usado para identificar células que expressam altos níveis de ALDH e conjuntamente com o CD34 pode enriquecer a fração de CTH. O kit ALDEFLUOR foi utilizado de acordo com as normas do fabricante. Para a análise do ALDEFLUOR é necessário que haja um tubo controle (DEAB) negativo para cada amostra a ser analisada.

No experimento com o ALDEFLUOR, duas análises foram realizadas. Na primeira análise, somente a marcação com ALDEFLUOR foi analisada, com base na estratégia de *gate* proposta em bula (Figura 11).

Figura 11 - Demonstração da estratégia de *gate* utilizada para imunofenotipagem ALDEFLUOR

Legenda: Para análise com ALDEFLUOR de acordo com técnica proposta em bula, é necessário a realização do controle DEAB (negativo) paralelamente à análise das células positivas para ALDEFLUOR.

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

A partir desta análise, procedeu-se uma segunda análise, desta vez incluindo os demais anticorpos utilizados CD45 e CD34 de forma a enriquecer ainda mais a fração CTHc. Um *gate* abrangente, denominado CTH (A), foi determinado. A partir deste *gate*, na análise da expressão de CD45, selecionou-se a fração das células

CD45⁻ (B). Baseados nesta fração, seguimos o protocolo proposto em bula para CTH (Figura 12).

Figura 12 - Estratégia de *gate* utilizada para imunofenotipagem CD45, ALDEFLUOR e CD34

Legenda: Porcentagem de células obtidas ALDEFLUOR⁺.
Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

4.5.2 **Sorting (separação celular)**

Para a realização do *sorting*, foi utilizado o citômetro de fluxo modelo *FACS Aria* (Becton & Dickinson) do NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular) da USP, filiado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Durante o

procedimento de *sorting* asséptico, as amostras foram gotejadas diretamente em meio de cultura MethoCult® (*Stem Cell Technologies*) para realização do ensaio CFU. As estratégias de *gate* utilizadas para os painéis de imunofenotipagem realizados durante o estudo estão demonstradas nas figuras 13 e 14.

Figura 13 - Estratégia de *gate* utilizada para a realização do *sorting* para o painel CD45/CD38^{LOW}/CD34⁺

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

Figura 14 - Estratégia de *gate* utilizada para a realização do *sorting* para o painel CD45⁻/CD117⁺/CD34⁺

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

4.6 ENSAIO CFU

A partir dos painéis de imunofenotipagem, realizou-se o *sorting* das células CD45⁻/CD38^{-LOW}/CD34⁺ e células CD45⁻/CD117⁺/CD34⁺. Para o ensaio CFU, foi utilizado o meio de cultura MethoCult® (Stem Cell Technologies) preparado e armazenado de acordo com instruções do fabricante. Esse meio de cultura é composto por metilcelulose o que confere sua característica semissólida, importante para “ancoragem” das células. Como o meio utilizado possuía somente fatores específicos para camundongos, suplementou-se o mesmo com os seguintes fatores: IL-3 canina (Goldbio®, 10ng/mL), eritropoietina humana (Eritromax®, 3U/mL), G-CSF

humano (FILGRASTINE[®], 10ng/mL), além de 200 µL de penicilina e 25 µL de gentamicina para cada 4mL de meio. As concentrações determinadas obedeceram àquelas inicialmente já constantes em bula.

As células obtidas através do *sorting* foram colocadas, em sua totalidade, diretamente em tubos cônicos contendo o meio de cultura. Após a coleta das células, as amostras foram agitadas vigorosamente com auxílio do *vortex* durante 1 minuto e colocadas em repouso, de forma que as bolhas geradas pudessem se dissipar. Uma vez dissipadas as bolhas, as amostras foram transferidas para uma placa de cultivo celular de 24 poços, em cada poço foi colocado o volume de 3mL de amostra. Para o controle, foi utilizada uma amostra de medula óssea. Somente as células CD34+ e CD45- foram selecionadas.

