

VALÉRIA PALIALOGO

**VIABILIDADE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE EQUINOS
EM DIFERENTES MEIOS E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para obtenção
do grau de médico veterinário

Preceptor: Prof^a. Titular Dra. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu

2023

VALÉRIA PALIALOGO

**VIABILIDADE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
DE EQUINOS EM DIFERENTES MEIOS E CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,
SP, para obtenção do grau de médico veterinário

Área de Concentração: Cirurgia de Grandes Animais

Preceptor: Prof^a. Titular Dra. Ana Liz Garcia Alves

Coordenadora de Estágios: Prof^a Luciane dos Reis Mesquita

Botucatu

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Palialogo, Valeria.

Viabilidade de células tronco mesenquimais de equinos em diferentes meios e condições de armazenamento / Valeria Palialogo. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501070

1. Armazenamento. 2. Células-tronco. 3. Equino. 4. Sobrevivência celular.

Palavras-chave: Armazenamento; Células tronco; Equinos; Transporte; Viabilidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as benções que me deu durante toda a minha vida.

Aos meus pais, por terem me criado impecavelmente e me dado a chance de realizar meu sonho.

A minha esposa, Mariana Berchior Genaro, por ter sido meu porto seguro durante todas as dificuldades do último ano.

A Prof^a Ana Liz Garcia Alves, por ter sido, mais que uma orientadora, uma protetora.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio fornecido ao longo deste trabalho.

E em especial, ao meu pai. Jamais esquecerei tudo o que fez por mim. Darei tudo de mim para orgulhar sua memória.

PALIALOGO, VALÉRIA. *Viabilidade de células tronco mesenquimais em diferentes meios e condições de armazenamento*. Botucatu, 2023. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Cirurgia de Grandes Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

As células-tronco têm demonstrado grande importância na medicina veterinária por seu potencial terapêutico, inclusive no uso em equinos. Atualmente diversas terapias com células-tronco mesenquimais para animais estão sendo desenvolvidas e algumas, como o tratamento de tendinopatias, já entraram com sucesso no mercado. Como as formas de transporte existentes não são ideais, por vezes é necessário fazer a ressuspensão das células em meio alternativo antes de se fazer o uso clínico. Esta etapa adicional de manuseio na clínica pode ser perigosa para a sobrevivência celular e infecção iatrogênica e, portanto, um protocolo para períodos de transporte superiores a 24 horas requer otimização adicional. Para tanto, visando eleger o meio de conservação mais adequado para transporte a longas distâncias, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade celular de células tronco mesenquimais de origem de tecido adiposo em diferentes meios e condições de

armazenamento por até cinco dias. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, tendo sido feita a comparação entre os grupos e os momentos. Após avaliar e discutir todos os dados, foi possível observar resultados notáveis na porcentagem de células vivas numa média de 24 horas, o que abriu possibilidades de novas avaliações e obtenção de diferentes protocolos de pesquisa futuramente.

Palavras chave: Célula tronco, equinos, armazenamento, transporte, viabilidade celular

PALIALOGO, VALÉRIA. Viability of mesenchymal stem cells in different media and storage conditions. Botucatu, 2023. Graduation thesis (Veterinary Medicine, Concentration Area: Large Animal Surgery) - Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, Botucatu Campus, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

Stem cells have shown great importance in veterinary medicine due to their therapeutic potential, including their use in horses. Currently, various mesenchymal stem cell therapies for animals are being developed and some, such as the treatment of tendinopathies, have already successfully entered the market. As the existing forms of transportation are not ideal, it is sometimes necessary to resuspend the cells in an alternative medium before clinical use. This additional handling step in the clinic can be dangerous for cell survival and iatrogenic infection and, therefore, a protocol for transport periods longer than 24 hours requires additional optimization. For this purpose, choose the most suitable preservation medium for long-distance transportation, the aim of this study was to evaluate the cell viability of mesenchymal stem cells from adipose tissue in different media and storage conditions for up to five days. The data was subjected to the normality test and a comparison was made between groups and time points. After evaluating and discussing all the data, it was possible to observe remarkable results in the percentage of live cells at an average of 24 hours, which opened possibilities for further evaluations and obtaining different research protocols in the future.

Key words: Stem cell, horses, storage, transportation, cell viability

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11

5. CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco têm demonstrado grande importância na medicina veterinária por seu potencial terapêutico, inclusive em equinos. Atualmente diversas terapias com células-tronco mesenquimais (CTM) para animais estão sendo desenvolvidas e algumas, como o tratamento de tendinopatias, já entraram com sucesso no mercado (RIBITSCH et al., 2010).

