

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**EFEITOS DAS DIFERENTES SOLUÇÕES DE CONGELAÇÃO
SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS CANINAS**

BRUNA APARECIDA DOS SANTOS

Botucatu, SP
Julho – 2022

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**EFEITOS DAS DIFERENTES SOLUÇÕES DE CONGELAÇÃO
SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS CANINAS**

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia
Animal para obtenção do título de
DOUTORA

Bruna Aparecida dos Santos
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda da
Cruz Landim

Botucatu, SP
Julho – 2022

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

Santos, Bruna Aparecida dos.

Efeitos das soluções de congelamento sobre a
criopreservação de células-tronco mesenquimais caninas /
Bruna Aparecida dos Santos. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz Landim
Capes: 50504002

1. Criopreservação. 2. Crioprotetores. 3. Tecido
adiposo. 4. Estudos de viabilidade. 5. Células-tronco
mesenquimais. 6. Cães.

Palavras-chave: Criobancos; Crioprotetores; Tecido
adiposo; Viabilidade.

Nome do autor (a): Bruna Aparecida dos Santos

Título: EFEITOS DAS DIFERENTES SOLUÇÕES DE CONGELAÇÃO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CANINAS

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Profa. Dra. Laura Leandro da Rocha

Membro

Departamento de Zootecnia, UFRPE - Recife/PE

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dra. Flávia Karina Delella

Membro

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências do Botucatu

Prof. Dr. Mateus José Sudano

Membro

Departamento de Genética e Evolução /UFSCAR - São Carlos/SP

Data da defesa: 27 de Julho de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por todas as graças que todos os dias me presenteia, por me manter de pé e com saúde. A ti Senhor, toda honra e toda glória.

Gratidão a minha família, meus pais Genivaldo e Maria, e minhas irmãs, Vanessa e Juliana, por todo amor, apoio, força, por sempre estarem ao meu lado apesar da distância, pelo incentivo e por confiarem que eu seria capaz. Sem vocês eu não teria chegado até aqui, o amor que sinto é imensurável.

Ao meu namorado Carlos Eduardo, pelo amor, carinho, paciência, incentivo, companheirismo, por todos os momentos felizes e de cumplicidade, por todas as lágrimas que você não deixou cair, e por todas que você enxugou. Obrigada por segurar a minha mão e me fazer acreditar que ainda existem pessoas maravilhosas. Eu te amo!

A todas minhas amizades, dentro e fora do meio acadêmico. Em especial a Nadja e Ana Beatriz. Quero agradecer por todo carinho, força, por me ouvirem, estarem ao meu lado, pelos momentos de descontração, por se fazerem família quando mais precisei, e aquecer meu coração para aguentar a saudade de casa.

Agradeço a minha orientadora Fernanda Landim, por ter me acolhido no seu grupo de estudos, e dado a oportunidade de desenvolver esta pesquisa. Em seu nome, agradeço também a Omics Biotecnologia pelo apoio financeiro.

A todos os funcionários da FMVZ (Andréia, Cibele, Felipe, Cabeça, Evandro, Camila) e todos os outros que fizeram parte dessa história. Aos colegas de laboratório, e todos que contribuíram para realização deste trabalho, em especial a Thaisy, Fernando e Wellington pelas contribuições, minha eterna gratidão, vocês foram essenciais.

A Clínica Veterinária Toca dos Bichos, em especial ao Médico Veterinário Rodrigo e toda equipe, pela parceria na concessão do material biológico para uso nessa pesquisa, e por serem tão prestativos e receptivos. Quero deixar meu profundo agradecimento aos proprietários que consentiram a coleta, e a suas lindas cadelinhas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

DEDICATÓRIA

“À minha família, meus pais Genivaldo e Maria, e minhas irmãs Vanessa e Juliana. Vocês são o motivo de tudo, foi por vocês que eu cheguei até aqui. Com todo meu amor e gratidão, dedico.”

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana...”

Carl Jung

RESUMO

SANTOS, B.A. **EFEITOS DAS DIFERENTES SOLUÇÕES DE CONGELAÇÃO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CANINAS**. Botucatu – SP. 2022. 88p. Defesa de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Para utilizar as células-tronco mesenquimais caninas (CTMs) em terapias é imprescindível que sejam formados criobancos de armazenamento celular, sendo assim, a metodologia da criopreservação de CTMs necessita de estudos, uma vez que o efeito da congelação e dos agentes crioprotetores sobre as células obtidas de tecido adiposo canino ainda é pouco conhecido. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes tipos de soluções na criopreservação das CTMs, sobre a estrutura, viabilidade, proliferação celular, ultraestrutura e expressão gênica, bem como no seu desenvolvimento pós-descongelação. Para isto, foram isoladas células-tronco de 12 cadelas. As amostras foram divididas em 5 tratamentos: não criopreservado (controle) = NCRIO; 90% SFB (Soro fetal Bovino) com 10% DMSO = SFB; Meio de cultivo DMEM/F12 alta glicose acrescido com 20% SFB e 10% DMSO = DMEM/F12; DMEM/F12 alta glicose, acrescido com 5%PVA, 5% de ITS, 5% de BSA e 10% DMSO = PVA/ITS/BSA e Bambanker™ = BAM. Sendo que em todos foram utilizados o Dimetilsufóxido (DMSO) como agente crioprotetor principal. As células foram avaliadas antes da criopreservação, pós-descongelação imediata e após o recultivo. Foi realizada uma análise de custo das diferentes soluções. A viabilidade e apoptose celular foram avaliadas pelo teste de exclusão com o corante *Trypan blue* e anexina V; a proliferação celular, pela curva de crescimento; a ultraestrutura em microscópio eletrônico de transmissão, a expressão gênica por RT-qPCR e a análise de custo através de pesquisa de mercado. Todos os dados foram submetidos a análise estatística pelo software SAS versão 9.4. Os resultados mostraram que as CTMs criopreservadas com o meio comercial foi superior aos demais quanto ao número de células e a proliferação celular, mas foi similar aos grupos NCRIO e PVA/ITS/BSA quanto a viabilidade celular. Embora não tenham sido observadas alterações morfológicas significativas entre os tratamentos de criopreservação, a ultraestrutura celular variou de acordo com os componentes do meio, no qual a morfologia mais próxima da encontrada nas células frescas foi observada nos grupos PVA/ITS/BSA e BAM. A expressão gênica demonstrou que as células apresentaram diferenças quanto aos tratamentos para os transcritos CD44, TGFB1, CXCL12 e IDO. Neste estudo foi observado que embora o tratamento com a marca comercial tenha sido superior aos demais crioprotetores, as outras combinações de substâncias crioprotetoras testadas foram eficientes na

criopreservação das CTMs caninas, sendo alternativas que podem ser utilizadas. Todos os tratamentos possibilitaram a retomada das funções celulares normais após a descongelação e recultivo. E as soluções autoformuladas são economicamente mais viáveis que a marca comercial. Esses resultados são importantes para o estabelecimento de protocolos de criopreservação de CTMs nessa espécie, pois aumentam as possibilidades de escolha da solução crioprotetora e também permite o uso de soluções com custos mais acessíveis e sem componentes contaminantes como o SFB.

Palavras-chave: Criobancos; crioprotetores; viabilidade; tecido adiposo

ABSTRACT

SANTOS, B.A. **EFFECTS OF DIFFERENT FREEZING SOLUTIONS ON CRYOPRESERVATION OF CANINE MESENCHYMAL STEM CELLS**. Botucatu – SP. 2022. 88p. Defesa de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

In order to use canine mesenchymal stem cells (MSCs) in therapies, it is essential that cryobanks of cell storage are formed, therefore, the methodology of cryopreservation of MSCs needs studies, since the effect of freezing and cryoprotective agents on the cells obtained from canine adipose tissue is still poorly understood. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of different types of solutions in the cryopreservation of MSCs, on the structure, viability, cell proliferation, ultrastructure and gene expression, as well as on their post-thawing development. For this, stem cells from 12 female dog were isolated. The samples were divided into 5 treatments: not cryopreserved (control) = NCRI0; 90% FBS (Fetal Bovine Serum) with 10% DMSO = FBS; High glucose DMEM/F12 culture medium plus 20% FBS and 10% DMSO = DMEM/F12; DMEM/F12 high glucose plus 5%PVA, 5% ITS, 5% BSA and 10% DMSO = PVA/ITS/BSA and BambankerTM = BAM. In all, Dimethylsulfoxide (DMSO) was used as the main cryoprotective agent. Cells were evaluated before cryopreservation, immediate post-thawing and after reculture. A cost analysis of the different solutions was carried out. Cell viability and apoptosis were evaluated by the Trypan blue dye and annexin V exclusion test; cell proliferation, by the growth curve; ultrastructure in transmission electron microscope, gene expression by RT-qPCR and cost analysis through market research. All data were submitted to statistical analysis using the SAS software version 9.4. The results showed that the MSCs cryopreserved with the commercial medium was superior to the others in terms of cell number and cell proliferation, but was similar to the NCRI0 and PVA/ITS/BSA groups in terms of cell viability. Although no significant morphological changes were observed between the cryopreservation treatments, the cellular ultrastructure varied according to the components of the medium, in which the morphology closest to that found in fresh cells was observed in the PVA/ITS/BSA and BAM groups. The gene expression showed that the cells showed differences regarding the treatments for the CD44, TGFB1, CXCL12 and IDO transcripts. In this study, it was observed that although the

treatment with the commercial brand was superior to other cryoprotectants, the other combinations of cryoprotective substances tested were efficient in the cryopreservation of canine MSCs, being alternatives that can be used. All treatments allowed the resumption of normal cell functions after thawing and reculture. And self-formulated solutions are more economically viable than branded. These results are important for the establishment of cryopreservation protocols for MSCs in this species, as they increase the possibilities of choosing the cryoprotectant solution and also allow the use of more affordable solutions without contaminating components such as FBS.

Keywords: cryobanks; cryoprotectants; viability; adipose tissue

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das doadoras utilizadas no estudo.....	36
Figura 2. Demonstração das análises e desenho experimental.....	36
Figura 3. Células-tronco caninas, aderentes ao plástico e com morfologia fibroblastóide.....	37
Figura 4. Curva de viabilidade das CTMs caninas após a descongelação nas horas observadas (4, 12, 24, 48 e 96 horas).....	44
Figura 5. Curva de crescimento das CTMs caninas após 144 horas.....	45
Figura 6. CTMs caninas não submetidas a congelação NCRI.....	46
Figura 7. CTMs após a descongelação, tratamento SFB.....	47
Figura 8. CTMs após a descongelação, tratamento DMEM/F12.....	48
Figura 9. CTMs após a descongelação, tratamento PVA/ITS/BSA.....	49
Figura 10. CTMs após a descongelação, tratamento BAM.....	50
Figura 11. CTMs recultivadas, tratamento SFB	51
Figura 12. CTMs recultivadas, tratamento DMEM/F12.....	52
Figura 13. CTMs recultivadas, tratamento PVA/ITS/BSA.....	53
Figura 14. CTMs recultivadas, tratamento BAM.....	54
Figura 15. Expressão gênica das CTMs caninas.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Imunofenotipagem para os marcadores de membrana de CTMs caninas.....	37
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> dos genes que foram utilizados na RT-qPCR.....	40
Tabela 3. Comparação de médias para o efeito de tratamento.....	43
Tabela 4. Comparação de médias para o efeito de criopreservação.....	43
Tabela 5. Comparação de médias da viabilidade sobre os tratamentos.....	44
Tabela 6. Proliferação das CTMs caninas após 144 horas.....	45
Tabela 7. Custo das soluções crioprotetoras.....	57

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Células-tronco mesenquimais (CTMs): importância e utilização.....	4
2.2. A criopreservação celular.....	7
2.3. Crioprotetores	10
2.4. Métodos de avaliação de células criopreservadas.....	16
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS	18
3.1. Hipótese.....	18
3.2. Objetivo geral.....	18
3.3. Objetivos específicos	18
4. REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2	29
ARTIGO CIENTÍFICO	30
Highlights	30
Abstract	31
1. Introdução	32
2. Material e métodos	34
2.1. <i>Reagentes, meios e protocolos</i>	34
2.2. <i>Aspectos éticos</i>	34
2.3. <i>Coleta, isolamento e cultivo das CTMs caninas</i>	34
2.4. <i>Criopreservação das amostras e delineamento experimental</i>	35
2.5. <i>Caracterização das CTMs</i>	37
2.6. <i>Teste de viabilidade celular com Trypan blue</i>	37
2.7. <i>Teste de viabilidade com anexina V</i>	38
2.8. <i>Protocolo de transporte</i>	38
2.9. <i>Teste de proliferação celular</i>	38
2.9. <i>Análise de ultraestrutura</i>	39
2.10. <i>PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)</i>	39
2.11. <i>Análise de custo das soluções crioprotetoras</i>	41
2.12. <i>Análise estatística</i>	41

3. RESULTADOS	42
3.1. <i>Viabilidade celular</i>	42
3.2. <i>Protocolo de transporte</i>	44
3.3. <i>Proliferação celular</i>	44
3.4. <i>Ultraestrutura</i>	45
3.5. <i>PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)</i>	54
3.6. <i>Análise de custo das soluções crioprotetoras</i>	56
4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÃO	65
6. AGRADECIMENTOS	65
7. REFERÊNCIAS	66

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil ocupa o segundo lugar do ranking de países que mais possuem animais de estimação, e de acordo com dados levantados pelo IBGE e atualizados pelo Instituto Pet Brasil, em 2018 foram contabilizados no país 54,2 milhões de cães. O mercado pet e o número de adoções de cães (*Canis lupus familiaris*) estão crescendo consideravelmente, principalmente durante a pandemia do Coronavírus. O crescimento elevado deve-se à solidão que as pessoas sentem nesse período de isolamento social, e também ao fato delas permanecerem por mais tempo em casa (PET BRASIL, 2022).

Em 2019, o setor faturou R\$ 35,4 bilhões de reais, obtendo um crescimento de 3% em relação ao ano anterior. Esse faturamento está relacionado a indústria *Pet Food*, *Pet Care*, serviços veterinários e venda de animais. Vale salientar que a Cadeia Pet é um dos setores que mais gera emprego, sendo que, em 2018, aproximadamente 2 milhões de postos de trabalho foram gerados diretamente pelo setor (PET BRASIL, 2022).

Além dos fatos já mencionados, os cães de estimação possuem importância sentimental para seus tutores, sendo muitas vezes considerados como membro da família, estabelecendo uma interação homem-animal, e uma troca de cuidados e afetos (ALMEIDA; PAZ; OLIVEIRA, 2020).

A preocupação do tutor com o bem-estar e a saúde dos animais tem crescido, e em casos de doenças ou de problemas de saúde provenientes da velhice, são priorizados tratamentos/terapias que forneçam uma maior qualidade e expectativa de vida, além da plena recuperação. Atualmente a terapia celular tem sido uma alternativa cada vez mais indicada pelos médicos veterinários para o tratamento de algumas doenças caninas, pelos resultados obtidos (ARMSTRONG et al., 2012).

As células-tronco estromais mesenquimais (CTMs), são encontradas na maioria dos tecidos adultos, podendo ser isoladas da medula óssea, tecido adiposo e placentário. As CTMs possuem a habilidade de se diferenciar *in vitro* para adipócitos, mioblastos, osteoblastos e condrócitos. Além disso, conferem suporte a hematopoiese, tolerância imunológica, reconstituição funcional de determinados tecidos, bem como resistência à fibrose, a apoptose ou a hipertrofia (MORONI; FORNASARI, 2013). Adicionalmente, tem uma atividade imunossupressora, que evita efeitos adversos relacionados a rejeição entre o

material transferido e o hospedeiro (ZHOU H. et al, 2008).

As CTMs secretam citocinas e fatores de crescimento que possuem atividade parácrina e autócrina, sendo este o principal mecanismo de ação que confere efeitos terapêuticos das células (GNECCHI; ZHANG; NI; DZAU, 2008). Apesar dos inúmeros benefícios, a produção de células e a criopreservação ainda possui entraves, uma vez que o efeito da congelação sobre as células obtidas de tecido adiposo canino ainda é pouco estudado.

A criopreservação celular visa a manutenção das células vivas por um longo tempo sem a necessidade de múltiplas passagens, evitando a perda de características fenotípicas e alterações genéticas, previne contaminações, e mantém suas funções biológicas inativadas de forma controlada, evitando o comprometimento de suas funções após a descongelação (GINANI; SOARES; BARBOZA, 2012). Além disso, podem ser transportadas para utilização na terapia celular.

O método mais utilizado para criopreservar células é o da congelação lenta, na qual uma queda gradativa da temperatura leva a formação de gelo extracelular promovendo uma desidratação progressiva da célula com aumento da concentração de soluto intracelular até um estado passível de solidificação. O grau de dano imposto à célula durante a congelação depende diretamente do tipo de crioprotetor utilizado e da curva de resfriamento empregada durante o procedimento (BENSON et al., 2008). Nestas condições, os índices de sobrevivência de células mamíferas só são aceitáveis na presença de substâncias crioprotetoras (HUBEL, 1997).

Na produção de células-tronco em larga escala com a finalidade de utilizar nas terapias, é necessário que sejam feitos criobancos de CTMs, e que se desenvolvam protocolos de criopreservação eficientes, para viabilizar o armazenamento por longos períodos, sem comprometer a sua funcionalidade. Desta forma a escolha da solução ideal de substâncias com ação crioprotetora é uma etapa importante para o sucesso da técnica (HUNT, 2019).

Existem poucos crioprotetores para a preservação de células somáticas, e apesar do glicerol, sacarose e trealose, não apresentarem toxicidade nas CTMs, ainda precisam ser mais investigados quanto ao uso (JANZ et al., 2012).

Diante do que foi explanado, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de diferentes soluções crioprotetoras, sobre a estrutura, viabilidade, proliferação e

expressão gênica. Propiciando a utilização de soluções autoformuladas sem a presença de agentes contaminantes como o SFB e que sejam mais viáveis economicamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células-tronco mesenquimais (CTMs): importância e utilização

O termo célula-tronco mesenquimal (CTMs) surgiu a partir de observações *in vitro* que este tipo celular tem a capacidade de se diferenciar nas várias linhagens de tecidos mesodermis. Foram definidas como células-tronco adultas, multipotentes, e tem uma capacidade de renovação limitada, podendo se diferenciar em tipos celulares como osso, cartilagem, gordura e músculo (CAPLAN, 1991).

Pela sua facilidade de divisão e proliferação as CTMs são responsáveis pela manutenção e renovação dos tecidos adultos, podem ser expandidas *in vitro* em meio de cultura (CAPLAN, 2005). Elas foram isoladas inicialmente da medula óssea, tecido adiposo e tecido placentário. As células-tronco derivadas do tecido adiposo possuem um potencial de diferenciação semelhante ao das derivadas da medula óssea, sendo a sua principal vantagem o fato de que podem ser coletadas com métodos minimamente invasivos, e são facilmente isoladas e cultivadas (STERODIMAS et al., 2010).

As CTMs têm habilidades funcionais de diferenciação *in vitro* para adipócitos, mioblastos, osteoblastos e condrócitos, suporte de hematopoiese, tolerância imunológica, reconstituição funcional de determinados tecidos, resistência à fibrose, apoptose ou hipertrofia (MORONI; FORNASARI, 2013). Com uma atividade imunossupressora, que evita efeitos adversos relacionados a rejeição entre o material depositado e o hospedeiro (ZHOU H. et al, 2008).

Estão presentes ou são atraídas para locais de lesão ou doença, e secretam fatores bioativos que são imunomoduladores e tróficos. Isto significa que a principal função das CTMs tanto endógenas, como transplantadas, é a produção de substâncias com efeito terapêutico, promovendo a reparação e regeneração tecidual e não a diferenciação em células do tecido lesado. Por este motivo, novamente Caplan sugeriu a modificação do nome para células

sinalizadoras medicinais, do inglês “*medicinal signaling cells*” – MSCs (CAPLAN,2017).

A ação imunomoduladora das CTMs depende da imunorreatividade do ambiente no qual elas estão inseridas pois elas têm a capacidade de promover ou restringir a inflamação quando o sistema está imunossuprimido ou superativado. Essa modulação é realizada por ação tanto parácrina como autócrina através da produção de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e vesículas extracelulares, que trabalham de forma associada com mecanismos que dependem do contato celular (GOMZIKOVA et al., 2019; GNECCHI, ZHANG; NI; DZAU, 2008).

Com o avanço dos estudos em Medicina Veterinária, voltados para o desenvolvimento de terapias regenerativas, a terapia celular com o uso das CTMs, vem se mostrando eficaz e confiável para o tratamento de algumas doenças que acometem a espécie canina. Assim, sua utilização tem sido cada vez mais frequente e indicada pelos Médicos Veterinários. As novas intervenções terapêuticas com as células, se sobressaem as terapias tradicionais com moléculas farmacêuticas, pois possuem ação diferente por meio de mecanismos endógenos. Não acarretando em efeitos colaterais. (MOUNT et al.,2015).

Há relatos na literatura de casos bem-sucedidos com a utilização das CTMs, que obtiveram resultados satisfatórios para o tratamento de algumas doenças. Foi feito um estudo para avaliar o uso das células do tecido adiposo para o tratamento da Osteoartrite (articulação do quadril) em cães, e os autores relataram que houve melhora significativa dos pacientes (VILAR et al., 2014).

Outro estudo avaliou os cães acometidos por displasia coxofemoral, que receberam as CTMs derivadas da fração vascular estromal (FVS) autólogo, e do tecido adiposo (alogênico) da gordura inguinal. Os animais foram avaliados por um período de 3 meses e tiveram melhora nos escores clínicos em todos os pacientes, porém os cachorros que receberam a FVS, obtiveram melhores resultados do que as do tecido adiposo alogênicas (MARX et al., 2014).