As amostras foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 21 dias e observadas diariamente sob microscopia óptica para a visualização da formação de colônias. O ensaio de clonogênese, teve o objetivo quantificar as CTHc funcionais. As culturas foram avaliadas ao longo de 21 dias e caso houvesse a formação de colônias as mesmas foram classificadas como: unidades formadoras de colônia eritróide (CFU-E), unidades formadoras de colônia granulocítica (CFU-G), unidades formadoras de colônia monocítica (CFU-M), unidades formadoras de colônia granulocítica/monocítica (CFU-GM) e unidades formadoras multilinhagens (CFU-GEMM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROCESSAMENTO DOS TECIDOS ADIPOSOS: CONTAGEM TOTAL E VIABILIDADE CELULAR APÓS DESCONGELAMENTO

Para o experimento, foram colhidas 25 amostras de tecido adiposo visceral e 18 amostras de tecido adiposo subcutâneo. A técnica enzimática de processamento dos tecidos adiposos se mostrou adequada uma vez que foram identificadas durante a contagem de célula na câmara de Neubauer células isoladas e não em grumos.

O gráfico 1 mostra o número total de células viáveis obtidas após a digestão com collagenase. O número de células viáveis totais obtidas corresponde à quantidade de tecido coletado, assim devido ao fato do tecido adiposo subcutâneo ter sido sempre menor, o número de células esperado corrobora com o número de células obtidas. Este fato se dá devido à restrição do cirurgião em doar uma quantidade grande deste tecido uma vez que o mesmo é crucial para o correto fechamento da ferida cirúrgica e evitar a formação de seroma.

Gráfico 1 - Número de células viáveis obtidas após a digestão dos tecidos adiposos subcutâneo e visceral

Além disto, observou-se que as amostras de tecido adiposo visceral apresentaram uma celularidade maior da encontrada no tecido adiposo subcutâneo uma vez que a quantidade doada foi sempre maior. Uma análise comparativa não

pode ser estabelecida devido ao fato das amostras não terem sido pesadas e, portanto, não foi possível realizar a razão número de células totais/peso.

Contudo, se pode observar que as amostras do tecido adiposo visceral sempre apresentavam maior contaminação sanguínea, e, portanto, na contagem total os leucócitos circulantes foram incluídos na contagem. Naturalmente, além de maior irrigação sanguínea local, este fato pode ter ocorrido, uma vez que as amostras de tecido adiposo visceral foram obtidas de procedimentos cirúrgicos terapêuticos (tais como piometra e esplenectomia), onde processos inflamatórios poderiam estar envolvidos, contribuindo assim, para o aumento da irrigação local. Neste sentido, as amostras do tecido adiposo subcutâneo foram obtidas de procedimentos cirúrgicos eletivos (castrações em sua maioria), não tendo processos inflamatórios envolvidos previamente e, além disso, anatomicamente a região recebe menos irrigação sanguínea.

Para o estabelecimento do número total de células viáveis após o descongelamento foram utilizadas 9 amostras de tecido adiposo obtidos do tecido subcutâneo e 13 amostras viscerais. Estes dados foram necessários para determinar se durante a realização da imunofenotipagem e do *sorting*, as amostras seriam tomadas individualmente ou em “pool” para uma maior concentração celular. Visto isso, com base nestes dados, optou-se então pela estratégia de “pool” celular. As viabilidades celulares após o descongelamento estão representadas no gráfico 2. Pode-se observar que não houve diferença estatística ($p < 0.64$) entre o tecido adiposo subcutâneo e o visceral. Porém, nota-se que a viabilidade celular após o descongelamento é baixa, em torno de 60%.

A diminuição da viabilidade celular observada neste trabalho após o descongelamento das amostras indica que tanto as células do tecido adiposo subcutâneo quanto o visceral sofreram com o processo de criopreservação uma vez que obtivemos uma viabilidade média de 60%. O método empregado na criopreservação pode induzir danos à estrutura celular e esta injúria pode resultar da extensiva desidratação celular e/ou devido à formação intracelular de cristais de gelo (CURY; GUARITA-SOUZA 2007). De Rosa et al (2009) encontrou melhores resultados de viabilidade com a solução de congelamento composta de 4% DMSO, 6% de trealose e 90% de soro fetal bovino. Desta forma, podemos inferir que a baixa concentração de DMSO (10%) utilizada para o congelamento das amostras pode ter

sido o fator contribuinte para os baixos índices de viabilidade celular obtidos após o descongelamento.

O procedimento adotado para o congelamento das células denomina-se de congelamento não controlado, ou seja, as células obtidas foram colocadas diretamente no freezer a -80°C . No congelamento controlado, a razão tempo/temperatura de congelamento é conhecida. Apesar disso, muitos estudos comparando os dois métodos de congelamento foram realizados. Cilloni et al. (1999) observou que a técnica de congelamento não controlado, embora diminuísse o número de células viáveis, não prejudicou o potencial clonogênico das células descongeladas, exceto nas unidades formadoras de colônia CFU-GEMM.