Entretanto, a correta manipulação das células-tronco e o domínio das terapias baseadas em CTM para doenças específicas exige um conhecimento particular dos procedimentos laboratoriais, que não só garantam a produção contínua de células, mas também lhes proporcionem uma identidade e integridade o mais próximo possível de sua origem (RENZI et al., 2012).

Assim, estudos futuros com diferentes meios de preservação de CTM devem ser realizados para melhor compreender seus efeitos sobre as características fenotípicas das CTM durante seu transporte e armazenamento, assim como em sua aplicação (ESPINA et. al., 2016).

Para tanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade celular de células tronco mesenquimais de origem adiposa em diferentes meios e condições de armazenamento por até cinco dias, visando eleger o meio de conservação mais adequado para transporte de CTM.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos anos o tecido adiposo adulto foi reconhecido como uma fonte alternativa, acessível e rica de CTMs.

Assim como a medula óssea, tem origem no mesoderma embrionário, e possui um estroma que pode ser facilmente isolado através de lipoaspiração, formado por células endoteliais, células de músculo liso e adipócitos (JANZ, 2018).

A criopreservação é muito útil no armazenamento das CTM, permitindo a manutenção de linhagens celulares específicas. Embora não afete a morfologia, a expressão dos marcadores de superfície, a diferenciação ou o potencial de proliferação de CTM da medula óssea, a criopreservação pode, ainda, causar alterações nas funções das CTM, justificando futuras investigações sobre a recuperação das células pós-descongelamento seguido pela expansão das células funcionais para atingir seu potencial terapêutico completo com o mínimo de dano possível (CURTIS et al., 2015).

O DMSO é o crioprotetor de eleição, porém alguns trabalhos afirmam que ele pode induzir a diferenciação das células tronco em células neuronais, além de apresentar alta toxicidade em temperatura ambiente (UBIRAJARA et al., 2015).

Como as formas de transporte de CTM existentes não são ideais, por vezes é necessário transportá-las congeladas e realizar a ressuspensão das células em meio alternativo antes de se fazer o uso clínico. Esta etapa adicional de manuseio na clínica pode ser perigosa para a sobrevivência celular e pode levar a infecções iatrogênicas e, portanto, um protocolo para períodos de transporte superiores a 24 horas requer otimização adicional (GARVICAN et al., 2014).

Por outro lado, existem estudos otimistas sobre diferentes formas de melhorar a conservação das células mesenquimais, mas que necessitam de aprofundamento.

Ye e colaboradores (2020) também demonstraram a exequibilidade do transporte de células tronco embrionárias de ratos a temperatura ambiente, com preservação de sua pluripotência e capacidade de expansão clonal. No entanto, o desejo de minimizar a introdução de proteínas ou patógenos bovinos xenogênicos e de padronizar produtos celulares destinados à aplicação clínica tem conduzido à avaliação de alternativas ao SFB (PEZZANITE et al., 2021), de modo a excluir quaisquer componentes capazes de gerar uma resposta imune após a administração das CTM.

Como a inflamação ativa a função imunorreguladora das MSC, o ambiente pró-inflamatório pode melhorar a eficácia das MSC, no entanto, moléculas inflamatórias presentes no líquido sinovial ou adicionadas ao meio de cultura podem ter efeitos deletérios nas CTMs (BARRACHINA et al., 2017).

Neste mesmo estudo acima, observou-se que o ambiente sinovial inflamatório é bem tolerado pelas eBM-MSCs, enquanto o priming de citocinas afeta negativamente a viabilidade e a capacidade de diferenciação das eBM-MSCs, o que pode limitar sua eficácia in vivo (BARRACHINA et al., 2017).

2.1 Meios de Cultura Utilizados

O soro fetal bovino (FBS) é o suplemento de crescimento mais amplamente usado em meios de cultura celular devido ao seu alto teor de fatores promotores do crescimento embrionário.

Quando usado em concentrações adequadas, ele fornece muitos componentes definidos e indefinidos que demonstraram suprir os requisitos metabólicos específicos para o cultivo de células. O FBS é uma mistura complexa de biomoléculas que inclui fatores de crescimento, proteínas, elementos-traço, vitaminas e hormônios (MERCK). Estes são importantes para o crescimento e a manutenção de células in vivo e em cultura. Por ser um produto de origem animal, está sujeito a presença de agentes patogênicos naturais, o que constitui fonte potencial de contaminação para todos os produtos que o utilizam como matéria prima e colocam em dúvida a credibilidade dos mesmos (DOS SANTOS, 2015).

De acordo com Mitchel e colaboradores (2015), a criopreservação de células-tronco mesenquimais equinas em 95% de soro autólogo e 5% de DMSO não altera o crescimento ou morfologia pós-descongelamento in vitro em comparação com soro fetal bovino ou soro alogênico a 20 ou 95% e DMSO a 10 ou 5%.