A Degeneração crônica do disco intervertebral (DDIV), também foi investigada, os cães foram tratados com CTMs da medula óssea da crista íliaca, e foram feitos exames neurológicos e ressonância magnética. Os resultados

alcançados foram melhorias na sensação de dor, reflexos e ataxia, mas nenhuma alteração nas características da ressonância magnética foi observada (PENHA et al.,2014).

Os cães com fístulas perianais (furunculose) refratárias à ciclosporina, receberam CTMs derivadas de linhagem de células-tronco embrionárias humanas MA09, xenogênicas. Foi feito um acompanhamento no período de 1 ano, mas com 3 meses já foi observado o fechamento completo das fístulas em todos os cães, porém em 2 animais ela foi recidiva após 6 meses. Apesar disso conseguiram ter uma redução de 50% no uso de ciclosporina em 5/6 cães aos 3 meses e 4/6 cães aos 6 meses (FERRER et al.,2016).

Foi relatado que as CTMs derivadas da medula óssea podem melhorar o resultado funcional de equinos acometidos por tendinite e desmíte, e comprovaram que a terapia é segura e tem um excelente resultado, pois os animais que receberam o tratamento retornaram ao seu nível anterior de atividade esportiva (RENZI et al., 2013).

A revisão de literatura sobre a terapia com células-tronco para o tratamento da função renal de animais com lesão de isquemia-reperfusão renal (RIRI) mostrou que as CTMs de diversas fontes podem melhorar a função renal de animais RIRI, mas as células derivadas do tecido adiposo e do músculo foram as mais pesquisadas e possivelmente tem o maior potencial terapêutico (SHANG et al., 2021).

A avaliação do efeito das CTMs caninas carregadas com paclitaxel (agente quimioterápico) no crescimento de linhas celulares de glioma canino e glioblastoma humano, mostraram que as células da medula óssea e do tecido adiposo foram capazes de captar e liberar paclitaxel, e que conseguiram inibir a proliferação da linha celular de glioma canino J3T e das linhas celulares de glioblastoma humano T98G e U87MG (BONOMI et al., 2017).

Alguns estudos foram conduzidos para avaliar a aplicação das CTMs para o tratamento de doenças que acometem os gatos, como a gengivoestomatite crônica felina (ARZI et al., 2016), a asma (TRZIL; MASSEAU; WEBB, 2016), e a osteoartrite e cardiomiopatia felina (TAGHAVI; SHARP; DURAN, 2015). Todas as pesquisas supracitadas relataram que os felinos obtiveram uma melhora após a administração da terapia celular para estas doenças.

Estas pesquisas indicaram que as CTMs têm sido usadas com sucesso na clínica para regeneração de ossos, cartilagens, medula espinhal, cardíaca, rim e da bexiga. É notável que as células podem ser usadas para melhorar os cuidados de saúde dos animais que são acometidos por algumas doenças, aumentando o potencial regenerativo do próprio corpo ou desenvolvendo novas terapias (BAJADA et al., 2008).

No entanto, para produzir as células-tronco em larga escala com a finalidade de utilizar nas terapias, é necessário que sejam feitos criobancos de CTMs, e que desenvolvam protocolos de criopreservação eficientes para espécie trabalhada em questão, que viabilizem o armazenamento por longos períodos sem comprometer a sua funcionalidade (HUNT, 2019).

2.2. A criopreservação celular

Por definição a criopreservação é a conservação das células, tecidos ou qualquer outro material biológico, expostos a temperaturas negativas, fazendo-se o uso de substâncias químicas denominadas de crioprotetores, com o intuito de manter a amostra viável e em condições de utilização em situações posteriores (HUBEL, 1997). Essa técnica é bastante empregada em cultivo celular, para formação de bancos.

As primeiras tentativas de criopreservação celular foram com hemácias, o sangue era congelado com hidroxietilamido ou pentamido e logo após eram conservados em Nitrogênio. No entanto, depois da descongelação as taxas de viabilidade eram muito baixas, então devido ao fracasso dessa técnica ela parou de ser utilizada (VALERI & RAGNO, 2005).

O cultivo celular por períodos prolongados pode ocasionar uma perda de características fenotípicas e alterações genéticas. Então uma das finalidades da criopreservação é a manutenção das células congeladas em bancos, diminuindo seu metabolismo, devido a diminuição da temperatura, retardando e prevenindo essas alterações, otimizando o uso desse material em momentos posteriores. (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2007).

Outro fator importante da criopreservação é impedir a senescência durante longos períodos de cultivo. A célula atinge a senescência quando há um encurtamento dos telômeros e o bloqueio do ciclo celular. Quando crescem de

forma acelerada *in vitro*, o encurtamento dos telômeros pode aumentar até chegar em um platô, causando uma instabilidade cromossômica generalizada o que promove uma apoptose em massa, ou seja, as células morrem (LLOYD, 2002).

É necessário observar as diferenças entre os tipos celulares, já que as células de uma determinada espécie e ou tecido podem responder de forma diferente a um protocolo de criopreservação, por que possuem disparidade quanto a sua composição física e biológica, como por exemplo, a permeabilidade da membrana e razão superfície/volume, e isso acaba acarretando problemas com a viabilidade e as funções metabólicas das células. Diante disso, observa-se a necessidade de ajustar o protocolo de criopreservação de acordo com os tipos celulares de interesse (HUNT, 2019).

O aperfeiçoamento da técnica de criopreservação é tão importante quanto a melhora do processo de cultivo celular, para que se obtenha um produto final que seja consistente e de máxima qualidade. Quando a criopreservação não é feita de maneira adequada pode haver uma variação de linhagem para linhagem das células, ter uma queda significativa no rendimento celular, redução das funções celulares, e de forma não intencional, produzir uma subpopulação de células que tenham diferenças genéticas e epigenéticas das CTMs de origem (HUNT, 2019).

Os cuidados para realizar a criopreservação vão além de se obter um produto final com boa viabilidade e que consiga ser expandido após o congelamento. Existem consequências que precisam ser levadas em consideração, principalmente para o uso em terapias. Foi verificado que a presença de células apoptóticas e necróticas no produto final aplicado no paciente pode provocar uma resposta inflamatória ou induzir uma reação imunológica anormal (HOTCHKISS et al., 2009).

Intervenções são necessárias durante a criopreservação das CTMs, para enfraquecer a ativação da via de coagulação. Onde, podem ser desenvolvidos novos protocolos com crioprotetores diferentes, e que incluam a administração de anticoagulantes genéricos, ou inibidores genéticos para fator tecidual, com o objetivo de reduzir a probabilidade de tromboembolismo associado a terapia com CTMs (TATSUMI et al., 2013). É uma estratégia eficaz para melhorar a qualidade

das CTMs descongeladas, tanto no que se diz respeito a produção, quanto ao desenvolvimento e aplicação dessas células nas terapias.

Outra questão levantada, é a temperatura de criopreservação e o período de tempo de conservação após a congelação. Quanto a temperatura, geralmente as células são congeladas em nitrogênio líquido há -196°C , ou armazenadas em ultrafreezers há -80°C . Foi feita uma pesquisa com células da polpa dentária criopreservadas por 6 meses nas duas temperaturas (-196°C e -80°C) e constataram que o resultado é semelhante, e que a capacidade de diferenciação celular foi idêntica nos dois grupos (WOODS et al., 2009).

Em relação ao tempo ideal de criopreservação, PAPACCIO et al. (2006) estudaram a criopreservação de células derivadas da polpa dentária, que foram mantidas criopreservadas pelo período de 2 anos, após a reconstituição apresentaram capacidade de diferenciação em osteoblastos e integridade celular sem alterações, mostrando que as características celulares foram mantidas após um longo período de congelação.

Um estudo com células de tecido adiposo canino, avaliou os efeitos da criopreservação após o período de 1 ano, e concluíram que as CTMs conservaram sua morfologia semelhante a fibroblastos, com positividade de fosfatase alcalina e expressão de marcadores (MARTINELLO et al., 2011). Também foi avaliado o período de criopreservação de células do tecido adiposo por 6 meses, e os autores relataram que as células não tiveram perda de potencial proliferativo ou de diferenciação (GONDA et al., 2008).

Outros autores estudaram o período de criopreservação por 30 dias (GINANI; SOARES; BARBOZA, 2012; TEMMERMAN et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011) e não constataram diferenças significativas na proliferação e na capacidade de diferenciação celular. OLIVEIRA et al. (2020) ao avaliar as células provenientes de catetos (*Pecari tajacu*) criopreservadas por 2 semanas, obtiveram os mesmos resultados que os autores supracitados. O que leva a concluir que o tempo de criopreservação tanto curto quanto longo, não afeta as características biológicas das células-tronco.

O método de criopreservação mais utilizado para células de mamíferos é o da refrigeração lenta (BOMHARD et al., 2016; FUJIKAWA et al., 2017). Na qual ocorre uma queda gradativa da temperatura, levando a formação de gelo extracelular, promovendo uma desidratação progressiva da célula com aumento

da concentração de soluto intracelular até um estado passível de solidificação. O grau de dano imposto à célula durante o congelamento vai depender diretamente do tipo de crioprotetor utilizado, e da curva de resfriamento empregada durante o procedimento (BENSON et al., 2008).

Se o processo da congelação for muito lento, pode ocorrer algumas implicações nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático, por causa da desidratação irreversível causada na célula. Entretanto, se o congelamento for muito rápido, as células não passarão pela desidratação de forma adequada, e a água intracelular residual poderá formar cristais de gelo, que pode ocasionar um comprometimento das organelas. Uma taxa ótima de resfriamento foi preconizada para as células de mamíferos que é de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (GURRUCHAGA et al., 2019).

Para atingir essa velocidade de temperatura ideal, foi desenvolvido o sistema Mr. Frosty (Mr. Frosty™ Freezing Container) um suporte para colocar os tubos criogênicos, que contém álcool isopropílico, no qual o mesmo fica localizado em baixo do recipiente, e é responsável por permitir que a velocidade de arrefecimento ideal seja alcançada, chegando a uma taxa de resfriamento de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (LEÓN- QUINTO et al., 2014). Nestas condições, os índices de sobrevivência de células mamíferas só são aceitáveis na presença de substâncias crioprotetoras (HUBEL, 1997).

2.3. Crioprotetores

Os agentes crioprotetores são essenciais para a criopreservação de células e tecidos, pois sem a sua utilização, o congelamento seria uma prática inviável. Agem diminuindo os danos causados no processo de criopreservação lenta. Essas substâncias químicas tem uma ação coligativa com as moléculas de água, essa função é de extrema importância para evitar que se formem cristais de gelo intracelular, e para que reduza os danos causados pelas altas concentrações dos solutos presentes na suspensão das células, evitando assim, a desidratação das proteínas e lesões na membrana plasmática (SILVA; RODRIGUES; SILVA, 2017).

Alguns aspectos devem ser levados em consideração para escolha do crioprotetor ideal, pois a proteção oferecida pelo mesmo vai depender de alguns

fatores, como a concentração, temperatura de exposição, duração da exposição, a concentração usada na adição e remoção do crioprotetor, o tampão osmótico usado durante sua remoção e a taxa de resfriamento e aquecimento, devem ser considerados durante a otimização do processo de criopreservação (ELLIOTT; WANG; FULLER, 2017).

Existem dois tipos de crioprotetores: os permeáveis ou intracelulares, e os não permeáveis ou extracelulares. Os permeáveis são aqueles que podem passar pelas membranas celulares, pois são substâncias químicas que possuem uma massa molecular baixa. São ausentes de carga residual, e possuem alta solubilidade em meio aquoso, o que facilita sua entrada na célula. Fazem ligações de hidrogênio com as moléculas da água, além de prevenir a exposição das células a elevadas concentrações de eletrólitos (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Nesse grupo temos: o glicerol, etilenoglicol (EG), 1,2-propanodiol e dimetilsulfóxido (Me₂SO ou DMSO) (HUNT et al., 2011). A eficácia desses crioprotetores dependerá da temperatura, da permeabilidade e do tipo de célula, além de sua toxicidade química (HUNT, 2019).

Os não permeáveis ou extracelulares, agem de uma forma diferente, provocando o aumento da osmolaridade do meio extracelular, removendo a água do interior das células para o meio extracelular, impedindo a formação de cristais de gelo em seu interior durante a congelação. Eles são macromoléculas, e não penetram nas células por causa do seu alto peso molecular. Entre eles estão: o hidroxietilamido, polivinilpirrolidona, soro fetal bovino, trealose, frutose, sacarose e glicose. Geralmente são utilizados por causa da sua baixa toxicidade (HUNT et al., 2011; RODRIGUES et al., 2008).

Durante a criopreservação as células são submetidas a condições extremas como choque frio, estresse osmótico, toxicidade do crioprotetor, formação de gelo intracelular e estresse oxidativo (PEGG, 2015). O soro fetal bovino (SFB) vem sendo utilizado como crioprotetor extracelular para sanar essas limitações e melhorar a eficiência do congelamento (SANG et al., 2021). O SFB funciona como um tampão, tem ação antioxidante, que é dada através das ligações das moléculas, fazendo com que as membranas se estabilizem e conseqüentemente diminua a formação de gelo extracelular, a desidratação da célula e também minimiza a concentração de solutos durante o congelamento

(LEÓN-QUINTO et al., 2011).

Na composição do SFB podem ser encontradas: enzimas, hormônios, proteínas de transporte, de adesão, fatores de crescimento, citocinas, ácidos graxos, lipídios, vitaminas, carboidratos e nitrogênio de origem não proteica e albumina (BRUNNER et al., 2010). Por causa da sua constituição, ele é muito utilizado na proliferação das células como meio de cultivo após o descongelamento, pois os seus componentes estimulam o crescimento celular e ajudam na recuperação de suas funções (LEE et al., 2012).

Outro fator importante do SFB é a presença da albumina, uma macromolécula, que é um dos principais componentes do soro, tem uma importante participação no controle da pressão osmótica e nutrição, protegendo o dano celular, pois impede a formação dos cristais de gelo durante a criopreservação (SMAGUR et al., 2013).

Entretanto, o uso do soro tem alguns entraves que preocupam e trazem riscos, por causa da sua composição indefinida, variações entre lotes e pelo seu potencial de contaminação. Essas variações entre lotes podem levar a resultados inconsistentes e aumentar o tempo e o custo envolvidos na triagem de adequação do lote para cultura in vitro. E quanto a contaminação, o soro pode se tornar um contaminante biológico se tiver príons ou vírus, que podem causar reações imunes, zoonoses ou contaminação cruzada entre espécies (MANNELLO; TONTI, 2007).

Por isso é importante que sejam avaliados outros tipos de crioprotetores para substituição do SFB. Foi feita uma pesquisa com objetivo de substituir o SFB pela albumina sérica humana, na criopreservação de células-tronco de espermatogônias murinas, e concluíram que a utilização de 5% de albumina sérica humana é um potencial substituto do SFB para a criopreservação, com propriedades comparáveis (SANG et al., 2021).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é o crioprotetor mais utilizado em criopreservação de células e tecidos, geralmente é usado sozinho ou em combinação com outros crioprotetores. Ele é um solvente utilizado na indústria, composto por um grupo sulfóxido hidrofílico e dois grupos metila hidrofóbicos, e possui uma grande capacidade de absorção de umidade, consegue se misturar com os ácidos nucléicos, carboidratos, lipídeos e proteínas sem alterar de forma

irreversível a configuração das moléculas. Apresenta uma ligação covalente entre o enxofre e o oxigênio, (CASTRO et al., 2011).

O DMSO atravessa a membrana celular formando pontes de hidrogênio com as moléculas de água presente no citosol, o que leva a diminuição do ponto de congelamento da água. Por tanto, a formação de cristais de gelo dentro da célula diminui e a integridade das membranas é conservada (CETINKAYA et al., 2014). Para a maioria das células somáticas de mamíferos, sua utilização é recomendada na concentração de 10%, pois garante uma alta viabilidade na pós-descongelamento. Vários estudos que utilizaram essa concentração comprovam essa eficiência (LIU et al., 2008; BAHARI et al., 2018; PEREIRA et al., 2019; LI et al., 2009).

Mas apesar de seus benefícios como crioprotetor, o DMSO apresenta uma toxicidade que traz uma preocupação com a sua utilização. MOTTA et al. (2010) relataram que o seu uso pode desencadear náuseas nos pacientes, dor de cabeça, hipotensão, e foi visto também que promove uma alteração química nas células como a produção de radicais livres que levam a lesão celular e a sua inviabilidade. Também transporta fatores indutores de apoptose e induz a formação de poros na membrana plasmática (NOTMAN et al., 2006).

Por estes motivos é sugerido que o DMSO seja usado em combinação com outros crioprotetores extracelulares, ou com antioxidantes para minimizar esses efeitos tóxicos, pois a associação acelera o processo de desidratação celular e equilibra a citotoxicidade e os possíveis danos causados na célula (SOLOCINSKI et al., 2017).

Essa problemática tem feito alguns pesquisadores buscarem soluções para substituir o DMSO completamente, ou para diminuir seu uso. Um estudo com criopreservação de fibroblastos bovinos e de células do cumulus, testou a eficácia da Poli - L -lisina carboxilada (CPLL) como crioprotetor alternativo, para ser usado como possível substituto do DMSO. Os resultados mostraram que a CPLL pode substituir o DMSO como material crioprotetor convencional, pois obteve melhor proliferação, entre outros resultados significativos (FUJIKAWA, 2017).

Na literatura encontram-se outras pesquisas envolvendo o uso de crioprotetores para células tronco de algumas espécies de animais e também em

humanos. DUAN; LOPEZ (2016) estudaram o efeito da criopreservação em CTMs caninas do tecido adiposo subcutâneo e infrapatelar, utilizando como crioprotetor (10% DMEM/F-12, 10% DMSO e 80% FBS). Observaram que não houve diferença na expansão e na multipotencialidade das células nos dois tecidos.

Uma pesquisa feita com células do tecido adiposo de camundongos, criopreservadas com SFB e com 10% de DMSO por 30 dias, mostrou um padrão de crescimento celular ascendente em ambos os grupos (criopreservados e não criopreservados). Adicionalmente não teve diferença significativa, em relação a viabilidade celular e danos nucleares entre os grupos estudados (GINANI; SOARES; BARBOZA, 2012).

Foi avaliado o efeito da criopreservação (10% de DMSO) na morfologia, viabilidade, expressão gênica e proporção relativa de marcadores de superfície de CTMs em células derivadas de tecido adiposo, medula óssea e polpa dentária de rato, e viram que a criopreservação reduziu significativamente o número de células viáveis na medula óssea e populações de células da polpa dentária, mas não teve efeito sobre as células do tecido adiposo (DAVIES et al., 2014)

Avaliaram e otimizaram um meio de congelamento para criopreservação de células somáticas de cateto, onde um grupo foi criopreservado em 10% de DMSO com 10% de SFB, e o outro com 10% de DMSO e 50% de SFB, em ambos os grupos foi adicionado 0,2 M de sacarose. Não houve diferenças significativas quanto as variáveis avaliadas, porém a atividade proliferativa foi menor no tratamento com (10% de DMSO, 10% de SFB e 0,2 M Sacarose), mostrando que o crioprotetor com 50% de SFB foi mais eficiente para as células da espécie estudada (OLIVEIRA et al., 2020).

Ao estudarem a congelação lenta de células fetais e adultas de Lince Ibérico (*Lynx pardinus*), observaram que a solução crioprotetora composta de DMEM, SFB, 10% DMSO e 0,2 M de sacarose mostrou resultados positivos, com taxas de viabilidade acima de 80% após a criopreservação, evidenciando a eficiência da utilização de um dissacarídeo (sacarose), e da combinação de crioprotetores extra e intracelulares (LEÓN-QUINTO et al., 2014).

Em um estudo de Criopreservação de células e tecidos de cartilagem, foi investigado o efeito da vitrificação e do congelamento lento na viabilidade celular e tecidual. As células foram vitrificadas e congeladas em uma solução composta

de etilenoglicol, ficoll e sacarose. Os resultados não revelaram diferença significativa entre as taxas de viabilidade e da atividade proliferativa das células da cartilagem criopreservadas usando os dois métodos. (CETINKAYA; ARAT, 2011).

Pesquisadores avaliaram o efeito de alguns crioprotetores na viabilidade de células endoteliais da córnea humana, que foram: Cellbanker 2, Bambanker™, KM Banker, Stem-Cellbanker, Bambanker hRM, ReproCryo DMSO Free RM, Opti-MEM + 10% DMSO + 10% SFB. O tratamento com o Bambanker hRM se destacou uma vez que as células cresceram de maneira semelhante ao controle não criopreservado (OKAMURA et al., 2019).

A descongelação e a retirada dos agentes crioprotetores da célula, é um fator que deve ser levado em consideração, uma vez que o método utilizado para o aquecimento pode ter um impacto significativo na recuperação celular, e se for feito de maneira inadequada pode danificar as células (HUNT, 2019).

Então o reaquecimento deve ser feito rapidamente, para diminuir o tempo de exposição a concentrações de solutos prejudiciais à medida que o gelo derrete durante o reaquecimento, e para evitar os possíveis danos causados pela recristalização do gelo intracelular (LEWIS et al., 2016).

O método mais utilizado para a descongelação das CTMs tem sido o aquecimento rápido através do banho termostático a 37°C, pois é eficaz e de simples execução. Logo após as células são lavadas com uma solução salina para a eluição dos crioprotetores e podem ser avaliadas de acordo com a finalidade desejada (LECCHI et al., 2016).