Gráfico 2 - Viabilidade celular após descongelamento de amostras de tecido adiposo subcutâneo e visceral

5.2 IMUNOFENOTIPAGEM

Devido à necessidade de realizar um *pool* de amostras para os painéis de imunofenotipagem, não foi possível correlacionar as porcentagens celulares obtidas com a origem do tecido adiposo utilizado (animais saudáveis ou tecidos adiposos obtidos a partir de processos patológicos, por exemplo, piometra e esplenectomias).

Com base na estratégia de *gate* estabelecida no item 4.5.1 foram realizados 4 experimentos de imunofenotipagem a partir de *pool* celular obtido da FEV tanto de

tecido adiposo subcutâneo, quanto de tecido adiposo visceral. Destas análises as tabelas 2 e 3 ilustram as porcentagens de celularidade obtidas em cada painel utilizado para isolamento de CTHc a partir das estratégias de *gate* e do total das células obtidas.

Tabela 2 - Porcentagem de células obtida a partir da estratégia de *gate* utilizada para cada painel de imunofenotipagem

Painel	Porcentagem total de células CD34 ⁺ (a partir da estratégia de <i>gate</i>)			
	<i>Pool 1</i>	<i>Pool 2</i>	<i>Pool 3</i>	<i>Pool 4</i>
CD45 ⁻ /CD117 ⁺ /CD34 ⁺	3,14	26,9	80,0	79,2
CD45 ⁻ /CD38 ^{-LOW} /CD34 ⁺	71,5	95,2	14	23,3

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

Tabela 3 - Porcentagem de células obtida com base no total de células obtidas

Painel	Porcentagem total de células CD34 ⁺ (total de 10.000 eventos)			
	<i>Pool 1</i>	<i>Pool 2</i>	<i>Pool 3</i>	<i>Pool 4</i>
CD45 ⁻ /CD117 ⁺ /CD34 ⁺	0,08	0,26	1,16	4,93
CD45 ⁻ /CD38 ^{-LOW} /CD34 ⁺	59,07	79,03	5,49	19,62

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

De acordo com Ramos et al. (2010), o antígeno de superfície CD38, além de ser expresso na maioria das células hematopoiéticas comprometidas, pode integrar a fração das células potencialmente endoteliais, assim como o CD34. Desta forma, pudemos inferir que as altas porcentagens obtidas a partir deste painel de imunofenotipagem pode conter conjuntamente células endoteliais, não constituindo uma boa estratégia para o enriquecimento da fração de CTHc. Com base nestas observações, o CD117 constituiu, neste estudo, uma melhor estratégia de imunofenotipagem para o enriquecimento da fração CTHc, comparativamente ao outro painel adotado utilizando o CD38.

Na primeira análise realizada somente considerando o ALDEFLUOR, observou-se uma baixa quantidade de células positivas em todas as amostras.

De acordo com a estratégia de *gate* CD45⁻/ALDEFLUOR⁺/CD34⁺, dentre as seis amostras analisadas, somente uma apresentou células ALDEFLUOR⁺ (0,005%). HAN et al (2010) ao isolar CTH da FEV do tecido adiposo de camundongos a partir da estratégia de isolamento de células LSK encontrou porcentagem semelhante destas células à porcentagem encontrada neste estudo

($0,004 \pm 0,001\%$). Com base nestas análises, pode-se concluir que a utilização do ALDEFLUOR como recurso para enriquecer a fração de células-tronco da FEV do tecido adiposo confere uma maior veracidade do que a demonstrada nos painéis de imunofenotipagem usados no presente estudo. A porcentagem de CTH encontrada neste estudo corroborou com dados de literatura, uma vez que o tecido adiposo possui em média catorze vezes menos CTH quando comparado à medula óssea (HAN, 2010), onde somente 0,05% do total de células são CTH (RECTOR, 2013). Para se afirmar com certeza se esta estratégia de *gate* com a utilização de ALDEFLUOR é adequada para a identificação de CTHc na FEV do tecido adiposo é necessário realizar o ensaio CFU para avaliação da proliferação e potencial de diferenciação celular.

5.3 ENSAIO CFU

O *sorting* foi realizado com o intuito de se obter a fração de CTH e imediatamente após a separação das células de interesse foi realizado o ensaio de CFU (Figura 15).

Figura 15 – Ensaio CFU

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

Neste estudo, durante o ensaio CFU, não se observou a formação de qualquer tipo de colônia após 21 dias transcorridos. Uma vez que a técnica de congelamento utilizada, de acordo com literatura, não prejudicaria o potencial clonogênico das células, podemos inferir que o número reduzido de células semeadas por placa foi um fator determinante para o crescimento das células em cultura.

De fato, nos dois experimentos procedidos para ensaios CFU, o número de células obtido pós *sorting* não ultrapassou a ordem de 10^4 células/mL (tabela 4), desta forma, podemos dizer que o número de células/poço não foi suficiente para o desenvolvimento das colônias a serem observadas. Outra possibilidade a ser considerada a respeito do resultado negativo do ensaio CFU é que o meio de cultura utilizado não foi espécie-específico, ou mesmo os fatores de crescimento podem ter sido tomados em dosagens não suficientes para estimular o crescimento celular.

Idealmente, ainda é necessário padronizar meios de cultura e dose de fatores de crescimento para cultivo de CTHc, assim como a obtenção de uma maior quantidade de células/placa para a observação do desenvolvimento de colônias.

Tabela 4 - Quantidade de células/placa após a realização do *sorting* para os painéis de imunofenotipagem

Painel	Número de células obtidas no <i>sorting</i> (células x 10 ⁴ /mL)	
	Experimento 1	Experimento 2
CD45 ⁺ /CD117 ⁺ /CD34 ⁺	0,57	0,46
CD45 ⁺ /CD38 ^{LOW} /CD34 ⁺	26	1,42

Fonte: (MAGALHÃES, 2014)

Uma das dificuldades observadas durante o experimento foi a obtenção de amostras homogêneas de tecido adiposo, no que diz respeito à quantidade e origem do material, uma vez que a coleta foi estritamente a critério do cirurgião. Este fato contrasta com estudos realizados em humanos onde Yoshimura et al (2006), num estudo comparativo de imunofenotipagem de células de tecido adiposo frescas e pós cultivo obtidas de lipoaspiração, conclui que o tecido adiposo é uma fonte promissora de células-tronco, uma vez que a quantidade obtida a partir destes procedimentos cirúrgicos é grande e a celularidade obtida pode ser clinicamente usada sem ser submetida a prévios processos de expansão. Outra observação deste experimento foi que as amostras apresentavam uma quantidade de células extremamente variável, a despeito de quantidade de tecido adiposo coletada e do local obtido.

Em resumo, frente a escassez de informação sobre a identificação de células tronco na espécie em questão o presente trabalho contribuiu na caracterização imunofenotípica das CTH caninas, contudo, especulamos que um painel com um maior número de marcadores seja necessário em estudos futuros.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- As contagens de células obtidas a partir da FEV de tecido adiposo visceral e subcutâneo foram muito variáveis, independente de serem obtidas de uma fonte ou outra e mesmo após o processo de descongelamento.
- O painel mínimo de imunofenotipagem CD45⁻/CD117⁺/CD34⁺ constitui uma melhor estratégia para isolamento de CTHc quando comparado ao painel CD45⁻/CD38^{+/low}/CD34⁺ para a espécie em questão.
- O ALDEFLUOR se mostrou uma ferramenta valiosa para o enriquecimento da fração de CTH.
- A estratégia de enriquecimento das CTHc utilizando o CD45, o ALDEFLUOR e o CD34 mostrou-se, neste estudo, mais fidedigna com dados obtidos de literatura do que as demais estratégias apresentadas.