2.4. Métodos de avaliação de células criopreservadas

Alguns métodos são utilizados para avaliar o efeito que a criopreservação causa nas células, um dos mais usuais é o teste de exclusão do corante *Trypan Blue*. Ele determina o número de células viáveis presentes em uma suspensão de células, o que proporciona a determinação da viabilidade celular. Parte-se do princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intactas que excluem o corante, ou seja, ele não consegue penetrar na célula, enquanto nas células mortas o corante consegue entrar e a mesma fica azul, identificando que

ela está morta. Neste teste, uma suspensão de células é simplesmente misturada com corante e então examinada visualmente através do microscópio para determinar se as células o absorvem ou excluem (STROBER, 2015).

O teste usado para detecção de células apoptóticas é o da anexina V e iodeto de propídio, por meio da citometria de fluxo, que possibilita avaliar a viabilidade celular. A análise da anexina possibilita a detecção das fases iniciais de apoptose antes da perda da integridade da membrana celular e permite medir a cinética da morte apoptótica em relação ao ciclo celular (VERMES et al., 1995).

Nos estágios iniciais da apoptose ocorrem mudanças na superfície celular, uma dessas alterações da membrana plasmática é a translocação da fosfatidilserina do lado interno da membrana plasmática para a camada externa, pela qual fica exposta na superfície externa da célula. A anexina V é uma proteína cálcio dependente de ligação a fosfolipídios com alta afinidade para fosfatidilserina (VERMES et al., 1995).

A anexina é usada como uma sonda sensível para exposição de fosfatidilserina sobre a membrana celular. Em células normais a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana plasmática. No início do processo de apoptose é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina V, e a sua translocação para a superfície externa da célula não é exclusiva da apoptose, mas ocorre também durante a necrose celular (VERMES et al., 1995).

A diferença entre essas duas formas de morte celular programada é que durante os estágios iniciais da apoptose a membrana celular permanece intacta, enquanto no exato momento em que ocorre a necrose a membrana celular perde sua integridade e torna-se permeável. Portanto, a medição da ligação da anexina V à superfície celular como indicativo de apoptose deve ser realizada em conjunto com um teste de exclusão de corante para estabelecer a integridade da membrana celular, onde é utilizado o iodeto de propídio, que tingem as células necrosadas, permitindo a diferenciação entre os dois processos. O teste discrimina células intactas, células apoptóticas e células necróticas. Em comparação com os testes tradicionais existentes, o ensaio da anexina V é sensível e fácil de realizar (VERMES et al., 1995).

Outra análise importante é a de ultraestrutura, ao qual denomina-se como o estudo das estruturas celulares que são muito pequenas e conseqüentemente

não podem ser observadas com o microscópio óptico, e mostra a estrutura detalhada de uma célula, tecido, ou órgão, que pode ser observada por microscopia eletrônica de transmissão, varredura e de super resolução (BRIEGER, 1963). Por tanto, o desenvolvimento de técnicas de seccionamento ultrafino possibilitou um estudo sistemático da organização ultraestrutural das células (SJÖSTRAND, 1956).

O microscópio eletrônico de transmissão é bastante utilizado para análise de materiais biológicos por que mostra com alta definição as imagens intracelulares, permitindo a observação da morfologia celular, aspectos gerais das organelas, a organização molecular de vírus ou constituintes subcelulares, oferecendo informações sobre as alterações celulares (GALLETI, 2003).

O microscópio eletrônico funciona utilizando um feixe de elétrons em alta tensão. São utilizadas lentes eletromagnéticas que focalizam o feixe de elétrons na amostra. Os átomos que constituem o feixe de elétrons passam através da amostra e produzem diferentes tipos de radiação. O seu componente mais importante é a coluna, pois o feixe de elétrons é gerado e dirigido para atravessar a amostra, onde a imagem será ampliada para a realização da análise e registro digital (KESTENBACH, BOTTA FILHO, 1989).

Os constituintes principais que controlam a passagem dos elétrons pela coluna são filamento, anodo, sistema de alinhamento, lente condensadora, correção de astigmatismo e campo escuro, lente objetiva, lente projetora e tela. Tem uma resolução que atinge valores na faixa de 0,2nm (KESTENBACH, BOTTA FILHO, 1989).

Uma das etapas cruciais e que requer muitos cuidados é a preparação das amostras que serão lidas no microscópio de transmissão, pois essa etapa determina o sucesso da técnica. Inicialmente, o material precisa ser cortado em uma série de secções ultrafinas, e para obtenção desses cortes a amostra precisa passar por alguns procedimentos que garantem a preservação de suas propriedades originais, que são fixação, desidratação, inclusão, ultramicrotomia e contrastação. Esses passos irão variar de acordo com a amostra e o objetivo do estudo (GRIMSTONE, 1980).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1. Hipótese

Modificações na metodologia de criopreservação e a utilização de diferentes soluções autoformuladas com o uso combinado de crioprotetores intra e extracelulares, podem minimizar o impacto deletério causado nas células durante a criopreservação e reduzir o custo de produção.

3.2. Objetivo geral

Os objetivos deste estudo foram testar diferentes soluções para criopreservação de CTMs caninas derivadas do tecido adiposo, avaliando os efeitos sobre a membrana plasmática, viabilidade, proliferação celular, ultraestrutura e expressão gênica, bem como no seu desenvolvimento pós-descongelamento.

3.3. Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo que mantenha a integridade celular durante a criopreservação e pós-descongelamento com custos acessíveis;
- Comparar os resultados obtidos das diferentes combinações de crioprotetores na criopreservação;
- Estabelecer um protocolo de transporte.

4. REFERÊNCIAS*

ALMEIDA, J. R.; PAZ, C. E. D. O.; OLIVEIRA, M. R. Cinoterapia: a importância do vínculo entre cães e humanos, uma revisão sistemática. **Psicologia.pt**, Porto, p. 1-30, 2020.

* Referências organizadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023 informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 74p.

AJAMANI, K.; LI, Y.-S.; HSIEH, D.-K.; LIN, S.-Z.; HARN, H.-J.; CHIOU, T.-W. Genetic and epigenetic instability of stem cells. **Cell Transplantation**, Thousand Oaks, v. 23, n. 4-5, p. 417-433, 2014.

ARMSTRONG, L.; LAKO, M.; BUCKLEY, N.; LAPPIN, T. R. J.; MURPHY, M. J.; NOLTA, J. A.; PITTENGER, M.; STOJKOVIC, M. Editorial: Our 10 top developments in stem cell biology over the last 30 years. **Stem Cells**, Oxford v. 30, n. 1, p. 2-9, 2012.

ARZI, B.; MILLS-KO, E.; VERSTRAETE, F. J.; KOL, A.; WALKER, N. J.; BADGLEY, M. R.; FAZEL, N.; MURPHY, W. J.; VAPNIARSKY, N.; BORJESSON, D. L. Therapeutic efficacy of fresh, autologous mesenchymal stem cells for severe refractory gingivostomatitis in cats. **Stem Cells Translational Medicine**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 75-86, 2016.

BAHARI, L.; BEIN, A.; YASHUNSKY, V.; BRASLAVSKY, I. Directional freezing for the cryopreservation of adherent mammalian cells on a substrate. **PloS One**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. e0192265, 2018.

BAJADA, S.; MAZAKOVA, I.; RICHARDSON, J. B.; ASHAMMAKHI, N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Chichester, v. 2, n. 4, p. 169-183, 2008.

BARNES, D.; SATO, G. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 102, n. 2, p. 255-270, 1980.

BENSON, C. M. K.; BENSON, J. D.; CRITSER, J. K. An improved cryopreservation method for a mouse embryonic stem cell line. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 120-130, 2008.

BOMHARD, A. N. R.; ELSASSER, A.; RITSCHI, L. M.; SCHAWARZ, S.; ROTTER, N. Cryopreservation of endothelial cells in various cryoprotective

agents and media – vitrification versus slow freezing methods. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. 1-15, 2016.

BONOMI, A.; GHEZZI, E.; PASCUCCI, L.; ARALLA, M.; CESERANI, V.; PETTINARI, L.; PESSINA, A. Effect of canine mesenchymal stromal cells loaded with paclitaxel on growth of canine glioma and human glioblastoma cell lines. **The Veterinary Journal**, London, v. 223, p. 41-47, 2017.

BRIEGER, E. M. Chapter 1 - Ultrastructure of the cell. *In*: BRIEGER, E. M. (ed.). **Structure and ultrastructure of microorganisms**. New York: Academic Press, p. 1-7, 1963.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cell: cell-based reconstructive therapy in orthopaedics. **Tissue Engineering**, New York, v. 11, n. 7-8, p. 1198-1211, 2005.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: time to change the name! **Stem Cells Translational Medicine**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 1445-1451, 2017.

CASTRO, S.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; ROCHA FAUSTINO, L.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e óocitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.

CETINKAYA, G.; ARAT, S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 292-297, 2011.

CETINKAYA, G.; HATIPOGLU, I.; ARAT, S. The value of frozen cartilage tissues without cryoprotection for genetic conservation. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 65-70, 2014.

DAVIES, O. G.; SMITH, A. J.; COOPER, P. R.; SHELTON, R. M.; SCHEVEN, B. A. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 342-347, 2014.

DUAN, W.; LOPEZ, M. J. Effects of cryopreservation on canine multipotent stromal cells from subcutaneous and infrapatellar adipose tissue. **Stem Cell Reviews and Reports**, New York, v. 12, n. 12, p. 257-268, 2016.

ELLIOTT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 76, p. 74-91, 2017.

FUJIKAWA, T.; TAKAOKI, A.; GEN, Y.; HYON, S.-H.; KUBOTA, C. Cryopreservation of bovine somatic cells using antifreeze polyamino-acid (carboxylated poly-L-lysine). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 76, p. 140-145, 2017.

GALLETI, S. R. Introdução a microscopia eletrônica. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 33-35, 2003.

GINANI, F.; SOARES, D. M.; BARBOZA, C. A. G. Influência de um protocolo de criopreservação no rendimento in vitro de células-tronco derivadas do tecido adiposo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 359-363, 2012.

GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V. J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, Baltimore, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, 2008.

GOMZIKOVA, M. O.; JAMES, V.; RIZVANOV, A. A. Therapeutic application of mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles for immunomodulation.

Frontiers in Immunology, Lausanne, v. 10, p. 2663, 2019.

GRIMSTONE, A. V. **O microscópio eletrônico em biologia**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1980.

HOTCHKISS, R. S.; STRASSER, A.; MCDUNN, J. E.; SWANSON, P. E. Cell death. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 361, n. 16, p. 1570-1583, 2009.

HUBEL, A. Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. **Transfusion Medicine Reviews**, Orlando, v. 11, n. 3, p. 224-233, 1997.

HUNT, C J. Technical considerations in the freezing, low-temperature storage and thawing of stem cells for cellular therapies. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, Basel, v. 46, n. 3, p. 134-150, 2019.

HUNT, C. J. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, Basel, v. 38, n. 2, p. 107-123, 2011.

JANZ, F. L.; DEBES, A. A.; CAVAGLIERI, R. C.; DUARTE, S. A.; ROMÃO, C. M.; MORÓN, A. F.; ZUGAIB, M.; BYDLOWSKI, S. P. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants fo human amniotic fluid stem cells cryopreservation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v. 2012, p. 1-10, 2012.

KESTENBACH, H.; BOTTA FILHO, W. J. **Microscopia eletrônica de transmissão e varredura**. 5. ed. São Paulo: Associação Brasileira de Metais, 1989.

LEE, S. G.; KOH, H. Y.; LEE, J. H.; KANG, S. H.; KIM, H. J. Cryopreservative effects of the recombinant ice-binding protein from the arctic yeast

Leucosporidium sp. on red blood cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 167, n. 4, p. 824-834, 2012.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M. A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 227-233, 2014.

LECCHI, L.; GIOVANELLI, S.; GAGLIARDI, B.; PEZZALI, I.; RATTI, I.; MARCONI, M. An update on methods for cryopreservation and thawing of hemopoietic stem cells. **Transfusion and Apheresis Science**, Basel, v. 54, n. 3, p. 324-336, 2016.

LEWIS, J. K.; BISCHOF, J. C.; BRASLAVSKY, I.; BROCKBANK, K. G.; FAHY, G. M.; FULLER, B. J.; GIWA, S. The Grand Challenges of Organ Banking: Proceedings from the first global summit on complex tissue cryopreservation. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 169-182, 2016.

LI, X. C.; YUE, H.; LI, C. Y.; HE, X. H.; ZHAO, Q. J.; MA, Y. H.; MA, J. Z. Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from Jining Black Grey goat for genetic conservation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 87, p. 17-26, 2009.

LIU, G.; ZHOU, H.; LI, Y.; LI, G.; CUI, L.; LIU, W.; CAO, Y. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 18-24, 2008.

LLOYD, A. C. Limits to lifespan. **Nature Cell Biology**, London, v. 4, n. 2, p. E25-E27, 2002.

MANNELLO, F.; TONTI, G. A. Concise review: no breakthroughs for human

mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! **Stem Cells**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 1603-1609, 2007.

MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZZO, L.; MOLLO, A.; M. SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F.; DECAMINADA, M.; PATRUNO, M. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Research in Veterinary Science**, London, v. 91, n. 1, p. 18-24, 2011.

MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; SELBACH, I.; SILVA, A. S.; BRAGA, L. M. G. M.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N. B. Acupoint injection of autologous stromal vascular fraction and allogeneic adipose-derived stem cells to treat hip dysplasia in dogs. **Stem Cells International**, New York, v. 2014, p. 391274, 2014.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos e terapia gênica**. São Paulo: Rocca, 503 p, 2007.

MORO, L. N.; HIRIART, M. I.; BUEMO, C.; JARAZO, J.; SESTELO, A.; VERAGUAS D.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, L.; SALAMONE, D. F. Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves in vitro development but not pluripotent gene expression. **Reproduction**, Bristol, v. 150, n. 1, p. 1-10, 2015.

MORONI, L.; FORNASARI, P. M. Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 228, n. 4, p. 680-687, 2013.

MOTTA, J. P. R.; GOMES, B. E.; BOUZAS, L. F.; PARAGUASSÚ-BRAGA, F. H.; PORTO, L. C. Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 301-307, 2010.

MOUNT, N. M.; WARD, S. J.; KEFALAS, P.; HYLLNER, J. Cell-based therapy technology classifications and translational challenges. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**. Series B, Biological sciences, London, v. 370, n. 1680, p. 20150017, 2015.

OKUMURA, N.; KAGAMI, T.; KADOYA, S.; SATO, M.; KOIZUMI, N. Feasibility of a cryopreservation of cultured human corneal endothelial cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 14, n. 6, p. e0218431, 2019.

OLIVEIRA, L. G. P.; BORGES, A. A.; NASCIMENTO, M. B.; AQUINO, L. V. C.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F. "Cryopreservation of Collared Peccary (*Pecari Tajacu Linnaeus*, 1758) somatic cells is improved by sucrose and high concentrations of fetal bovine serum". **Cryo Letters**, London, v. 41, n. 5, p. 272-280, 2020.

PAPACCIO, G.; GRAZIANO, A.; D'AQUINO, R.; GRAZIANO, M. F.; PIROZZI, G.; MENDITTI, D.; ROSA, A.; CARINCI, F.; LAINO, G. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 208, n. 2, p. 319-325, 2006.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 1257, p. 3-19, 2015.

PENHA, E. M.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; MENDONÇA, M. V. P.;

GRAVELY, F. A.; PINHEIRO, C. M. B.; PINHEIRO, T. M. B.; BARROUIN-MELO, S. M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P. Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. **Stem Cells International**, New York, v. 2014, p. 437521, 2014.

PEREIRA, B. C.; ORTIZ, I.; DORADO, J.; CONSUEGRA, C.; DIAZ-JIMENEZ, M.; DEMYDA-PEYRAS, S.; GOSALVEZ, J.; HIDALGO, M. Evaluation of DNA damage of mare granulosa cells before and after cryopreservation using a chromatin dispersion test. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 72, p. 28-30, 2019.

PET BRASIL, INSTITUTO. Setor pet fecha 2021 com alta de 27% no faturamento, aponta Instituto Pet Brasil. **Cães&Gatos VET FOOD**, 2022. Disponível em: <<https://caesegatos.com.br/setor-pet-fecha-2021-com-alta-de-27-no-faturamento-aponta-instituto-pet-brasil/>>. Acesso em: 03, Abril de 2022.

RENZI, S.; RICCÒ, S.; DOTTI, S.; SESSO, L.; GROLLI, S.; CORNALI, M.; CARLIN, S. M.; PATRUNO, M.; CINOTTI, S.; FERRARI, M. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. **Research in Veterinary Science**, London, v. 95, n. 1, p. 272-277, 2013.

RODRIGUES, J. P.; PARAGUASSÚ-BRAGA, F. H.; CARVALHO, L.; ABDELHAY, E.; BOUZAS, L. F.; PORTO, L. C. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 144-151, 2008.

SHANG, Z.; JIANG, Y.; GUAN, X.; WANG, A.; MA, B. Therapeutic effects of stem cells from different source on renal ischemia-reperfusion injury: a systematic review and network meta-analysis of animal studies. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 12, p. 2312, 2021.

SILVA, A. A. R.; RODRIGUES, C. G.; SILVA, M. B. Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular. **Revista da Biologia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 13-18, 2017.

SJÖSTRAND, F. S. The ultrastructure of cells as revealed by the electron microscope. **International Review of Cytology**, New York, v. 5, p. 455-533, 1956.

SMAGUR, A.; MITRUS, I.; GIEBEL, S.; CIOMBER, A.; GLIWINSKA, J.; PANCZYNIAK, K.; SADUS-WOJCIECHOWSKA, M.; HOLOWIECKI, J. Comparison of different cryoprotective solution - albumin vs autologous plasma - its effect on cell recovery and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood**, New York, v. 122, n. 21, p. 4522, 2013.

SOLOCINSKI, J.; OSGOOD, Q.; WANG, M.; CONNOLLY, A.; MENZE, M. A.; CHAKRABORTY, N. Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 75, p. 134-143, 2017.

STERODIMAS, A.; FARIA, J.; NICARETTA, B.; PITANGUY, I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, Amsterdam, v. 63, n. 11, p. 1886-1892, 2010.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, New York, v. 111, p. A.3.B.1-A.3.B.3, 2015.

TAGHAVI, S.; SHARP, T. E.; DURAN, J. M.; MAKAREWICH, C. A.; BERRETTA, R. M.; STAROSTA, T.; KUBO, H.; BARBE, M.; HOUSER, S. R. Autologous c-

Kit+ mesenchymal stem cell injections provide superior therapeutic benefit as compared to c-Kit+ cardiac-derived stem cells in a feline model of isoproterenol-induced cardiomyopathy. **Clinical and Translational Science**, Malden, v. 8, n. 5, p. 425-431, 2015.

TRZIL, J. E.; MASSEAU, I.; WEBB, T. L.; CHANG, C.-H.; DODAM, J. R.; LIU, H.; QUIMBY, J. M.; DOW, S. W.; REINERO, C. R. Intravenous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for the treatment of feline asthma: a pilot study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 18, n. 12, p. 981-990, 2016.

VALERI, C. R.; RAGNO, G. Cryopreservation of human blood products. **Transfusion and Apheresis Science**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 271-287, 2005.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELLINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VILAR, J. M.; BATISTA, M.; MORALES, M.; SANTANA, A.; CUERVO, B.; RUBIO, M.; CUGAT, R.; SOPENA, J.; CARRILLO, J. M. Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. **BMC Veterinary Research**, London, v. 10, n. 143, p. 1-7, 2014.

WOODS, E. J.; PERRY, B. C.; HOCKEMA, J. J.; LARSON, L.; ZHOU, D.; GOEBEL W. S. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 150-157, 2009.

ZHOU, H.; JIN, Z.; LIU, J.; YU, S.; CUI, Q.; YI, D. Mesenchymal stem cells might be used to induce tolerance in heart transplantation. **Medical Hypotheses**, New York, v. 70, n. 4, p. 785-787, 2008.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Efeitos das diferentes soluções de congelação sobre a criopreservação de células-tronco mesenquimais caninas²

Effects of different freezing solutions on canine mesenchymal stem cell cryopreservation

Santos, B.A.^{1, *}; Dellaqua, T.T.², Bussiman, F.O.³, Santos, W.B.³, Landim, F.C.¹.

¹Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

² Departamento de Fisiologia - IBB - UNESP - Botucatu, 18618-689 SP, Brasil.

³Departamento de genética e Melhoramento animal - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA – USP – Pirassununga, 13635-900 SP, Brasil.

Corresponding author: Bruna Aparecida dos Santos – Avenida Professor Raphael Laurindo, 1344, apto 03. CEP 18610-302 - Botucatu, SP, Brasil. Tel: +5514998358257. E-mail: bruna.a.santos@unesp.br

Highlights

- Treatment with the cryoprotectant Bambanker™ was superior to the others;
- The other cryoprotective solutions studied were also efficient in the cryopreservation of canine MSCs;
- All treatments allowed the resumption of normal cell functions after thawing and reculture.
- Self-formulated cryoprotectant solutions are more economically viable than the commercial brand used.

² Mnsucrito elaborado de acordo com as *Guide for Authors* da Livestock Science.

Abstract

In order to use canine mesenchymal stem cells (MSCs) in therapies, it is essential that cryobanks of cell storage are formed, therefore, the methodology of cryopreservation of MSCs needs studies, since the effect of freezing and cryoprotective agents on the cells obtained from canine adipose tissue is still poorly understood. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of different types of solutions in the cryopreservation of MSCs, on the structure, viability, cell proliferation, ultrastructure and gene expression, as well as on their post-thawing development. For this, stem cells from 12 female dog were isolated. The samples were divided into 5 treatments: not cryopreserved (control) = NCRI0; 90% FBS (Fetal Bovine Serum) with 10% DMSO = FBS; High glucose DMEM/F12 culture medium plus 20% FBS and 10% DMSO = DMEM/F12; DMEM/F12 high glucose plus 5%PVA, 5% ITS, 5% BSA and 10% DMSO = PVA/ITS/BSA and BambankerTM = BAM. In all, Dimethylsulfoxide (DMSO) was used as the main cryoprotective agent. Cells were evaluated before cryopreservation, immediate post-thawing and after reculture. A cost analysis of the different solutions was carried out. Cell viability and apoptosis were evaluated by the Trypan blue dye and annexin V exclusion test; cell proliferation, by the growth curve; ultrastructure in transmission electron microscope, gene expression by RT-qPCR and cost analysis through market research. All data were submitted to statistical analysis using the SAS software version 9.4. The results showed that the MSCs cryopreserved with the commercial medium was superior to the others in terms of cell number and cell proliferation, but was similar to the NCRI0 and PVA/ITS/BSA groups in terms of cell viability. Although no significant morphological changes were observed between the cryopreservation treatments, the cellular ultrastructure varied according to the components of the medium, in which the morphology closest to that found in fresh cells was observed in the PVA/ITS/BSA and BAM groups. The gene expression showed that the cells showed differences regarding the treatments for the CD44, TGFB1, CXCL12 and IDO transcripts. In this study, it was observed that although the treatment with the commercial brand was superior to other cryoprotectants, the other combinations of cryoprotective substances tested were efficient in the cryopreservation of canine MSCs, being alternatives that can be used. All

treatments allowed the resumption of normal cell functions after thawing and reculture. And self-formulated solutions are more economically viable than branded. These results are important for the establishment of cryopreservation protocols for MSCs in this species, as they increase the possibilities of choosing the cryoprotectant solution and also allow the use of more affordable solutions without contaminating components such as FBS.

Keywords: cryobanks; cryoprotectants; viability; adipose tissue

1. Introdução

Frente aos resultados que conferem ao paciente, a terapia celular tem sido uma alternativa cada vez mais indicada por médicos veterinários, para o tratamento de algumas doenças caninas. As CTMs são a matriz mais abundante de possibilidades para estratégias terapêuticas de várias doenças degenerativas (ARMSTRONG et al., 2012). A formação de criobancos é essencial para produzir as células em larga escala para utilização na terapia celular, mas a técnica de criopreservação ainda possui alguns entraves, uma vez que o efeito causado sobre as células derivadas do tecido adiposo canino ainda é pouco conhecido.

As técnicas de criopreservação celular visam a manutenção das células vivas por um longo tempo sem a necessidade de múltiplas passagens, evitam contaminações, e mantém suas funções biológicas inativadas de forma controlada, evitando o comprometimento de suas funções após a descongelação (GINANI; SOARES; BARBOZA, 2012). Também aumenta a vida útil do produto; facilita o transporte das células, desde que sua refrigeração seja mantida; e permite vários tratamentos utilizando o mesmo lote de células, com flexibilidade no tempo de tratamento para o paciente (HUNT, 2019).

O método mais utilizado para criopreservar células é a refrigeração lenta, na qual ocorre uma queda gradativa da temperatura, levando a formação de gelo extracelular, promovendo uma desidratação progressiva da célula com aumento da concentração de soluto intracelular até um estado passível de solidificação. O grau de dano imposto à célula durante a congelação vai depender diretamente do tipo de crioprotetor utilizado, e da curva de resfriamento empregada durante o procedimento (BENSON et al., 2008). Nestas condições, os índices de

sobrevivência de células mamíferas só são aceitáveis na presença de substâncias crioprotetoras (HUBEL, 1997).

Existem dois tipos de crioprotetores, os intracelulares, que tem a função de penetrar na célula, e se ligar com a água, fazendo com que ocorra uma redução do tamanho e formação dos cristais de gelo, e conseqüentemente, previna a ruptura da membrana celular (MORO et al., 2015). E os extracelulares, que não penetram na membrana celular, mas que tem a finalidade de aumentar a osmolaridade do meio externo das células, reduzindo a formação dos cristais de gelo (LEÓN-QUINTO et al., 2014).

Os crioprotetores intracelulares mais utilizados para criopreservação de células-tronco são o dimetilsulfóxido (DMSO) (LEÓN-QUINTO et al., 2009) e o etilenoglicol (EG) (OLIVEIRA et al., 2018); e quanto aos extracelulares destacam-se o SFB e a sacarose (LEÓN-QUINTO et al., 2011). Além disso, existem meios comerciais, especialmente desenvolvidos para a criopreservação de células-tronco, que tem como vantagem a não utilização do SFB, mas apresentam a desvantagem de ter alto custo, sendo sua utilização inviável na Medicina Veterinária.

A utilização do DMSO e do SFB é comum em laboratórios de cultivo celular, mas o DMSO é tóxico (MOTTA et al., 2010) e o SFB pode levar a contaminação (MANNELLO; TONTI, 2007). Tendo em vista essa problemática, é importante que sejam feitas pesquisas com o intuito de substituir esses crioprotetores, ou de utilizá-los em concentrações reduzidas, trazendo outras alternativas de soluções crioprotetoras que mantenham a integridade celular e que sejam viáveis economicamente.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes soluções para criopreservação das células mesenquimais caninas, sobre a membrana plasmática, viabilidade, proliferação celular, ultraestrutura e expressão gênica, bem como no seu desenvolvimento pós-descongelamento.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes, meios e protocolos

Os reagentes e meios utilizados neste estudo foram do mais alto grau de pureza e adquiridos das empresas Thermo Fisher Scientific, Gibco, e da Sigma-Aldrich. Foram usados os protocolos do Laboratório de Terapia Celular e Reprodução Avançada (LANÇA), que são amplamente utilizados e estabelecidos.

2.2. Aspectos éticos

Os aspectos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Experimento Animal (CONCEA) foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (protocolo nº 0124/2021).

2.3. Coleta, isolamento e cultivo das CTMs caninas

O tecido adiposo foi coletado de 12 cadelas sem padrão racial definido e das raças Pug, Poodle, Border Collie, Pitbull e Lhasa, com histórico comprovado de saúde, idade até 2 anos, durante campanhas de castração. A coleta do tecido adiposo foi realizada pelo Médico Veterinário responsável pela castração, após a autorização dos tutores, mediante a assinatura de um termo de consentimento. Todos os animais foram testados para adenovírus canino tipo I, *Babesia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Leptospira spp.*, *Toxoplasma Gondii*, cinomose e leishmaniose por PCR.

Para o isolamento das CTMs os fragmentos de tecido adiposo foram lavados com PBS, contendo 1% de penicilina e 1,2% de anfotericina. Após a lavagem, o tecido foi fracionado com auxílio de uma pinça e bisturi, e colocado em solução a 0,02% de colagenase, à 37,5°C em banho termostático por aproximadamente 30 minutos. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500 g por 10 minutos, e o precipitado ressuspendido em PBS. Foram feitas outras duas centrifugações, e o precipitado celular foi ressuspendido em 5 mL de meio de cultivo (DMEM / F12 - alta glicose) com 20% de SFB, suplementado com antibióticos (1% de solução de penicilina e estreptomicina), antimicótico (1,2%

de de solução de anfotericina) e 0,0044% de amicacina. A seguir, as células foram plaqueadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² (T25) e cultivadas em estufa com atmosfera com 5% de CO₂ em ar e a 37,5°C.

O meio do cultivo primário foi trocado após 4 dias e, posteriormente, a cada 72 horas. O meio base utilizado em todas as fases do cultivo foi o mesmo descrito anteriormente. Quando as células do cultivo primário atingiram confluência de 80% foram tripsinizadas (tripsina-EDTA 0,05%) e recultivadas até a terceira passagem.

2.4. Criopreservação das amostras e delineamento experimental

Ao final da terceira passagem as células foram submetidas aos protocolos de criopreservação, de acordo com os grupos experimentais em um delineamento inteiramente casualizado. Para a criopreservação o crioprotetor intracelular DMSO foi utilizado em todos os grupos, variando-se a solução diluidora. Foram utilizados 5 grupos experimentais: não criopreservado (controle) = NCRIO; 90% SFB (Soro fetal Bovino) com 10% DMSO = SFB; Meio de cultivo DMEM/F12 alta glicose acrescido com 20% SFB e 10% DMSO = DMEM/F12; DMEM/F12 alta glicose, acrescido com 5%PVA, 5% de ITS, 5% de BSA e 10% DMSO = PVA/ITS/BSA e BambankerTM = BAM.

As células foram criopreservadas utilizando o protocolo de KERKIS et al. (2006). Após a tripsinização, as células foram contadas em câmara de Neubauer, coradas com *Trypan blue*, para estimar a concentração e a viabilidade celular. A seguir, foram separadas em alíquotas com uma concentração de 2x10⁶ células/criotubo, contendo 2,0 mL do meio crioprotetor, de acordo com cada tratamento. O experimento e todas as análises subsequentes foram feitas em triplicata biológica, as células das 12 doadoras foram reduzidas em 3 pools, cada pool continha células de 4 doadoras, ficando com 3 doadoras finais (Figura 1). As amostras foram resfriadas gradualmente, aproximadamente 1°C por minuto até atingir -80°C, utilizando o Mrs Frosty, onde permaneceram por 24h a -80°C. Após 24h, as células foram transferidas para o botijão criogênico a -196°C.

As amostras foram descongeladas 30 dias após a criopreservação pelo protocolo descrito por CHAYTOR et al. (2012). Após a reconstituição, as

amostras foram novamente analisadas. Uma parte contendo 2×10^6 /células foi plaqueada para o recultivo, em meio já mencionado, e nas mesmas condições.

Os testes de viabilidade com *Trypan blue* e com Anexina V, proliferação celular, RT- qPCR e análise da ultraestrutura foram realizados nas células não criopreservadas (frescas), após descongelação e nas células recultivadas (Figura 2).

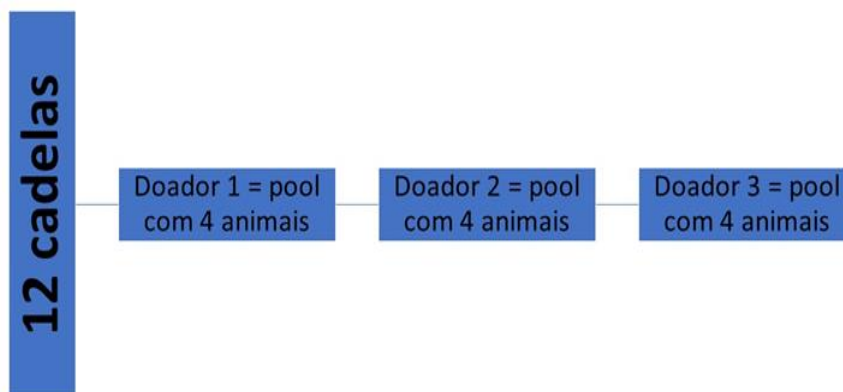


Figura 1. Esquema das doadoras utilizadas no estudo.

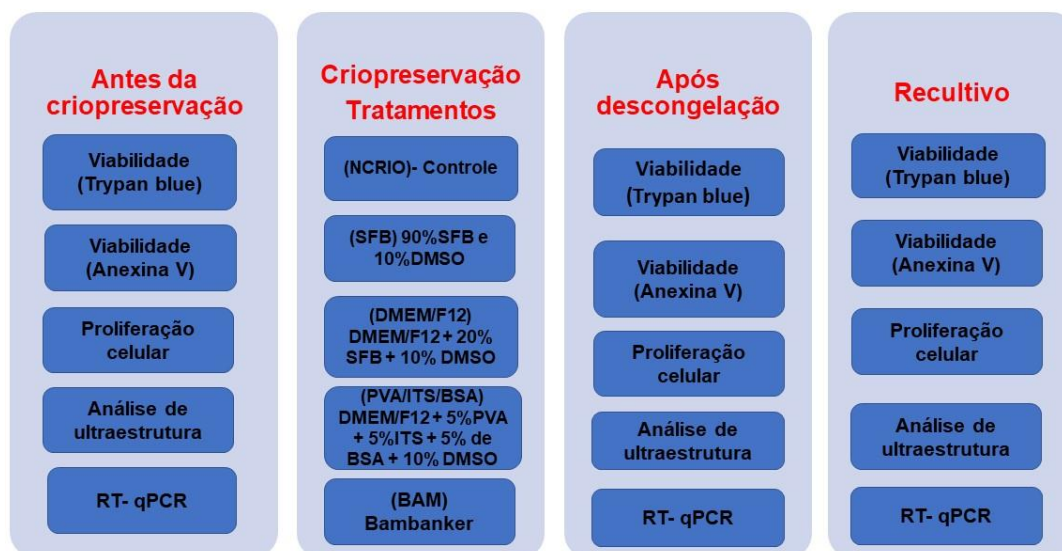


Figura 2. Demonstração das análises e desenho experimental.

2.5. Caracterização das CTMs

O estudo seguiu as normas da Sociedade Internacional de Terapia Celular, que preconiza características como células plástico-aderentes quando mantidas em condições básicas de cultivo, morfologia fibroblastóide (Figura 3), positiva para os marcadores de membrana CD44 e CD90, negativa para o marcador de membrana CD34 e baixa marcação (< 5%) para MHCII (Tabela 1). Foi avaliada também a capacidade de se diferenciar em osteoblastos e adipócitos, quando expostas *in vitro* aos indutores de diferenciação específicos.

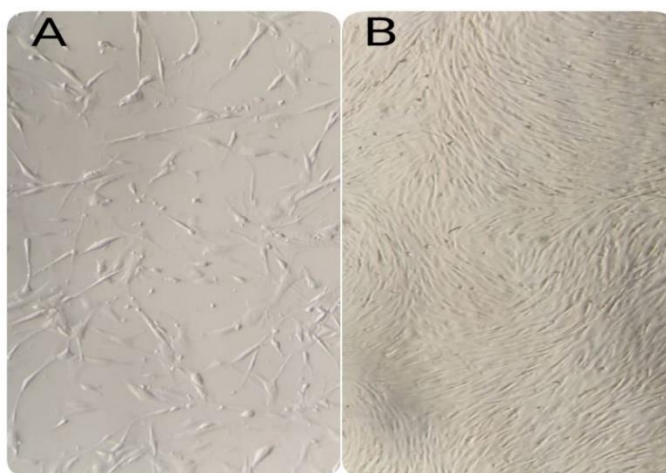


Figura 3. Células-tronco caninas, aderentes ao plástico e com morfologia fibroblastóide. A – Garrafa no início do cultivo celular e B – Garrafa com confluência de 80%.

Tabela 1. Imunofenotipagem para os marcadores de membrana de CTMs caninas

Doadores	CD90	CD44	MHCII	CD34
1	91,40%	73,60%	2,36%	7,73%
2	89,10%	74,23%	4,30%	3,86%
3	87,36%	79,86%	4,70%	2,33%
Média Simples	89,29%	75,90%	3,79%	4,64%

2.6. Teste de viabilidade celular com Trypan blue

A viabilidade foi estimada pelo teste de exclusão com o Trypan blue, que avalia a integridade da membrana. Uma alíquota da suspensão celular foi diluída (1 : 2) com 1 μ L de *Trypan blue*. Em seguida, a preparação foi colocada

na câmara de Neubauer, e as células foram contadas. A viabilidade foi expressa pela porcentagem de células vivas (não coradas) em relação ao número de células mortas (coradas), pela seguinte fórmula:

$$\frac{\bar{X}_{\text{células vivas}}}{\bar{X}_{\text{células vivas}} + \bar{X}_{\text{células mortas}}} \times 100 = \% \text{ de células}$$

2.7. Teste de viabilidade com anexina V

A marcação com anexina V e iodeto de propídio (eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) foram utilizados para avaliar a apoptose, necrose e a viabilidade celular. Para tanto, após a remoção do meio de cultivo ou de criopreservação, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em uma concentração de 1×10^6 células/mL com PBS, e em seguida foi adicionado anexina V e o iodeto de propídio. A suspensão de células foi incubada por 15 minutos a 37°C e, a seguir foi feita a leitura no citômetro de fluxo (FACS Calibur da BD®).

Os resultados obtidos expressaram a porcentagem da população de células vivas em necrose e em apoptose. As células vivas não apresentam marcação, as células em apoptose apresentam-se com marcação positiva para anexina V e negativa para iodeto de propídio (apoptose inicial), ou positiva para anexina V e positiva para iodeto de propídio (apoptose tardia). Células em necrose apresentam marcação negativa para anexina V e positiva para iodeto de propídio.

2.8. Protocolo de transporte

Para estabelecer o protocolo de transporte, foi feita a viabilidade celular com 4,12,24,48 e 96h após a descongelação das CTMs caninas, que ficaram mantidas à 4°C. A viabilidade foi feita com o corante de exclusão *Trypan blue*.

2.9. Teste de proliferação celular

Foi plaqueada uma concentração de 1×10^4 células/poço de cada tratamento em uma placa de 6 poços. As células foram cultivadas por 144 horas, e a cada 48 horas de cultivo foi conduzida a tripsinização (remoção das

células da placa de cultivo), para quantificar as células e estimar a viabilidade celular pelo teste de exclusão *Trypan blue*.

2.10. Análise de ultraestrutura

A ultraestrutura foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão. As CTMs foram fixadas em glutaraldeído (pH = 7,4) a 4°C até o momento do processamento das amostras. Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante e colhidos em grades de cobre, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Koch Instrumentos Científicos Ltda, Brasil) e examinados em microscópio eletrônico de transmissão (Philips CM100). Na avaliação ultraestrutural foram observadas possíveis modificações na membrana plasmática, organelas e núcleo.

2.11. PCR quantitativa em tempo real (RT- qPCR)

A RT-qPCR foi realizada utilizando o sistema Sybr Green™ PCR Master Mix (Applied Biosystems™) no equipamento StepOnePlus™ System (Applied Biosystems™). O RNA foi extraído com TRIzol (Life Technologies Corporation®, Van Allen Way, Carlsbad, CA, USA) e as concentrações foram mensuradas no (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers Thermo Scientific™).

Em seguida, o RNA extraído foi tratado com DNase (Qiagen®) conforme protocolo do fabricante. Posteriormente, a transcrição do mRNA em cDNA foi realizada com o Kit de transcrição reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) e as etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante.

O volume final do mix para PCR foi de 20 µL em duplicata e as condições para os ciclos foram 95°C por 10 minutos (1 ciclo), desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguida de anelamento a 60°C por 1 minuto (40 ciclos). Os dados brutos dos níveis de fluorescências (dados sem correção da linha de base), obtidos ao final da PCR, foram submetidos ao programa LinRegPCR (REMAKERS et al., 2003) para correção da linha de base e obtenção dos valores do ciclo de *threshold* (Ct).

A abundância relativa dos genes alvo foi calculada pelo método $\Delta\Delta C_t$, e a média geométrica da expressão do gene endógeno GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizada como referência para a normalização dos dados, como descrito por PFAFFL (2001). Na Tabela 2 estão apresentados os genes alvos utilizados para análise de expressão gênica nas CTMs.

Tabela 2. Sequência de *primers* dos genes que foram utilizados na RT-Qpcr

Sigla / Nome do gene / Função	GenBank	Sequência (5'-3')
ELOVL6 – <i>ELOVL fatty acid elongase 6</i> (metabolismo lipídico/ estresse oxidativo)	PMRNA6440	F: CAGCAAATTCTGGGCTTATGC
		R: CCTAGTTCGGGTGCTTTGCTTA
SOD1 - <i>Superóxido Dismutase 1</i> (antioxidante/estresse oxidativo)	AF346417	F: TGGTGGTCCACGAGAAACGAGATG
		R: CAATGACACCACAAGCCAAACGACT
PRDX6 – <i>Peroxiredoxin 6</i> (codifica proteínas antioxidantes/estresse oxidativo)	XM_537190.4	F: TGGCACCAGAATTTGCCAAG
		R: TTGCTCCAGGCAAGATGGTC
BAX - <i>BCL2 Associated X, apoptosis regulator</i> (apoptose)	NM_001002949.1	F: GGTGCCCCAGGATGCA
		R: CCGATGCGCTTGAGACATT
TP53 - <i>Tumor Protein P53</i> (apoptose)	NM_00138921	F: ATGGGAGGCATGAACCGGCG
		R: CGGGACAGGCACAAACGCGT
FAS - <i>Cell surface death receptor</i> (apoptose)	GCA_014441545.1	F: TGGAGGTGCTGGCTGGTGATG
		R: TGGCGGTTCGGTGGCTGTG
BCL2L1 - <i>BCL2 like 1</i> (apoptose)	NM_001003072.1	F: ACTGTGCGTGGAGAGCGTAG
		R: TCAGGTAAGTGCCATCCAA
IDO - <i>Indoleamine 2,3- dioxygenase</i> (imunomodulação)	XM_03868979.1	F: GCTGGGTCTGCCTCCTATTC
		R: GCAGTCTCCACCAGAAACC
CXCL12 - <i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i> (imunomodulação)	GCA_014441545.1	F: TCTTCGAGAGCCACATTGC
		R: TTCAGTCTTGCCACGATCTG
HGF - <i>Hepatocyte growth fator</i> (angiogênese)	NM_001002964.1	F: GGCTACTGCTCCCAAATTCCA
		R: CCCACATTGAACATGTTAGTCCAGA
VEGF - <i>Vascular endothelial growth fator</i> (angiogênese)	AF133250.1	F: TTGCTGCTCTACCTCCACCAT
		R: TGTGCTCTCCTCCTGCCATAG
VCAN – <i>Versican</i> (angiogênese, proliferação, migração e adesão)	XM_0034344.2	F: TCTCACAAGCATCCTGTCTCAC
		R: CCATCGGTCCAACGGAAGTC
TGFB1 – <i>Transforming growth factor beta 1</i> (fator de crescimento/proliferação celular)	NM_001003309.1	F: CCCTGGACACCAACTACTGCTTC
		R: GGATCCACTTCCAGCCCAGA

CD44 - <i>CD44</i> molecule (fator de crescimento/proliferação/adesão celular)	NM_00119702	F: GGTCCCATACCACTCATGGA
		R: GCACCACCTTCTTGACTTCC
PTGS2 - <i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i> (inflamação e mitogênese)	NM_001003354.1	F: CGGCGAAAACACTGCTCAACA
		R: TTGGAGTGGGTTTCAGGTATAATTT
HIF1A - <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i> (regulador da resposta a hipóxia)	NM_001287163.1	F: TTACGTTCCCTTCGATCAGTTGTA
		R: GAGGAGGTTCTTGCATTGGAGTC
VIM – <i>Vimentin</i> (ligação, migração e sinalização celular, marcador CTMs)	GCA_014441545.1	F:TGGCAAAGTGGATATTGTCCG
		R:AGATGGACTTCCCGTTGATG
GAPDH – Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase (gene de referência /endógeno)	XM_003435649.2	F: GATGGGCGTGAACCATGAG
		R: TCATGAGGCCCTCCACGAT

2.12. Análise de custo das soluções crioprotetoras

A análise de custo foi feita para as soluções crioprotetoras, pela pesquisa de mercado com os principais fornecedores, na qual foi obtido os valores atualizados. O custo foi calculado por mL.