Os dados em conjunto permitem concluir que o tecido adiposo, seja do subcutâneo ou visceral, embora de mais fácil acesso na espécie em questão, é uma fonte escassa de CTH, limitando a obtenção da mesma sob uma perspectiva terapêutica na clínica veterinária.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, L.; OLIVEIRA, C. D. E.; SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L. Conceitos e aplicações de células tronco em medicina regenerativa: uma revisão. **Rubs Curitiba**, v. 2, n. 2, p. 32-42, abril/junho 2006.
- AGGARWAL, R.; LU, J.; POMPILI, V. J.; DAS, H. Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, *ex vivo* expansion and clinical application. **Current Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 34-49, 2012.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Tecidos especializados, células-tronco e renovação de tecidos. In: _____. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 1417-1484.
- BD. Centro de conhecimento aplicado. **Citometria de fluxo. Imunofenotipagem**. São Paulo: BD, 2009. Apostila
- BELLANTUONO, I. Hematopoietic stem cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 607-620, 2004.
- BŁOGOWSKI, W.; RATAJCZAK, M. Z.; ZYŻNIEWSKA-BANASZAK, E.; DOŁĘGOWSKA, B.; STARZYŃSKA, T. Adipose tissue as a potential source of hematopoietic stem/progenitor cells. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 20, n. 5, p. 923-931, Janeiro 2012.
- BONNET, D. Haematopoietic stem cells. **Journal of Pathology**, v. 197, p. 430-440, 2002.
- CARVALHO, J. M.; SOUZA, M. K.; BUCCHERI, V.; RUBENS, C. V.; KERBAUY, J.; OLIVEIRA, J. S. R. CD34-positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analyses on the bone marrow of healthy allogenic donors. **São Paulo Medical Journal**, v. 127, n. 1, p. 12-18, 2009.
- CHUTE, J. P.; MURAMOTO, G. G.; WHITESIDES, J.; COLVIN, M.; SAFI, R.; CHAO, N. J.; MCDONNELL, D. P. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 31, p. 11707-11712, 2006.
- CILLONI, D.; GARAU, D.; REGAZZI, E.; SAMMARELLI, G.; SAVOLDO, B.; CAMARATTI, C.; MANGONI, L.; RIZZOLI, V.; STELLA, C.C. Primitive hematopoietic progenitors within mobilized blood are spared by uncontrolled rate freezing. **Bone Marrow Transplantation**, v. 23, p. 497-503, 1999.
- CIVIN, C. I.; STRAUSS, L. C.; FACKLER, M. J.; TRISCHMANN, T. M.; WILLY, J. M.; LOKEN, M. R. Positive stem cell selection-basic science. **Progress in Clinical Biological Research**, v. 333, p. 387-402, 1990.

COSTA, G.; KOUSKOFF, V.; LACAUD, G. Origin of blood cells and HSC production in the embryo. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 5, p. 215-223, 2012.

COULOMBEL, L. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. **Oncogene**, v. 23, p. 7210-7222, 2004.

COUSIN, B.; ANDRÉ, M.; ARNAUD, E.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA, L. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 1016-1022, 2003.

CURY, C. C.; GUARITA-SOUZA, L. C. The cultivated bone marrow –derived mesenchymal stem cells viability analysis after cryopreservation: experimental study in rats. In: SIMPÓSIO DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, 3., 2007, Curitiba. **Suplemento**. Curitiba: PUC, 2007. v. 29, n. 66.

DE ROSA A.; DE FRANCESCO, F.; TIRINO, V.; FERRARO, G. A.; DESIDERIO, V.; PAINO, F.; PIROZZI, G.; D'ANDREA, F.; PAPACCIO, G. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: na attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. **Tissue Engineering**, v. 15, n. 4, p. 659-667, 2009.

DU, W.; ADAM, Z.; RANI, R.; ZHANG, X.; PANG, Q. Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 11, p. 1909-1921, 2008.

FIEBIG, H. H.; MAIER, A.; BURGER, A. M. Clonogenic assay with established human tumour xenografts correlation of *in vitro* to *in vivo* activity as a basis for anticancer drug discovery. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 802-820, 2004.

HAN, J.; KOH, Y. J.; MOON, H. R.; RYOO, H. G.; CHO, C.; KIM, I.; KOH, G. Y. Adipose tissue is na extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood Journal**, v. 115, n. 5, p. 957-964, 2010.

HESS, D. A.; MEYERROSE, T. E.; WIRTHLIN, L.; CRAFT, T. P.; HERRBRICH, P. E.; CREER, M. H.; NOLTA, J. A. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. **Blood Journal**, v. 104, n. 6, p. 1648-1655, 2004.

ISHIZU, N.A.; SUDA, T. Hematopoietic stem cell niche: na interplay among a repertoire of multiple functional niches. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 2404-2409, 2013.

JAIN, N. C. Hematopoiesis. In:_____. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 72-81.

JANZ F. L. **Características de expansão , diferenciação e criopreservação de células-tronco mesenquimais obtidas do líquido amniótico no segundo trimestre de gestação**. 2010. 143f . Dissertação (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

JONES, R. J.; BARBER, J. P.; VALA, M. S.; COLLECTOR, M. I.; KAUFMANN, S. H.; LUDEMAN, S. M.; COLVIN, O. M.; HILTON, J. Assessment of ALDH in viable cells. **Blood Journal**, v. 85, n. 10, p. 2742-2746, 1995.