2.13. Análise estatística

A análise estatística foi conduzida pelo programa estatístico SAS versão 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Os dados foram analisados sob um delineamento inteiramente casualizado. As pressuposições quanto à normalidade e homocedasticidade dos resíduos foram checadas para as variáveis pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, implementados nos procedimentos UNIVARIATE (SAS INSTITUTE INC., 2016) e GLM (SAS INSTITUTE INC., 2015a). O fator tempo foi considerado como classificatório e como contínuo na dependência do modelo estatístico utilizado e em todos os casos considerou-se o doador, e suas interações com os demais fatores, como efeito aleatório no procedimento MIXED (SAS INSTITUTE INC., 2015b).

Para os dados de proliferação celular adotou-se um modelo de medidas repetidas no tempo considerando os efeitos fixos de tratamento e tempo, a interação tratamento x tempo e o efeito da criopreservação, bem como os efeitos aleatórios das interações tratamento x doador e criopreservação x doador:

$$y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \delta_l + \tau\gamma_{ij} + \tau\alpha_{ik} + \delta\alpha_{lk} + e_{ijkl}$$

Assumiu-se ainda variâncias heterogêneas para o efeito de tratamento e a matriz de covariâncias residuais foi determinada de acordo com o menor valor do critério de informação de Akaike (AKAIKE, 1973). Para o caso de efeito significativo do fator tempo: $y_j = \beta_0 + \beta_1 \gamma_j + e_j$

Os dados de viabilidade do protocolo de transporte foram analisados considerando-se os efeitos fixos de tratamento e tempo, isto é: $y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_1 \gamma_j + \tau \alpha_{ik} + e_{ijk}$

A viabilidade no trypan foi analisada considerando-se os efeitos fixos de tratamento e criopreservação, por: $y_{ilk} = \mu + \tau_i + \delta_1 + \alpha_k + e_{ilk}$

Por fim, a viabilidade com anexina V, porcentagem de apoptose inicial, porcentagem de apoptose tardia e taxa de necrose, aferidas na Anexina V, foram analisadas considerando-se os efeitos fixos de tratamento e criopreservação, bem como os efeitos aleatórios das interações tratamento x doador e criopreservação x doador de acordo com o seguinte modelo:

$$y_{ilk} = \mu + \tau_i + \delta_1 + \tau \alpha_{ik} + \delta \alpha_{ik} + e_{ilk}$$

Em que: μ é uma constante; τ_i representa o efeito fixo do tratamento; γ_j representa o efeito fixo do tempo de mensuração; δ_1 representa o efeito fixo do estágio de criopreservação; $\tau \gamma_{ij}$ representa o efeito fixo da interação entre o tratamento com o tempo; $\tau \alpha_{ik}$ o efeito aleatório da interação entre o tratamento com o doador; $\delta \alpha_{ik}$ é o efeito aleatório da interação entre o estágio de criopreservação com o doador; β_0 representa o intercepto do modelo; β_1 representa o coeficiente de regressão da contagem do número de células sobre o tempo (γ_j); α_k representa o efeito aleatório do doador, e $e_{ijkl}, e_j, e_{ijk}, e_{ilk}$ representa o resíduo associado a cada observação.

3. RESULTADOS

3.1. Viabilidade celular

Os dados apresentaram distribuição normal e homocedasticidade. Foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos das CTMs caninas,

quanto ao número de células, a viabilidade com o Trypan e a viabilidade com a anexina V. Para a apoptose inicial, apoptose tardia e a necrose não foram observadas diferenças entre os parâmetros avaliados quando comparados os grupos experimentais ($P \leq 0.05$). Em relação ao número de células em necrose só foram observadas diferenças estatísticas quanto a criopreservação ($P = 0,0107$) ou seja, só quando a célula estava fresca ou congelada. Nenhuma das outras variáveis tiveram significância quanto a criopreservação (Tabela 3; Tabela 4).

Tabela 3. Comparação de médias para o efeito de tratamento

Variável	Tratamentos				
	NCRIO	SFB	DMEM/F12	PVA/ITS/BSA	BAM
Número de células($\times 10^3$)	32,8 ^a \pm 0,3	18,6 ^c \pm 0,3	18,7 ^c \pm 0,3	18,3 ^c \pm 0,3	20,7 ^b \pm 0,3
Viabilidade Trypan blue(%)	91,9 ^a \pm 6,1	72,5 ^b \pm 1,8	74,7 ^b \pm 1,8	86,9 ^a \pm 1,8	81,3 ^a \pm 1,8
Viabilidade Anexina(%)	94,1 ^a \pm 5,9	74,7 ^b \pm 3,9	70,0 ^b \pm 3,9	83,2 ^a \pm 3,9	84,0 ^a \pm 3,9
Apoptose inicial(%)	5,6 ^a \pm 9,8	1,8 ^a \pm 6,5	14,9 ^a \pm 6,5	8,5 ^a \pm 6,5	1,1 ^a \pm 6,5
Apoptose tardia(%)	4,3 ^a \pm 5,5	12,5 ^a \pm 3,6	12,9 ^a \pm 3,6	6,4 ^a \pm 3,6	7,1 ^a \pm 3,6
Necrose(%)	1,4 ^a \pm 4,1	10,9 ^a \pm 2,8	15,3 ^a \pm 2,8	10,1 ^a \pm 2,8	7,6 ^a \pm 2,8

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 4. Comparação de médias para o efeito de criopreservação

Variável	Criopreservação	
	Após descongelação	Recultivo
Número de células ($\times 10^3$)	21,79 ^a \pm 0,17	21,92 ^a \pm 0,18
Viabilidade Trypan blue(%)	81,07 ^a \pm 2,62	81,87 ^a \pm 1,44
Viabilidade anexina(%)	80,45 ^a \pm 3,07	80,45 ^a \pm 2,51
Apoptose inicial(%)	1,09 ^a \pm 4,12	11,68 ^a \pm 5,04
Apoptose tardia(%)	4,96 ^a \pm 2,31	12,42 ^a \pm 2,83
Necrose(%)	13,50 ^a \pm 1,75	4,63 ^b \pm 2,14

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

Para a variável número de células o NCRIO teve a maior média entre os tratamentos, mas o BAM foi maior que os grupos SFB, DMEM/F12 e PVA/ITS/BSA.

A viabilidade das células com *Trypan blue* e anexina V foram semelhantes estatisticamente. Os tratamentos (NCRIO), (PVA/ITS/BSA) e (BAM) foram similares e apresentaram as maiores médias.

3.2. Protocolo de transporte

Os resultados para viabilidade celular após a descongelação nas horas observadas (4,12,24,48 e 96 horas), demonstraram que não houve diferença entre os tratamentos, e a viabilidade foi decaindo com o passar das horas (Figura 4; Tabela 5).

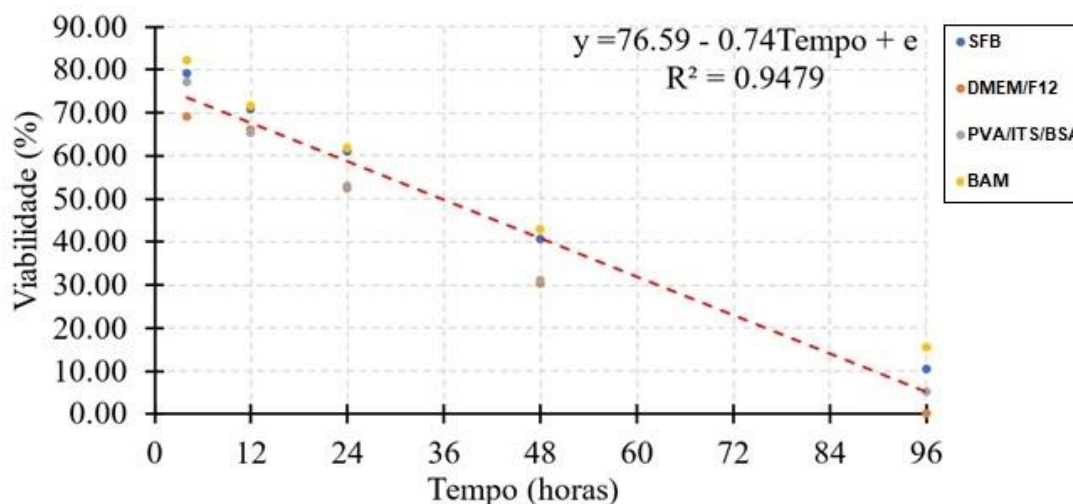


Figura 4. Curva de viabilidade das CTMs caninas após a descongelação nas horas observadas (4,12,24,48 e 96 horas).

Tabela 5. Comparação de médias da viabilidade sobre os tratamentos

Variável	Tratamentos				
	NCRIO	SFB	DMEM/F12	PVA/ITS/BSA	BAM
Viabilidade PD(h) ¹	--	52,4 ^a ± 1,8	43,5 ^a ± 1,8	46,2 ^a ± 1,8	54,7 ^a ± 1,8

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na mesma linha não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). -- significa a não inclusão deste efeito no modelo. ¹Viabilidade pós-descongelação nas horas observadas (4,12,24,48 e 96 horas).

3.3. Proliferação celular

Em todos os tratamentos as células apresentaram aumento na concentração celular de acordo com o tempo, mas houve diferenças entre os tratamentos. Com 48 e 96 horas de cultivo, o crescimento foi semelhante, no qual o NCRIO obteve a maior média entre os demais grupos, e o BAM foi superior ao SFB, DMEM/F12 e PVA/ITS/BSA. Entretanto, com 144 horas o NCRIO e o

BAM continuaram semelhantes, mas o PVA/ITS/BSA diferiu, apresentando uma média inferior em relação aos outros tratamentos (Tabela 6; Figura 5).

Tabela 6. Proliferação das CTMs caninas após 144h

Tempo	Tratamentos				
	NCRIO	SFB	DMEM/F12	PVA/ITS/BSA	BAM
0	10,0 ^{D,a} ± 0,4	10,0 ^{D,a} ± 0,4	10,0 ^{D,a} ± 0,4	10,0 ^{D,a} ± 0,3	10,0 ^{D,a} ± 0,4
48	27,7 ^{C,a} ± 0,4	15,2 ^{C,c} ± 0,4	15,7 ^{C,c} ± 0,4	15,3 ^{C,c} ± 0,3	17,5 ^{C,b} ± 0,4
96	38,1 ^{B,a} ± 0,4	21,3 ^{B,c} ± 0,4	21,2 ^{B,c} ± 0,4	21,2 ^{B,c} ± 0,3	24,2 ^{B,b} ± 0,4
144	55,7 ^{A,a} ± 0,4	28,0 ^{A,c} ± 0,4	27,8 ^{A,c} ± 0,4	26,8 ^{A,d} ± 0,3	31,3 ^{A,b} ± 0,4

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

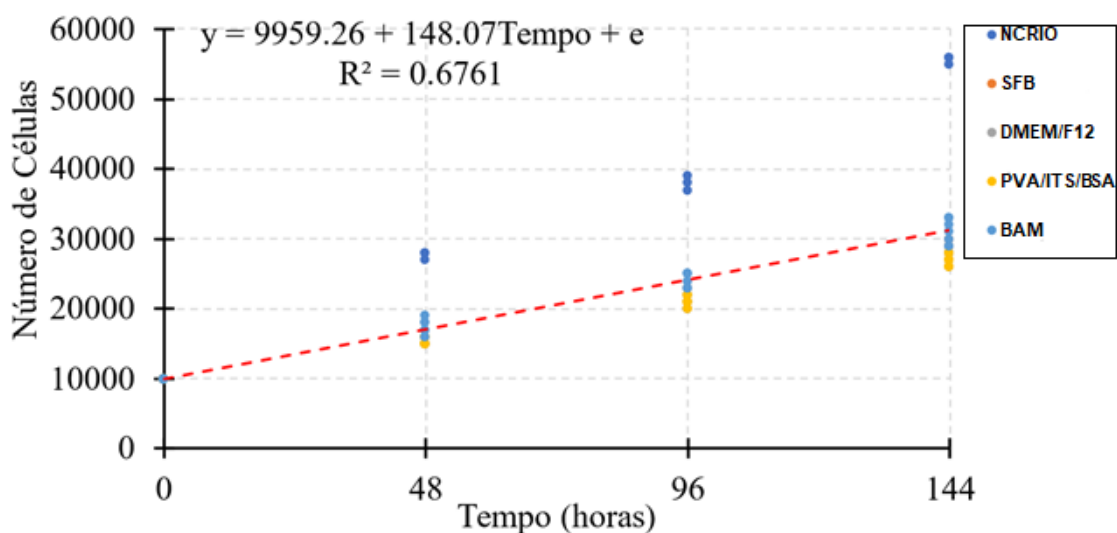


Figura 5. Curva de crescimento das CTMs caninas após 144 horas.

3.4. Ultraestrutura

As CTMs caninas, derivadas de tecido adiposo apresentaram morfologia típica, semelhante às células descritas para outras espécies domésticas. De maneira geral, observou-se células de formato ovalado ou alongado com inúmeras microvilosidades em sua superfície (Figura 6A e B).

O núcleo apareceu com formato irregular, sendo que em alguns cortes observou-se diversas secções (Figura 6A). O citoplasma foi pouco eletrondenso e apresentou-se com muitas mitocôndrias pequenas de aspecto ovalado ou alongado e diversas vesículas membranosas (Figura 6C). Foi observado retículo

endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas preenchidas por um material com granulação fina e baixa eletrondensidade (detalhe Fig 6C). Na superfície celular foram observadas algumas vesículas cobertas e no citoplasma vacúolos digestórios (Figura 6C).

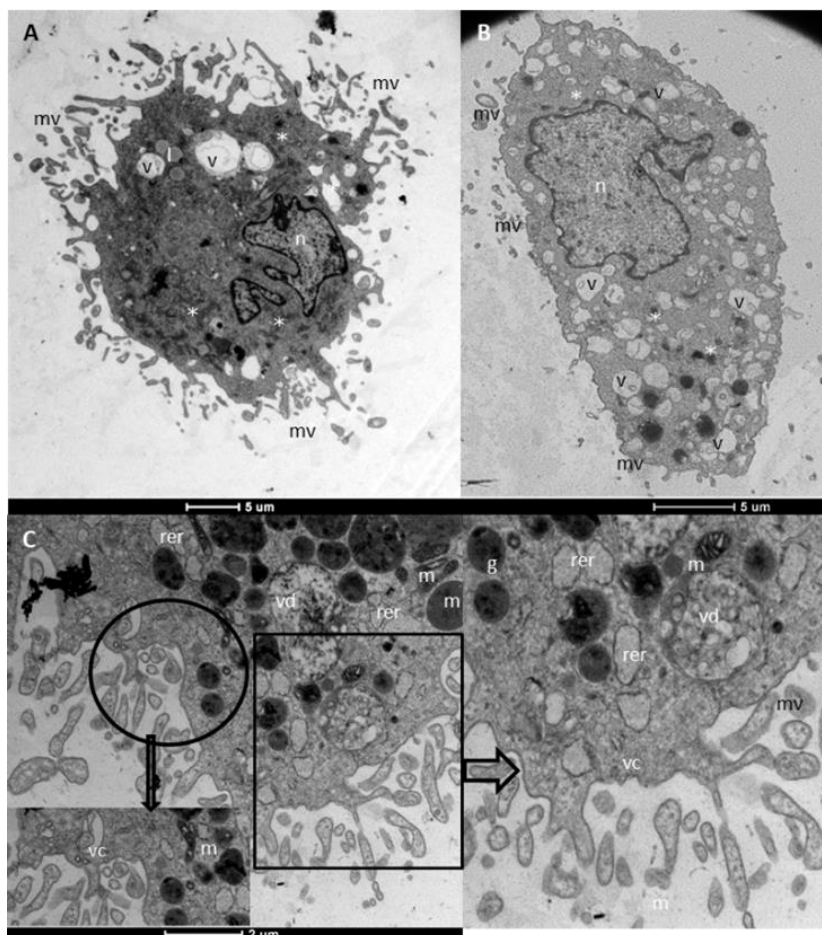


Figura 6. CTMs caninas não submetidas a congelação NCRIIO. A) e B) CTMs apresentando superfície celular coberta por microvilosidades (mv), núcleo (n) com formato irregular e presença de um único nucléolo (nu). O citoplasma aparece com baixa eletrondensidade e contendo mitocôndrias pequenas com formato alongado (*) e várias vesículas membranosas (v). C) Detalhe do citoplasma no qual podem ser visto o retículo endoplasmático rugoso (rer) com cisternas dilatadas, lisossomos (l) e a presença de poucos vacúolos digestórios (vd). Nos detalhes é possível observar a superfície das células com pequenas vesículas cobertas (vc).

Logo após a descongelação, em todos os tratamentos, foram observadas células com um maior número de vacúolos autossômicos. Algumas células

apresentaram morfologia semelhante a processos de autofagia. Além disso, algumas células apresentaram aumento da quantidade de microvilosidades em sua superfície (Figuras 7C, 8C, 9A e 10A e C) Não foram observados danos as demais estruturas celulares (Figuras 7 a 9).

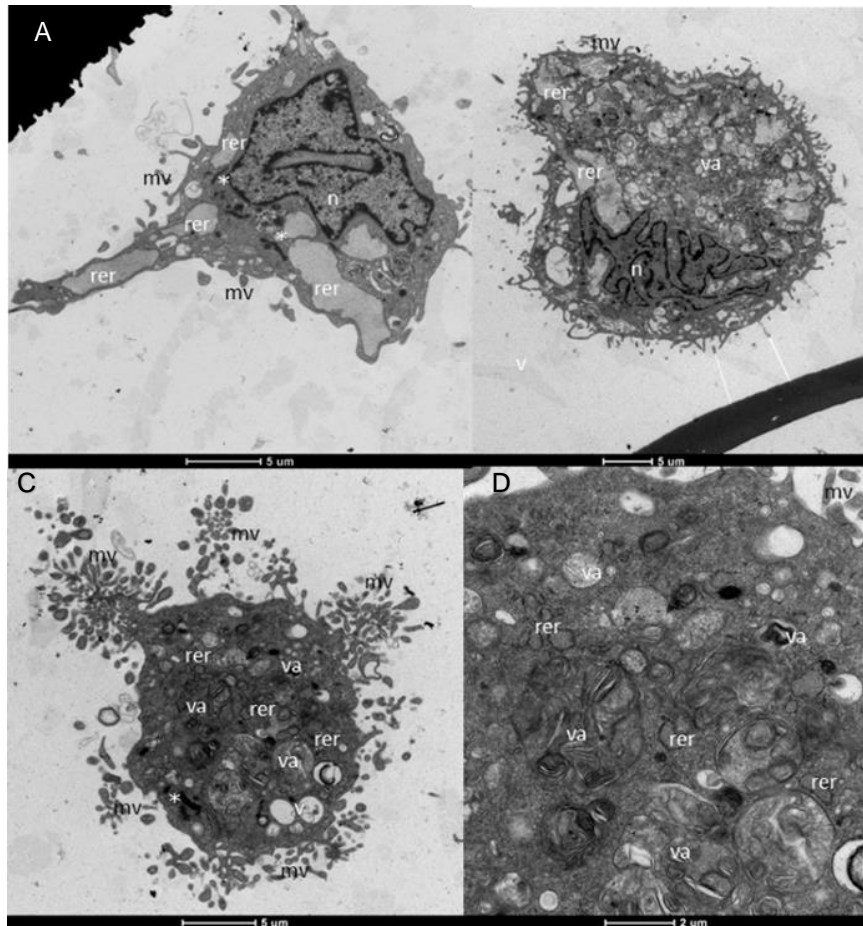


Figura 7. CTMs após a descongelação, tratamento SFB. A) Eletromicrografia de uma célula com morfologia normal, contendo núcleo (n) irregular, mitocôndrias pequenas (*) e retículo endoplasmático rugoso (rer) com cisternas bem dilatadas. B) e C) CTMs em autofagia. Notar a presença de vários vacúolos autossômicos (va) em seu citoplasma. D) Detalhes dos vacúolos autossômicos (va) e a presença de material membranoso em seu interior. V= vesículas membranosas.

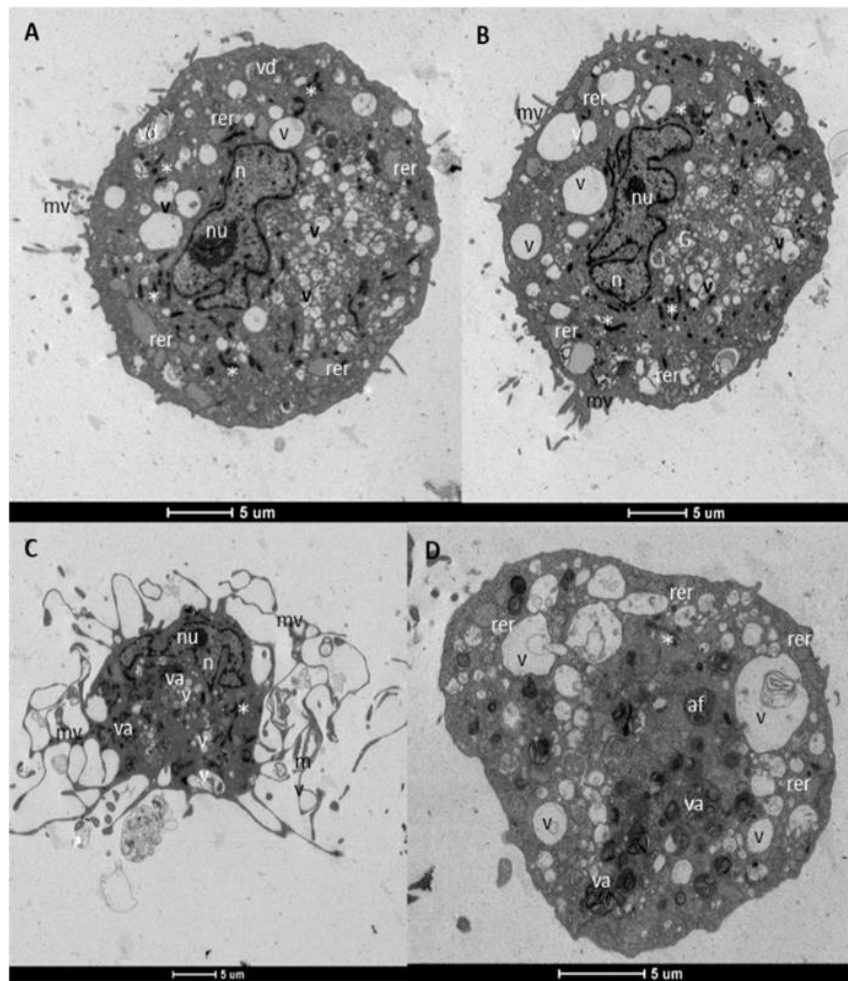


Figura 8. CTMs após a descongelação, tratamento DMEM/F12. A) e B) Eletromicrografias mostrando o aspecto geral de CTMs. Notar a presença do núcleo (n) irregular, contendo um nucléolo (nu) evidente e um grande número de vesículas membranosas (v) associados ao complexo de Golgi (G). C) Eletromicrografia de uma MSC com microvilosidades (mv) bem desenvolvidas em sua superfície. Notar a presença de vacúolos autossômicos (va) no citoplasma. D) Detalhe do citoplasma de uma MSC contendo vários vacúolos autossômicos (va). rer = retículo endoplasmático rugoso.

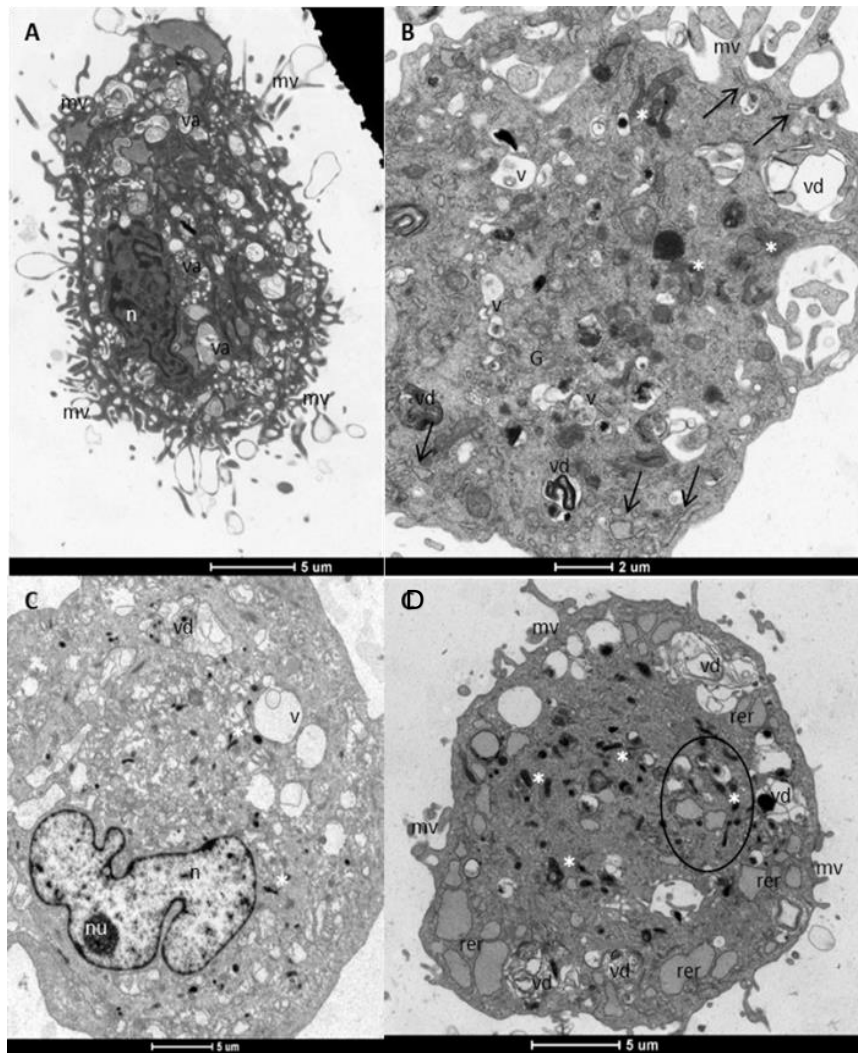


Figura 9. CTMs após a descongelamento, tratamento PVA/ITS/BSA. A) Eletromicrografia de CTMs em autofagia. Notar a presença de vários vacúolos autossômicos (va) em seu citoplasma, e microvilosidades (mv) bem desenvolvidas em sua superfície. C) CTMs de aspecto normal, com núcleo (n) irregular contendo somente um nucléolo (nu), mitocôndrias pequenas em seu citoplasma (*) e alguns vacúolos digestórios (vd) presentes na região cortical da célula. B) e D) Detalhes do citoplasma das CTMs. Em B) note o rer com cisternas estreitas (setas) e a presença do complexo de Golgi (G) associado a várias vesículas membranosas (v). Em D) o rer aparece com cisternas dilatadas, muitas vezes associado a mitocôndrias (área circulada) V= vesículas membranosas, rer = retículo endoplasmático rugoso.

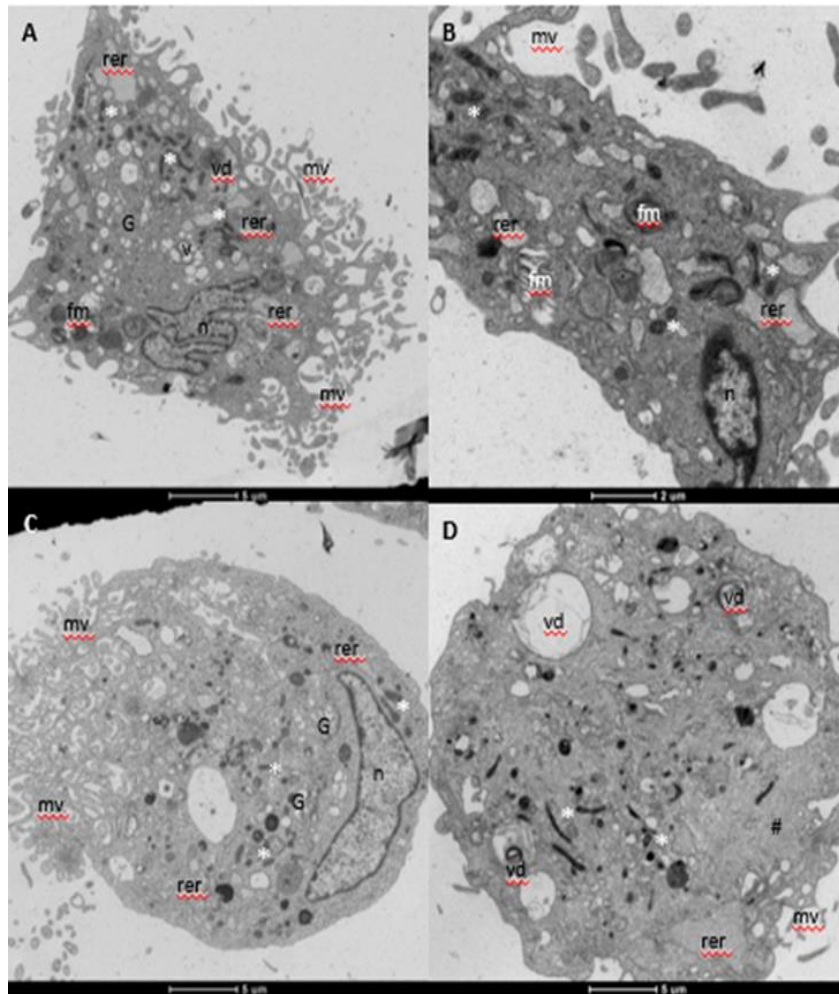


Figura 10. CTMs após a descongelamento, tratamento BAM. A) e C) Aspecto geral das CTMs, mostrando elevado número de microvilosidades (mv) em um dos polos celulares e elevada quantidade de vesículas membranosas (v) associadas a um complexo de Golgi (G) bem desenvolvido. Notar a presença de figuras mielínicas (fm). B) e D) Detalhe do citoplasma das CTMs. Notar a dilatação das cisternas do rer, próximo ao qual estão pequenas mitocôndrias (*) com formato arredondado ou alongado. # = filamentos de actina.

Após o recultivo as células de todos os grupos assumiram uma morfologia semelhante à do grupo não criopreservado (Figura 11A). No grupo recultivado do tratamento SFB observou-se uma morfologia que indicava o aumento da função secretora, com a presença de inúmeras vesículas membranosas (Figura 11B), as quais, em alguns cortes apareciam associadas ao complexo de Golgi (Figura 11D). Além disso, foi observado um acúmulo de grânulos de coloração

escura, não envoltos por membrana, semelhantes a grânulos de lipídeo (Figura 11C).

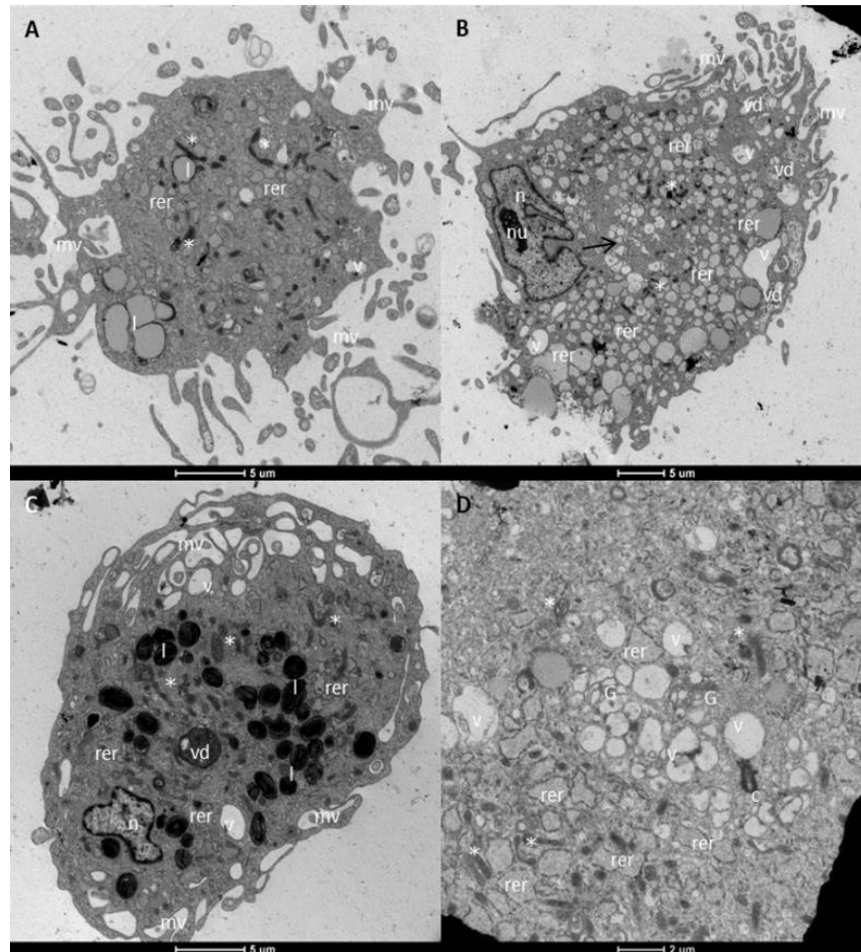


Figura 11. CTMs recultivadas, tratamento SFB. A) Eletromicrografia de MSC com aspecto normal apresentando citoplasma repleto de mitocôndrias(*) pequenas, alongadas ou em forma de alteres, retículo endoplasmático rugoso (rer) e a presença de grânulos de lipídeo (l), bem como de figuras mielínicas (setas). B) Notar a presença do complexo de Golgi bem desenvolvido associado a grande quantidade vesículas membranosas (v). Próximo a membrana plasmática coberta de microvilosidades (mv) notar a presença de vacúolos digestórios (vd). C) Eletromicrografia de MSC apresentando grande quantidade de grânulos de lipídeo (l) em seu citoplasma. D) Detalhe do citoplasma de MSC mostrando complexo de Golgi (G) bem desenvolvido, vesículas em profusão e retículo endoplasmático rugoso (rer) dilatado. C= centríolo.

Nos demais grupos, após o recultivo a morfologia nuclear continuou irregular e com a presença de um nucléolo bem desenvolvido. As mitocôndrias apareceram distribuídas pelo citoplasma com aspecto alongado e em algumas situações em forma de alteres. O retículo endoplasmático rugoso continuou aparecendo com vesículas dilatadas e preenchido por material com granulação fina. Na superfície celular, elevada quantidade de microvilosidades foi observada. No grupo DMEM/F12 foram observados vacúolos digestórios em abundância, mas em menor quantidade quando comparado às células logo após a descongelação.

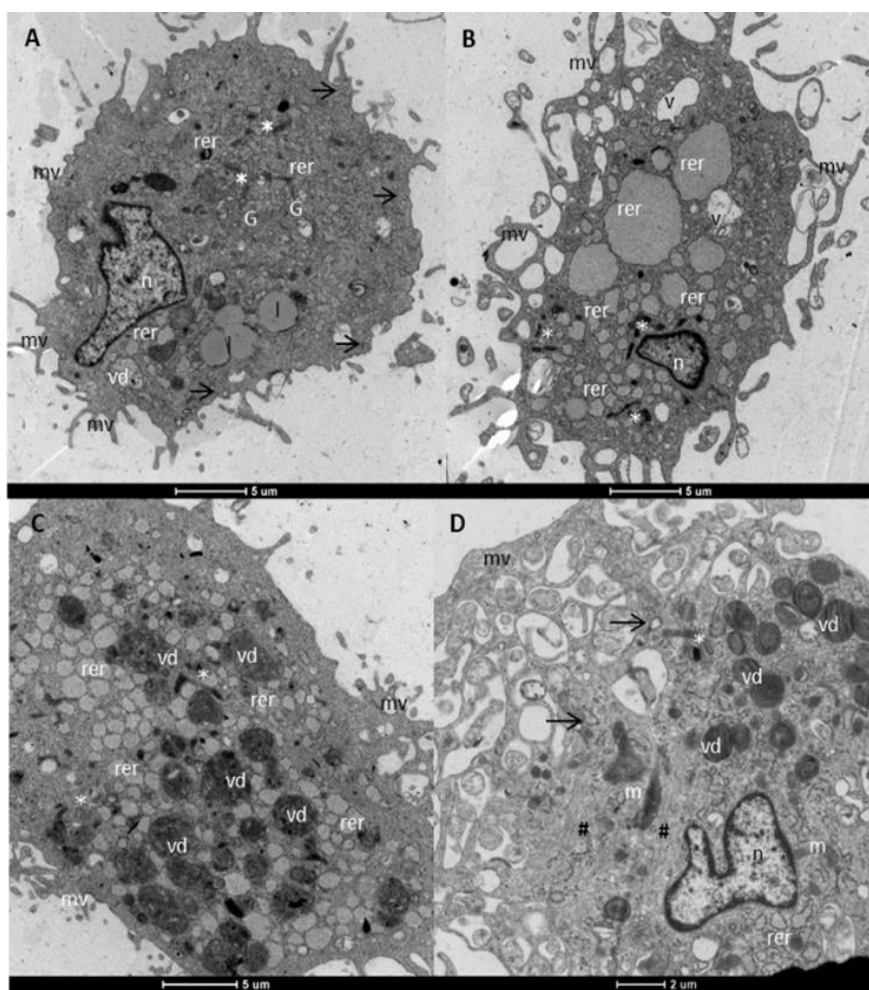


Figura 12. CTMs recultivadas, tratamento DMEM/F12. A) Eletromicrografia de MSC com aspecto normal. Notar o núcleo (n) irregular e o citoplasma repleto de mitocôndrias (*) pequenas, complexo de Golgi (G) bem desenvolvido e a presença de grânulos de lipídeo (l). Setas = vesículas cobertas. B) MSC apresentando grande quantidade de microvilosidades (mv) em sua superfície e a presença de um retículo endoplasmático rugoso (rer) com cisternas dilatadas.

C) Aspecto do citoplasma de uma MSC contendo vários vacúolos digestórios (vd) em seu citoplasma. Notar o aspecto das cisternas do retículo endoplasmático liso (rer). D) Detalhe de um polo da MSC apresentando inúmeras microvilosidades (mv) vesículas cobertas (setas) e vacúolos digestórios (vd). Notar a presença de filamentos de actina no citoplasma (#).

As células recultivadas dos grupos PVA/ITS/BSA e BAM apresentaram vesículas membranosas, com menor presença de vacúolos digestórios. As demais características foram semelhantes as descritas para células frescas e estão apresentadas na Figuras 13 e 14.

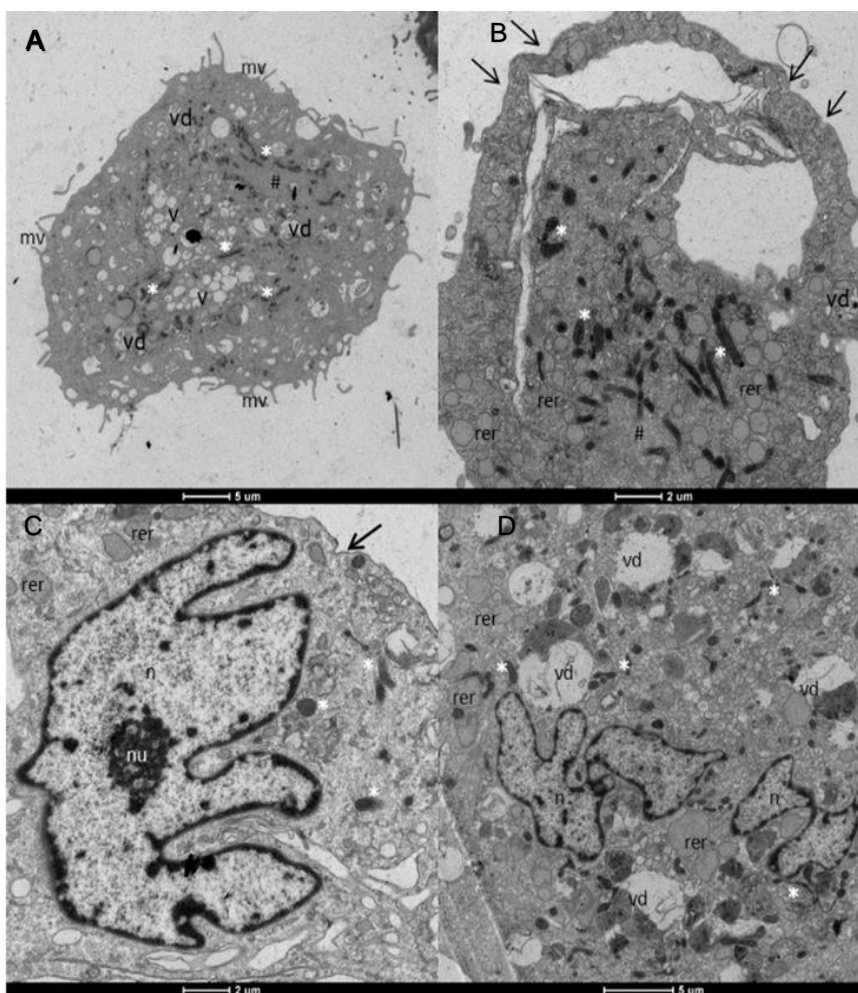


Figura 13. CTMs recultivadas, tratamento PVA/ITS/BSA. A) aspecto geral do citoplasma de MSC mostrando inúmeros vacúolos (v) em seu interior, mitocôndrias (*) pequenas e microvilosidades (mv) na sua superfície. # = filamentos de actina. B)

Aspecto alongado das mitocôndrias (*) de MSC. Observar um extenso prolongamento celular (setas) emitido pela célula. Em seu interior é possível observar as cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso (rer). C) Detalhe de um núcleo (n) de MSC apresentando eucromatina com aspecto granular e um nucléolo (nu) evidente. Notar a invaginação do citoplasma iniciando a formação de uma vesícula coberta (seta). D) MSC com núcleo (n) irregular, em dois cortes. Notar a presença de vários vacúolos digestórios (vd). V= vesículas membranasas.