LADIGES, W. C.; STORB, R.; THOMAS, E. D. Canine models of bone marrow transplantation. **Laboratory Animal Science**, v. 40, n. 1, p. 11-15, 1990.

LILLY, A. J.; JOHNSON, W. E.; BUNCE, C. M. The haematopoietic stem cells niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour. **Stem Cells International**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

LUNA, A. C. L.; MADEIRA, M. E. P.; CONCEIÇÃO, T. O.; MOREIRA, J. A. C.; LAISO, R. A. N.; MARIA, D. A. Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice. **BMC Research Notes**, v. 7, p. 552, 2014.

MAYLE, A.; LUO, M.; JEONG, M.; GOODELL, M. A. Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. **Journal of International Society for Advancement of Cytometry**, v. 83, p. 27-37, 2013.

MENDES, M. L.; BITTENCOURT, H. N. S.; DUSSE, L. M. S. Células-tronco hematopoéticas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 3-7, 2010.

MICHISHITA, M.; AKIOSHY, R.; SUEMIZU, H.; NAKAGAWA, T.; SASAKI, N.; TAKEMITSU, H.; ARAI, T.; TAKAHASHI, K. Aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells from canine mammary carcinoma cell lines. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 508-513, 2012.

MIHU, C. M.; MIHU, D.; COSTIN, N.; CIUCA, D. R.; SUSMAN, S.; CIORTEA, R. Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 49, n. 4, p. 441- 446, 2008.

MORAES, J. M. **Utilização experimental e terapêutica das células tronco**: revisão de literatura. 2009. 47 f. Seminário (Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

NIEMEYER, G. P.; HUDSON, J.; BRIDGMAN, R.; SPANO, J.; NASH, R. A.; LOTHROP, C. D. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. **Experimental Hematology**, v. 29, p. 686-693, 2001.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood Journal**, v.81, n. 11, p. 2844-2853, 2012.

OVERMANN, J. A.; MODIANO, J. F.; O'BRIEN, T. O. Stem cell biology. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6.ed. Londres: Wiley-Blackwell, 2010. p. 14-19.

PIETRAS, E. M.; WARR, M. R.; PASSEGUÉ, E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 5, p. 709-720, 2011.

RAMOS, A. L.; DARABI, R.; AKBARLOO, N.; BORGES, L.; CATANESE, J.; DINEEN, S. P.; BREKKEN, R. A.; PERLINGEIRO, R. C. R. Clonal analysis reveals a common progenitor for endothelial, myeloid and lymphoid precursors in umbilical cord blood. **Circulation Research**, v. 107, n. 12, p. 1460-1469, 2010.

RECTOR, K.; LIU, Y.; ZANT, G.V. Comprehensive hematopoietic stem cell isolation methods. **Methods in Molecular Biology**, v. 976, p. 1-15, 2013.

REISER, J.; ZHANG, X.; HEMENWAY, C.; MONDAL, D.; PRADHAN, L.; LA RUSSA, V. F. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 5, n. 12, p. 1571-1584, 2005.

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. **Science**, v. 241, p. 58-62, 1988.

STORMS, R. W.; TRUJILLO, A. P.; SPRINGER, J. B.; SHAH, L.; COLVIN, O. M.; LUDEMAN, S. M.; SMITH, C. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 96, n. 16, p. 9118-9123, 1999.

STORMS, R. W.; GREEN, P. D.; SFFORD, K. M.; NIEDZWIECKI, D.; COGLEC.R.; COLVIN, O. M.; CHAO, N. J.; RICE, H. E.; SMITH, C. A. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. **Blood Journal**, v. 106, n. 1, p. 95-102, 2005.

SUDA, T.; ARAI, F.; HIRAO, A. Hematopoietic stem cells and their niche. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 8, p. 426-433, 2005.

SUTER, S. E.; GOUTHRO, T. A.; MCSWEENEY, P. A.; NASH, R. A.; HASKINS, M. E.; FELSBURG, P. J.; HENTHORN, P. S. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34⁺ cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 101, p. 31-47, 2004.

YOSHIMURA, K.; SHIGEURA, T.; MATSUMOTO, D.; SATO, T.; TAKAKI, Y.; AIBAKOJIMA, E.; SATO, K.; INOUE, K.; NAGASE, T.; KOSHIMA, I.; GONDA, K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. **Journal Cell Physiology**, v. 208, n. 1, p. 64-76, 2006.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279-4295, 2002.