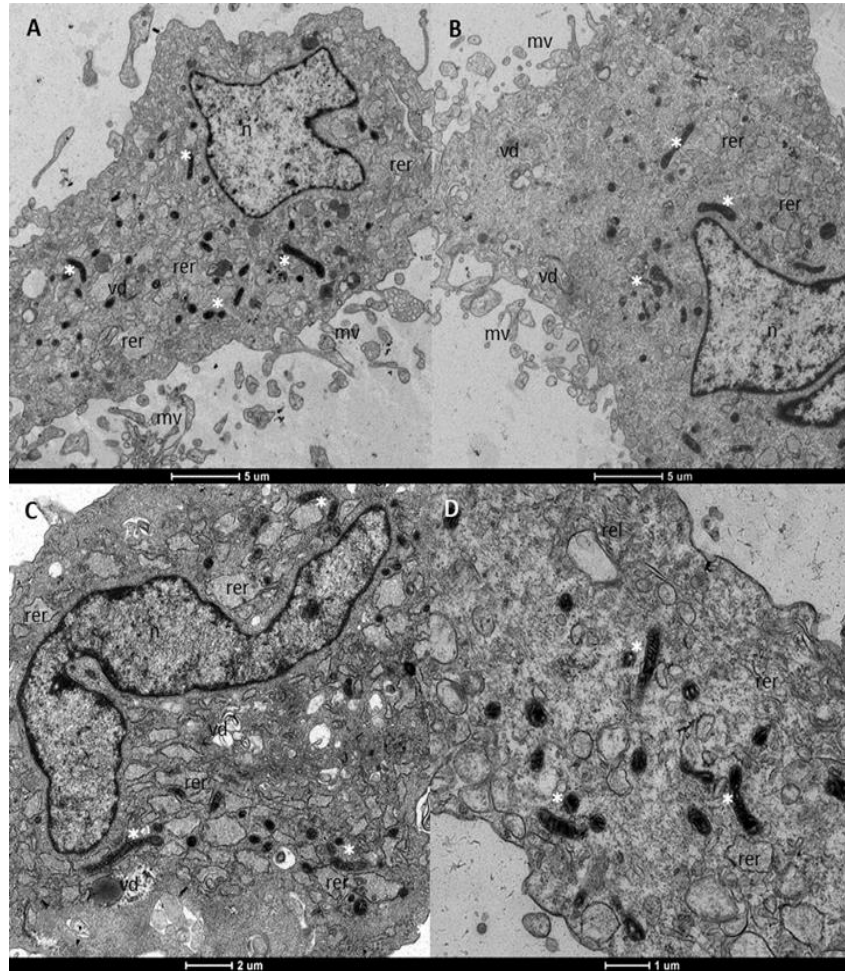
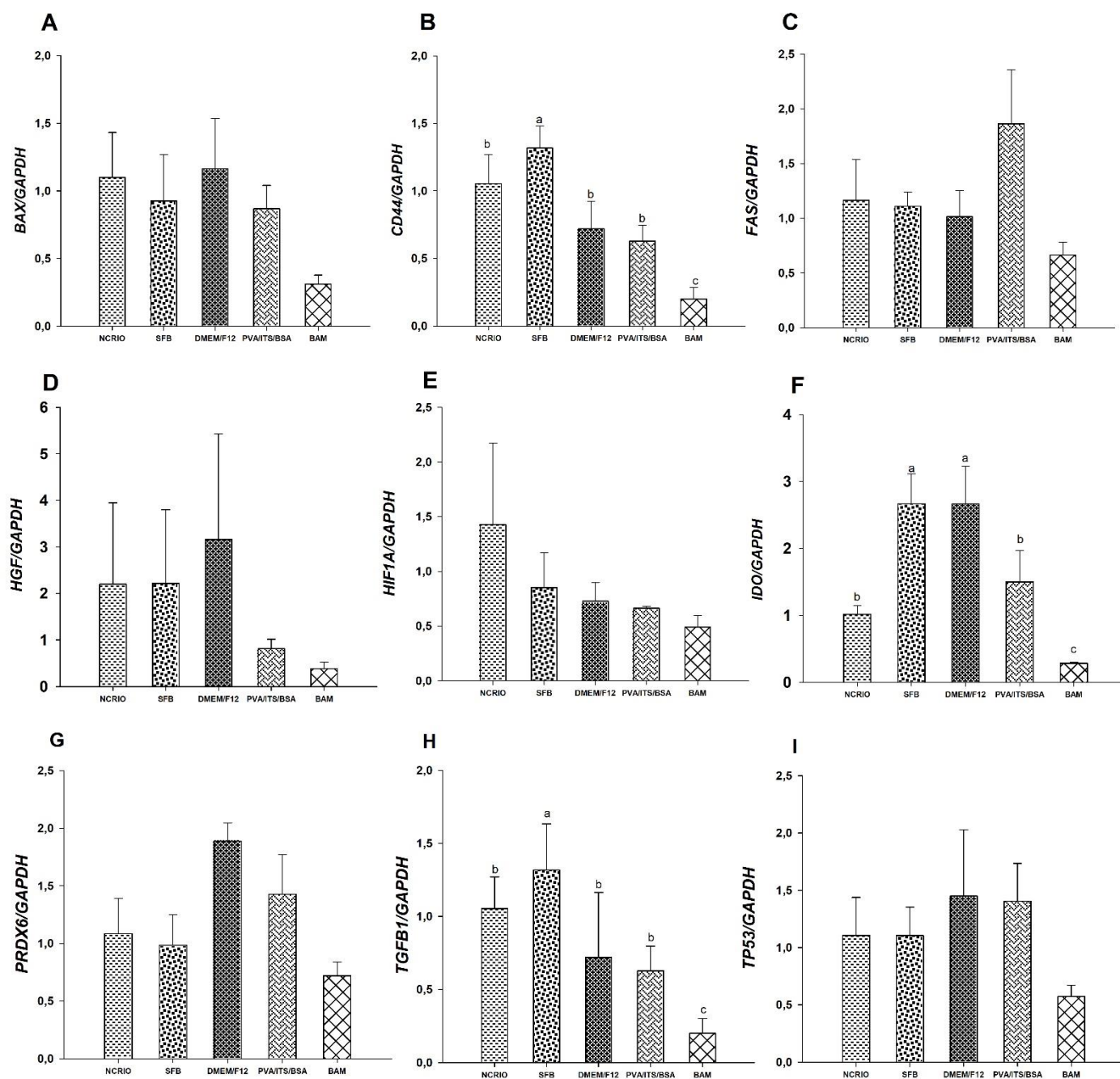


Figura 14. CTMs recultivadas, tratamento BAM. A), B) e C) Eletromicrografia de CTMs com aspecto normal mostrando a presença do núcleo (n) irregular, mitocôndrias (*) pequenas de formato arredondado ou alongado e rer com cisternas bem dilatadas. Notar ainda a presença de vacúolos digestórios (vd) em todas as células. D) Detalhe do citoplasma de MSC mostrando o aspecto das mitocôndrias (*) alongadas, rer com cisternas dilatadas e retículo endoplasmático liso (rel) com cisternas estreitas. mv= microvilosidades.

3.5. PCR quantitativa em tempo real (RT- qPCR)

Houve diferença significativa entre os tratamentos para os transcritos *CD44* e *TGFB1*, em que os transcritos se expressaram mais no SFB e menos no tratamento BAM. O *CXCL12* e *IDO* que se expressaram menos no grupo BAM e foi superior nos grupos DMEM/F12 e SFB (Figura 15). Para os demais genes não foram observadas diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0.05$).



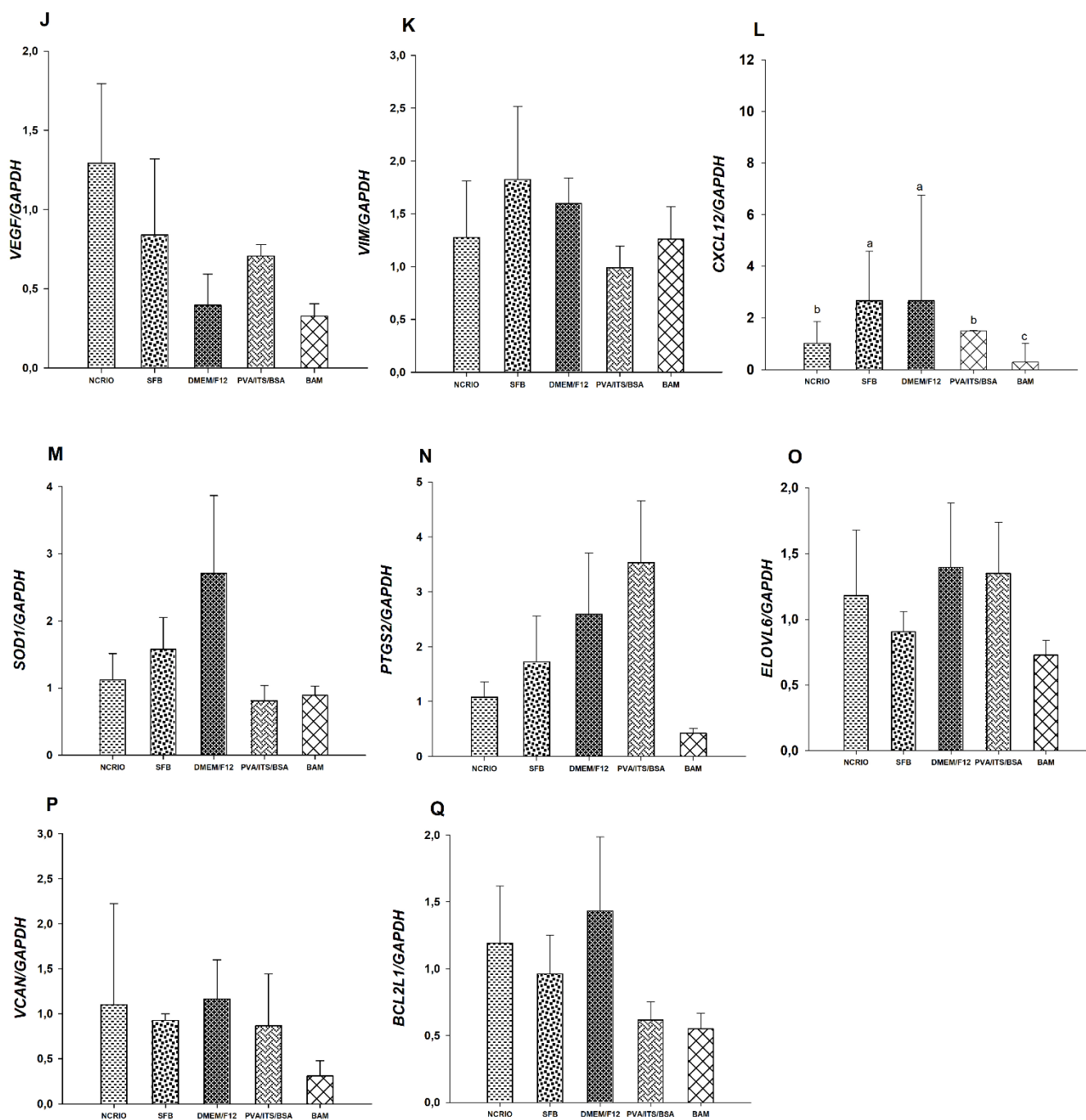


Figura 15. Expressão gênica das CTMs caninas.

3.6. Análise de custo das soluções crioprotetoras

A análise de custo total das soluções crioprotetoras (Tabela 7), mostrou que as soluções autoformuladas tem um custo mais acessível em relação a marca comercial utilizada nesse estudo.

Tabela 7. Custo das soluções crioprotetoras

Solução crioprotetora	Valor/mL (R\$)
SFB	155,9
DMEM/F12	156,2
PVA/ITS/BSA	205,3
Bambanker™	500,0

4. DISCUSSÃO

Este estudo buscou solução para a criopreservação de CTMs caninas obtidas de tecido adiposo em meio livre de SFB, mas com um custo de produção aplicável à realidade da Medicina Veterinária. A marca comercial Bambanker™ foi superior quanto ao número de células, mas ainda assim foi inferior ao grupo não criopreservado. A hipótese mais plausível é de que algumas das células sofreram ruptura de suas membranas durante os processos de congelação e descongelação.

Na análise ultraestrutural, não se constatou um aumento dos fragmentos celulares nos grupos avaliados, o que indica uma preservação similar da estrutura celular em todos os grupos. Uma outra possibilidade é que a divisão das células não criopreservadas continuou acontecendo enquanto as células congeladas tiveram uma parada ou diminuição do ciclo celular em resposta ao estresse da congelação.

Apesar da vantagem observada no grupo BAM quanto ao número de células, vale salientar que todos os tratamentos apresentaram um aumento na quantidade de células com o passar das horas de cultivo. Esta observação demonstra que após a criopreservação o efeito dos componentes do meio não causou nenhum dano irreversível, já que em todos os grupos houve proliferação celular, e um rápido padrão de crescimento foi observado, de maneira similar à antes da congelação.

Além disso, não foram observadas alterações na morfologia celular, durante o recultivo após a descongelação. Em estudos com células de tecidos refrigerados e vitrificados, QUEIROZ NETA et al. (2018) e BORGES et al. (2018) relataram o mesmo padrão de proliferação celular que o nosso estudo, onde

obtiveram uma recuperação de números semelhantes de células-tronco após a criopreservação.

Os dados de viabilidade obtidos com o *Trypan blue* e a anexina V foram similares, e mostraram que todas as soluções crioprotetoras utilizadas foram eficientes, com índices de viabilidade pós-descongelação aceitáveis, indicando baixa crioinjúria, pois os tratamentos demonstraram viabilidade acima de 70%, logo após a descongelação para os grupos SFB e DMEM/F12, a qual, embora satisfatória, foi inferior aos valores obtidos nos tratamentos BAM e PVA/ITS/BSA, que resultaram em uma média acima de 80% se igualando estatisticamente com a viabilidade das células que não foram criopreservadas (90%).

Os autores estudaram o efeito dos crioprotetores em células endoteliais da córnea humana, e constaram que o crioprotetor Bambanker™, preservou mais a viabilidade e proliferação celular nas análises pós-descongelação, com uma quantidade de células vivas após a criopreservação próximo aos resultados das células frescas (90%). Entretanto, por ser um crioprotetor comercial não é possível saber especificamente qual a fórmulação do Bambanker™. Em sua composição há 10% de DMSO, não contém SFB, e seu uso promove maior proteção (OKAMURA et al., 2019).

Neste sentido, a presente pesquisa propôs a utilização de soluções crioprotetoras autoformuladas, como o meio PVA/BSA/ITS, que contém álcool polivinílico (PVA) associado ao tris (hidroximetil) aminometano, cloridrato de tris, álcool polivinílico 22000, glicerol e 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano. O insulín-transferrin-sodium selenite (ITS) é uma mistura de insulina humana recombinante, transferrina humana e selenito de sódio. A albumina sérica bovina (BSA), é uma proteína associada com a solução de descongelamento de Beltsville (BTS) (SIGMA ALDRICH, 2022). O uso associado do ITS, BSA e DMSO combinou crioprotetores intracelulares e extracelulares, em uma mistura com alta penetração celular e com efeito de diminuir a citotoxicidade do DMSO, evitar o uso do SFB, e proteger a membrana plasmática da célula na formação de gelo intracelular e do estresse osmótico (GHAVAMI et al., 2015).

A eficiência do uso combinado de soluções crioprotetoras também foi constatada pelos autores, que avaliaram a combinação de crioprotetores intracelulares para vitrificação de células do tecido testicular de cateto adulto, e concluíram que o DMSO associado com o etilenoglicol promoveu melhores

resultados (SILVA et al., 2019). E as células do cordão umbilical humano criopreservadas com o DMSO e a sacarose apresentaram resultados superiores de viabilidade (ROY et al., 2014).

O teste de viabilidade após 4,12,24,48 e 96 horas do descongelamento foi feito com o objetivo de quantificar a viabilidade das células com o passar das horas, simulando o transporte para uma possível aplicação terapêutica ou outra ação em que houvesse a necessidade do deslocamento da amostra, estabelecendo assim um protocolo de transporte. Os grupos estudados não diferiram entre si quanto ao padrão de viabilidade, por tanto as CTMs criopreservadas por qualquer uma das metodologias testadas estão aptas para serem transportadas sem alterar sua qualidade, demonstrando que a criopreservação não afetou as características celulares e seu padrão normal de viabilidade.

As curvas de crescimento observadas foram ascendentes em todos os tratamentos e estágios (frescas, criopreservadas e recultivadas). Em todos os grupos as células não foram afetadas quanto a sua proliferação, tendo um crescimento normal, durante o período de 144 horas, mostrando, novamente, que todos os tratamentos propostos foram efetivos, o que comprova que após o procedimento de criopreservação as células mantiveram a sua morfologia, viabilidade, perfil proliferativo e atividade metabólica (DUAN e LOPEZ, 2016). Estudos como os de SUBRAMANIAN et al. (2018) e BARNES et al. (2003), comprovam que as células criopreservadas e não criopreservadas apresentam um crescimento similar, pois a população celular, após estar estabelecida no cultivo, pode se recuperar de maneira similar ao grupo que não foi congelado.

Esses resultados corroboram com os dados encontrados em outros estudos, que avaliaram células de tecido adiposo de camundongos (GINANI; SOARES; BARBOZA, 2012) e (DAVIES et al., 2014). E células do tecido adiposo canino (DUAN; LOPEZ, 2016) e também as células do tecido adiposo humano (GONDA et al., 2008). Ambos estudos relataram que a criopreservação não afetou a capacidade proliferativa das CTMs. Também foi comprovado que as CTMs derivadas de tecido adiposo, material biológico utilizado por este estudo, são uma fonte robusta, e possuem um resultado superior independente da espécie.

Vale salientar que as células frescas mantiveram uma média de

proliferação superior em relação aos demais tratamentos, e o uso do meio comercial foi superior aos outros grupos avaliados. Este achado reforça a hipótese da superioridade da marca comercial, já mencionada anteriormente. A menor média foi observada no tratamento (PVA/ITS/BSA), mostrando que essa combinação de crioprotetores pode ter interferido no ciclo celular e, portanto, precisa ser mais testada, com possíveis reajustes nas concentrações de seus componentes.

É importante considerar, que para a retirada do DMSO são feitas as lavagens e centrifugações nas células após o descongelamento o que pode causar perdas celulares e uma diminuição na viabilidade, então esse fato pode ter comprometido inicialmente a proliferação celular nos grupos tratados (FRY et al., 2015).

A ultraestrutura, reforça os resultados encontrados quanto a proliferação, viabilidade e metabolismo das CTMs caninas criopreservadas, pois não foram observados danos significativos a morfologia celular. Entretanto, foram observadas algumas diferenças entre as células frescas e logo após a criopreservação, assim como entre os grupos do recultivo. Observou-se também que as CTMs caninas não diferem da morfologia descrita para CTMs equinas obtidas de medula óssea (MAIA et al., 2013), humanas obtidas de medula óssea (PASQUINELLI et al., 2007), da placenta e do cordão umbilical (ZHU et al., 2013).

As características mais evidentes observadas nesta análise foram a presença de um retículo endoplasmático rugoso com cisternas extremamente dilatadas, e a presença de vesículas membranosas de diversos tamanhos e eletrondensidade. O aspecto dilatado do rer e a sua associação com grande quantidade de ribossomos, indica que estas células estão envolvidas com a secreção de grandes quantidades de proteínas.

Essa característica já foi apontada por outros autores na ultraestrutura de CTMs de diferentes origens (TAGAMI et al., 2003; PASQUINELLI et al., 2007; ZHU et al., 2013) e está de acordo com o descrito na literatura sobre a alta capacidade das CTMs em produzir fatores tróficos que controlam o ambiente onde estão inseridas (GOMZIKOVA et al., 2019; CAPLAN, 2017; GNECCHI, ZHANG, NI, DZAU, 2008).

Em diversas células foi observada a presença de vesículas cobertas entre as microvilosidades das CTMs, indicando a captação de material extracelular.

Associado a isso foram observados corpos densos intracelulares semelhantes a fagossomos. A presença de fagossomos está diretamente relacionada com a inflamação por utilizar moléculas de sinalização semelhantes (ADEREM, 2003).

Células dendríticas, macrófagos e neutrófilos são as principais células fagocíticas do organismo (MILLS, 2015). Não existem relatos que indiquem que as CTMs sejam células fagocíticas, no entanto diversas imagens obtidas em nosso estudo lembram a morfologia de macrófagos e as CTMs têm interação com os macrófagos durante o processo de modulação da resposta imune (EGGNHOFER, 2015).

Logo após a criopreservação observou-se células com um grande número de vacúolos digestivos ou fagossomos. Embora essas estruturas sejam associadas ao processo de fagocitose, quando aparecem em grande quantidade, são associadas com a senescência e morte celular (ADEREM, UNDERHILL; 1999). Neste caso, as estruturas que se formam são chamadas de autofagossomos e servem para seletivamente degradar organelas citoplasmáticas lesionada, como por exemplo mitocôndrias. Quando as células sofrem falta de nutrição e estresse extremo outras organelas podem ser destruídas de forma não seletiva (CASTRO-OBREGON, 2010).

Associado a presença desses vacúolos digestórios foi observado nestes grupos de células um aumento de densidade do citoplasma, o qual se encontrava com um aspecto “encolhido”. Essas características conferiram às CTMs após a descongelação aspecto de células em início de processo de morte celular. Sendo assim, acreditamos que os números superiores de vacúolos encontrados nas células após a descongelação estejam associados ao estresse osmótico e tóxico durante a congelação.

Esta observação, entretanto, não foi acompanhada por uma modificação significativa nos índices de apoptose observados. O grupo de células que essas alterações foram menos evidentes foi o criopreservado com o meio comercial, indicando uma menor morte celular e conseqüentemente uma melhor proteção desse crioprotetor.

Após o recultivo das células foi observado novamente uma mudança de fenótipo. As células que foram congeladas com SFB, durante o recultivo apresentaram em seu citoplasma a presença de gotas de lipídeo, o que não foi observado nos outros grupos. A presença de lipídeo citoplasmático está

associada a produção de membranas para a formação de organelas e da membrana plasmática (MEYERS et al., 2017).

As CTMs possuem grande quantidade de microvilosidades e são produtoras de vesículas que são secretadas para o meio extracelular. A presença de gotas lipídicas e glicogênio no citoplasma de CTMs humanas está associada a diferenciação adipogênica (TAGAMI et al., 2003). Em embriões é conhecido que o uso de SFB no meio de cultivo leva a um acúmulo lipídico e a modificações do metabolismo lipídico (SUDANO et al., 2016), desta forma a manutenção das CTMs em meio composto por 90% de SFB e 10% de DMSO pode ter induzido o estoque de material lipídico nas células e/ou a diferenciação espontânea em pré-adipócitos.

Por outro lado, quando as células congeladas em DMEM/F12 foram recultivadas, observamos a presença de fagossomos. Entretanto, diferente do observado após a descongelação, estas células não apresentaram retração e aumento de densidade do citoplasma. Como já foi mencionado anteriormente, não existem relatos sobre a capacidade de fagocitose de CTMs, então não sabemos se as características observadas estão associadas a um processo de morte celular ou a fagocitose de substâncias contidas no meio.

As células que apresentaram morfologia mais similar com a observada nas CTMs frescas foram as células recultivadas após congelação com PVA/ITS/BSA e BAM. Neste caso foi observado rer com cisternas dilatadas, grande número de vesículas membranosas de diversos tamanhos e mitocôndrias com formato bastante alongado. Essa similaridade entre grupos condiz com o encontrado na análise de viabilidade celular e pode estar associada a ausência de SFB nos dois meios.

Os meios de criopreservação que contêm o SFB, têm a composição indefinida, por que a concentração de proteínas e de moléculas biológicas sofrem variação de um lote para outro, o que pode acarretar em problemas na descongelação das células e com conseqüente flutuações nas taxas de recuperação (NIPPON GENETICS, 2022). É importante lembrar também que o seu uso no cultivo celular para aplicação em terapias com *human mesenchymal stem cells* (HMSCs) é questionável, devido à fatores microbiológicos e imunogênicos (PARK et al., 2018). Sendo assim, a utilização de meios definidos e sem a presença de SFB é altamente desejado (PARK et al., 2018).

A vantagem do uso de soluções crioprotetoras autoformuladas, está associada com a precisão da composição (HUNT, 2019). Neste sentido, os resultados superiores obtidos com o tratamento PVA/BSA/ITS e BAM também podem estar associados a uma composição mais definida em relação aos meios que possuem o SFB. Portanto, a manutenção das características biológicas e morfológicas observadas nesse estudo, especificamente no tratamento PVA/ITS/BSA, pode estar associada também a uma diminuição dos cristais de gelo, promovida pela combinação de crioprotetores intra e extracelulares que causaram efeitos deletérios mínimos às características celulares (LEÓN-QUINTO et al., 2014).

A RT-qPCR demonstrou que os transcritos que codificam proteínas envolvidas com a apoptose (*BAX*, *BCL2L1*, *FAS* e *TP53*), não foram expressos diferencialmente entre os tratamentos, o que concorda com os índices de células apoptóticas encontradas com a coloração por anexina V. Os crioprotetores utilizados nesse estudo não influenciaram a apoptose celular, o que valida positivamente a utilização das soluções crioprotetoras analisadas.

O *BAX* e o *BCL2L1*, atuam como reguladores anti ou pró-apoptóticos, os quais estão envolvidos nas atividades celulares, e a proteína *Bax* forma um heterodímero com *BCL2* e funciona como um ativador apoptótico (REFSEQ, 2022). A associação do *BAX* com a *BCL2* também determina a sobrevivência ou morte de células após um estímulo apoptótico, e a expressão deste gene é regulada pelo supressor tumoral P53 que está envolvido na apoptose (REFSEQ, 2022). A expressão desses genes de forma semelhante indica que todos os tratamentos conseguiram proteger as células sem causar apoptose/morte celular, em proporções prejudiciais.

O estresse oxidativo é analisado para determinar a eficiência ou não de um dado protocolo de criopreservação, já que os crioprotetores podem apresentar citotoxicidade, o que compromete a revitalização das células após o descongelamento (BOMHARD et al., 2016). Portanto, foi feita a expressão gênica do *ELOVL6*, *SOD1* e do *PRDX6*, com o intuito de verificar se os agentes crioprotetores utilizados protegeram as células do estresse oxidativo. Ambos os genes se expressaram de maneira semelhante nos grupos avaliados, indicando que após a criopreservação das CTMs não houve estresse oxidativo

significativo, bem como danos ao metabolismo lipídico. Esse achado é importante e valida os protocolos utilizados.

O *CD44* é uma proteína marcadora de CTMs, e está envolvida em interações célula-célula, adesão e migração celular, recirculação e *homing* de leucócitos, adesão à matriz extracelular, proliferação e diferenciação celular (DELISSER, 2009). A expressão do CD44 foi maior no grupo SFB, esse fato pode ter ocorrido devido à alta concentração de SFB utilizado no tratamento (SFB). A presença do SFB em maior quantidade pode ter favorecido o crescimento das células, pois os constituintes proteicos presentes no SFB podem ter estimulado o crescimento e a produção de moléculas de adesão (BRUNNER et al., 2010). O mesmo fato ocorreu com o transcrito *TGFB1*, que também está envolvido com a proliferação celular, reforçando a hipótese mencionada.

A atividade de imunomodulação das CTMs foi avaliada pela expressão dos transcritos *IDO* e *CXCL12*, que mostrou uma variação entre os tratamentos, sendo que o grupo SFB e o DMEM/F12 apresentaram maior disponibilidade de transcritos em relação ao BAM. Estes genes desempenham um papel em vários processos fisiopatológicos, como defesa antimicrobiana e antitumoral, neuropatologia, imunorregulação e atividade antioxidante, embriogênese, vigilância imunológica e resposta inflamatória (LIEKENS, SCHOLS, HATSE, 2010). O fato destes genes estarem mais expressos nos grupos citados, pode indicar que nessas condições ocorreu uma estimulação da atividade imunossupressora das CTMs em resposta a combinação de crioprotetores.

O *VEGF*, *HGF* e *VCAN* estão envolvidos na angiogênese, e não apresentaram variação quanto aos grupos estudados. O *HGF* codifica uma proteína que se liga ao receptor do fator de crescimento de hepatócitos regulando o crescimento, motilidade celular e morfogênese em vários tipos de células e tecidos. Essa proteína é secretada por células mesenquimais e atua como uma citocina multifuncional em células de origem principalmente epitelial (REFSEQ, 2022). O fato do *HGF* e do *VEGF* terem se expressado de forma semelhante mostra que em todos os grupos houve uma proliferação celular adequada durante o cultivo, o que também foi constatado pela análise de proliferação.

Nenhum tratamento teve significância para os transcritos *HIF1A*, *PTGS2* e *VIM*, o que significa que não sofreram influência da hipóxia, inflamação/mitogênese e migração/sinalização celular, que são as funções as quais estes genes estão ligados respectivamente (REFSEQ, 2022).

A análise de custo das soluções crioprotetoras mostrou que as soluções autoformuladas são mais acessíveis economicamente do que a marca comercial. Esse fato é positivo e deve ser levado em consideração para a escolha do crioprotetor a ser utilizado na rotina dos laboratórios, uma vez que as soluções autoformuladas tiveram um bom desempenho na criopreservação das CTMs caninas.

As limitações deste estudo foram a falta de recursos e tempo para realizar a análise de lipidômica, e para fazer a aplicação das células criopreservadas com as duas soluções autoformuladas DMEM/F12 e PVA/ITS/BSA nos pacientes caninos.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi observado que embora o tratamento com a marca comercial tenha sido superior aos demais crioprotetores, as outras combinações de substâncias crioprotetoras testadas foram eficientes na criopreservação das CTMs caninas, sendo alternativas que podem ser utilizadas. Todos os tratamentos possibilitaram a retomada das funções celulares normais após a descongelação e recultivo. As soluções autoformuladas são economicamente mais viáveis que a marca comercial.

Esses resultados são importantes para criação de criobancos de células caninas e para o estabelecimento de protocolos de criopreservação dessa espécie, pois aumentam as possibilidades de escolha da solução crioprotetora e também permite o uso de soluções economicamente viáveis e sem componentes contaminantes como o SFB.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001).

7. REFERÊNCIAS

ADEREM, A. Phagocytosis and the inflammatory response. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 187, p. S340-S345, 2003. Suppl. 2.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 17, n. 1, p. 593-623, 1999.

AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. **International Symposium on Information Theory**, Piscataway, p. 267-281, 1973.

ARMSTRONG, L.; LAKO, M.; BUCKLEY, N.; LAPPIN, T. R. J.; MURPHY, M. J.; NOLTA, J. A.; PITTENGER, M.; STOJKOVIC, M. Editorial: Our 10 top developments in stem cell biology over the last 30 years. **Stem Cells**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 2-9, 2012.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARNES, L. M.; BENTLEY, C. M.; DICKSON, A. J. Stability of recombinant protein production in the GS-NS0 expression system is unaffected by cryopreservation. **Biotechnology Progress**, Hoboken, v. 19, n. 1, p. 233-237, 2003.

BENSON, C. M. K.; BENSON, J. D.; CRITSER, J. K. An improved cryopreservation method for a mouse embryonic stem cell line. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 120-130, 2008.

BOMHARD, A. N. R.; ELSASSER, A.; RITSCHI, L. M.; SCHAWARZ, S.; ROTTER, N.; BORGES, A. A.; LIRA, G. P. O.; NASCIMENTO, L. E.; QUEIROZ

NETA, L. B.; SANTOS, M. V. O.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; PEREIRA, A. F. Influence of cryopreservation solution on the *in vitro* culture of skin tissues derived from collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Biopreservation and Biobanking**, New Rochelle, v. 16, n. 2, p. 77-81, 2018.

BOMHARD, A. N. R.; ELSÄSSER, A.; RITSCHI, L. M.; SCHAWARZ, S.; ROTTER, N. Cryopreservation of endothelial cells in various cryoprotective agents and media – vitrification versus slow freezing methods. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. 1-15, 2016.

CASTRO-OBREGON, S. The discovery of lysosomes and autophagy. **Nature Education**, Cambridge, v. 3, n. 9, p. 49, 2010.

CHAYTOR, J. L.; TOKAREW, J. M.; WU, L. K.; LECLÈRE, M.; TAM, R. Y.; CAPICCIOTTI, C. J.; GUOLLA, L.; MOOS, E.; FINDLAY, C. S.; ALLAN, D. S.; BEN, R. N. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. **Glycobiology**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 123-133, 2012.

DAVIES, O. G.; SMITH, A. J.; COOPER, P. R.; SHELTON, R. M.; SCHEVEN, B. A. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 342-347, 2014.

DELISSER, H. M. CD44: target for antiangiogenesis therapy. **Blood**, New York, v. 114, n. 25, p. 5114-5115, 2009.

DUAN, W.; LOPEZ, M. J. Effects of cryopreservation on canine multipotent stromal cells from subcutaneous and infrapatellar adipose tissue. **Stem Cell Reviews and Reports**, New York, v. 12, n. 12, p. 257-268, 2016.

EGGENHOFER, E.; LUK, F.; DAHLKE, M. H.; HOOGDUIJN, M. J. The life and fate of mesenchymal stem cells. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 5, p. 148, 2014.

FRY, L. J.; QUEROL, S.; GOMEZ, S. G.; MCARDLE, S.; REES, R.; MADRIGAL, J. A. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. **Vox Sanguinis**, Oxford, v. 109, n. 2, p. 181-190, 2015.

GHAVAMI, M.; MOHAMMADNEJAD, D.; BEHESHTI, R.; SOLMANI-RAD, J.; ABEDLAHI, A. Ultrastructural and morphological changes of mouse ovarian tissues following direct cover vitrification with different cryoprotectants. **Journal of Reproduction and Infertility**, Tehran, v. 16, n. 3, p. 138-147, 2015.

GINANI, F.; SOARES, D. M.; BARBOZA, C. A. G. Influência de um protocolo de criopreservação no rendimento in vitro de células-tronco derivadas do tecido adiposo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 359-363, 2012.

GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V. J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, Baltimore, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, 2008.

GONDA, K.; SHIGEURA, T.; SATO, T.; MATSUMOTO, D.; SUGA, H.; INOUE, K.; AOI, N.; KATO, H.; SATO, K.; MURASE, S.; KOSHIMA, I.; YOSHIMURA, K. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Hagerstown, v. 121, n. 2, p. 401-410, 2008.

HUBEL, A. Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. **Transfusion Medicine Reviews**, Orlando, v. 11, n. 3, p. 224-233, 1997.

HUNT, C J. Technical considerations in the freezing, low-temperature storage and thawing of stem cells for cellular therapies. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, Basel, v. 46, n. 3, p. 134-150, 2019.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; MASSIRONI, S. M. G.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; CERRUTI, H. F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 184, n. 3-4, p. 105-116, 2006.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M. A.; CADENAS, R.; JONES, J.; VARGAS, A.; MARTINEZ-HERNANDEZ, F. J.; MORENO, J. M.; SORIA, B. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: the Iberian lynx bank as a model for other endangered species. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3-4 p. 347-361, 2009.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M. A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 227-233, 2014.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M. A.; SÁNCHEZ, Á.; MARTÍN, F.; SORIA, B. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 145-151, 2011.

LIEKENS, S.; SCHOLS, D.; HATSE, S. CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization. **Current Pharmaceutical Design**, Saif Zone, v. 16, n. 35, p. 3903-3920, 2010.

MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MOTA, L. S. L. S.; ASSIS GOLIM, M.; LAUFER-AMORIM, R.; DE VITA, B.; BARBERINI, D. J.; LISTONI, A. J.; DE MORAES, C. N.; HECKLER, M. C. T.; AMORIM, R. M. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 76, n. 6, p. 618-624, 2013.

MEYERS, A.; WEISKITTEL, T. M.; DALHAIMER, P. Lipid droplets: formation to breakdown. **Lipids**, Champaign, v. 52, n. 6, p. 465-475, 2017.

MILLS, C. D. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 6, p. 212, 2015.

MOON, M. H.; KIM, S. Y.; KIM, Y. J.; KIM, S. J.; LEE, J. B.; BAE, Y. C.; SUNG, S. M.; JUNG, J. S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Düsseldorf, v. 17, n. 5-6, p. 279-290, 2006.

MORO, L. N.; HIRIART, M. I.; BUEMO, C.; JARAZO, J.; SESTELO, A.; VERAGUAS D.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, L.; SALAMONE, D. F. Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves in vitro development but not pluripotent gene expression. **Reproduction**, Bristol, v. 150, n. 1, p. 1-10, 2015.

MORONI, L.; FORNASARI, P M. Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 228, n. 4, p. 680-687, 2013.

NIPPON GENETICS. **Bambanker Cryopreservation Media**. Düren: Nippon Genetics, 2022. Disponível em: <<https://www.nippongenetics.eu/n/products/cell-biology/freezing-media/for-al-cell-lines/bambanker>>. Acesso em: 3 jan. 2022.

OKUMURA, N.; KAGAMI, T.; KADOYA, S.; SATO, M.; KOIZUMI, N. Feasibility of a cryopreservation of cultured human corneal endothelial cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 14, n. 6, p. e0218431, 2019.

OLIVEIRA, L. R. M.; PRAXEDES, E. A.; SILVA, M. B.; SANTOS, M. V. O.;

BORGES, A. A.; SILVA, H. V. R.; PEREIRA, A. F. Conservação de células somáticas derivadas de onça-pintada (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) usando diferentes combinações de crioprotetores. *In: CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL*, 9., 2018, Belém, PA. **Anais [...]**. Belém: CONERA, 2018.

PARK, S.; LEE, D. R.; NAM, J. S.; AHN, C. W.; KIM, H. Fetal bovine serum-free cryopreservation methods for clinical banking of human adipose-derived stem cells. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 81, p. 65-73, 2018.

PASQUINELLI, G.; TAZZARI, P.; RICCI, F.; VASELLI, C.; BUZZI, M.; CONTE, R.; LUCARELLI, E. Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. **Ultrastructural Pathology**, New York, v. 31, n. 1, p. 23-31, 2007.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2002-2009, 2001.

QUEIROZ NETA, L. B.; OLIVEIRA LIRA, G. P.; BORGES, A. A.; OLIVEIRA SANTOS, M. V.; SILVA, M. B.; OLIVEIRA, L. R. M.; PEREIRA, A. F. Influence of storage time and nutrient medium on recovery of fibroblast-like cells from refrigerated collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) skin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**. Animal, Columbia, p.1-10, 2018.

REFSEQ: NCBI Reference Sequence Database. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US), 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

ROY, S.; ARORA, S.; KUMARI, P.; TA, M. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 467-472, 2014.

SANTOS, T. R. M.; SILVA, A. C. G.; CARVALHO, F. S.; SANZ, G.; VAZ, B. G.;

LIÃO, L. M.; VALADARES, M. C. Toxicopharmacological evaluations of the small-molecule LQFM166: inducer of apoptosis and MDM2 antagonist. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 293, p. 20-27, 2018.

SARGENT B. The use of animal serum in the clinical translation of hMSCs. **Blog Post**, 2016 Feb 18. Disponível em: <https://cellculturedish.com/the-use-of-animal-serum-in-the-clinical-translation-of-hmscs/>. Acesso em: 2 Mar. 2022.

SAS INSTITUTE INC. The GLM Procedure. *In*: SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user's Guide 14.1**. Cary: SAS Institute Inc, 2015a. p. 1465-1636

SAS INSTITUTE INC. The MIXED procedure. *In*: SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user's Guide 14.1**. Cary: SAS Institute Inc, 2015b. p. 6048-6241.

SAS INSTITUTE INC. The UNIVARIATE procedure. *In*: SAS INSTITUTE INC. **Base SAS 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures** 6. ed. Cary: SAS Institute Inc, 2016. p. 287-551

SIGMA-ALDRICH. **ITS Liquid Media Supplement (100x) - liquid, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture**. Saint Louis: Sigma-Aldrich, 2022. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/i3146>. Acesso em: 2 Mar. 2022.

SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILVA, A. M.; PEREIRA, A. F.; SILVA, A. R. Criopreservação e cultivo de tecido testicular como ferramenta na conservação de mamíferos silvestres. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 43, n. 2, p. 229-234, 2019.

SILVA, M. A.; BEZERRA, L. G. P.; PRAXEDES, E. C. G.; MOREIRA, S. S. J.; SOUZA, C. M. P.; OLIVEIRA, M. F.; PEREIRA, A. F.; COMIZZOLI, P.; SILVA, A. R. Combination of intracellular cryoprotectants preserves the structure and the

cells proliferative capacity potential of adult collared peccary testicular tissue subjected to solid surface vitrification. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 91, p. 53-60, 2019.

SUBRAMANIAN, J.; AULAKH, R. P.; GREWAL, P. S.; SANFORD, M.; PYNNE, A. F.; YUK, I. H. Short-and long-term effects on mAb-producing CHO cell lines after cryopreservation. **Biotechnology Progress**, New York, v. 34, p. 463-477, 2018.

SUDANO, M. J.; RASCADO, T. D.; TATA, A.; BELAZ, K. R.; SANTOS, V. G.; VALENTE, R. S.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, Stoneham, v. 86, n. 2, p. 472-484, 2016.

TAGAMI, M.; ICHINOSE, S.; YAMAGATA, K.; FUJINO, H.; SHOJI, S.; HIRAOKA, M.; KAWANO, S. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 312, n. 1, p. 31-40, 2003.

ZHOU, H.; JIN, Z.; LIU, J.; YU, S.; CUI, Q.; YI, D. Mesenchymal stem cells might be used to induce tolerance in heart transplantation. **Medical Hypotheses**, New York, v. 70, n. 4, p. 785-787, 2008.

ZHU, S. F.; ZHONG, Z. N.; FU, X. F.; PENG, D. X.; LU, G. H.; LI, W. H.; XU, H.-Y.; HU, H.-B.; HE, J.-M.; SU, W.-Y.; HE, Y. L. Comparison of cell proliferation, apoptosis, cellular morphology and ultrastructure between human umbilical cord and placenta-derived mesenchymal stem cells. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 541, p. 77-82, 2013.