O lisado plaquetário é um concentrado de plaquetas obtido por meio de uma metodologia simples, com boa relação custo-benefício para obter altas concentrações de fatores de crescimento a partir das plaquetas, que possuem propriedades regenerativas, com ação sobre a angiogênese, proliferação e migração celular. A associação de PRP e células-tronco tem sido cada vez mais empregada em lesões ósseas, ligamentares e tendíneas de forma a obter-se regeneração celular em tais lesões(LOUZADA, 2018).

O alginato é um biomaterial amplamente utilizado nas áreas de odontologia, farmácia e indústria de alimentos, e vem sendo estudado também devido às suas potenciais aplicações em medicina regenerativa. Trata-se de um polímero natural obtido de diversas espécies de algas. Sob condições ideais de pH, é capaz de possuir propriedades semelhantes à matriz extracelular (ALBRECHT, 2017).

O soro autólogo é o produto final produzido a partir do sangue total doado pelo próprio animal. Nesse processo, o sangue é submetido ao processamento em sistema fechado para separação física das suas frações, das quais se obtém a matéria prima, o soro (CRFMG).

No soro alogênico, assim como no soro autólogo, o sangue é submetido ao processamento em sistema fechado para separação física das suas frações, das quais se obtém o soro, porém o sangue provém de outro animal, o que pode facilitar a produção das células tronco para um animal que poderá estar em um lugar muito distante do seu local de fabricação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido conforme as diretrizes do Comitê de Ética e Utilização Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob o protocolo nº0117/2021.

3.1 Meios de Armazenamento

Os meios de cultivo utilizados no estudo foram o soro bovino fetal (PBS), alginato, lisado plaquetário, soro autólogo e soro alogênico. Os pHs de todos os meios foram equilibrados antes de entrarem em contato com as células, afim de evitar qualquer deterioração das mesmas.

3.2 Células-Tronco Mesenquimais

Foram utilizadas aproximadamente 9 milhões de células de origem adiposa ao todo. Por Ependorf, foram utilizadas 300 mil células. Os testes foram repetidos com três animais distintos e em triplicata para comparação dos resultados, e suas células já estavam congeladas no banco de células do laboratório de Terapia Regenerativa da FMVZ – Unesp - Botucatu.

3.3 Cultivo

As células foram descongeladas e expandidas em DMEN F-12 na estufa à 37°C inicialmente em garrafas de 25 cm² e após adquirirem 90% de confluência, foram transferidas para garrafas de cultivo de 75 cm² e depois, para garrafas de 175 cm² até alcançar em torno de 9 milhões de células. O monitoramento das células foi realizado diariamente em microscopia óptica para observação da morfologia, confluência e possível contaminação.

Ao atingir 90% de confluência, eram realizadas as passagens, onde as células foram liberadas do recipiente utilizando tripsina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MI, EUA) e divididas em outras garrafas de 75 cm² contendo DMEN + 10% SFB

Posteriormente, o equivalente a 300 mil células foram dispostas em cada Ependorf com 0,5 mL de cada meio de armazenamento diferente, em triplicata, e mantidas em diferentes temperaturas: 20° C – temperatura ambiente; 4° C – temperatura de geladeira e -20° C – meio congelado.

3.4 Tempo de Armazenamento

As consequências na viabilidade das células nas diferentes horas de armazenamento, em cada meio e em cada temperatura foram avaliadas em 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas.

3.5 Avaliação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada imediatamente após as células serem retiradas do congelador ou da geladeira. A contagem foi realizada pelo método de exclusão de células mortas por coloração de azul de Tripan a 0,4% (FRESHNEY, 2000) na câmara de Neubauer para verificar a quantidade de AdCTM'S que sobreviveram.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e foi feita a comparação em triplicata de cada meio, momento e temperatura, além comparação entre os grupos e os momentos. A significância foi considerada quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da Porcentagem de Células Vivas em Cada Grupo e Momento à 20°C e 4°C.

Tabela 1 – Porcentagem média de células vivas a 20°C. Botucatu, 2022.

20°C	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
PBS	75%	68%	49%	50%	47%	54%	43%	38%	13%
LP	88%	91%	87%	79%	72%	55%	44%	36%	33%
ALG	67%	65%	52%	62%	54%	56%	49%	22%	5%
SAU	85%	86%	82%	75%	71%	59%	50%	39%	32%
SAL	81%	85%	84%	77%	66%	55%	43%	32%	29%

Legenda: PBS - Soro Bovino Fetal; LP - Lisado Plaquetário; ALG - Alginato; SAU - Soro Autólogo; SAL - Soro Alogênico.

Tabela 2 - Porcentagem média de células vivas a 4°C. Botucatu, 2022.

4°C	2h	4h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
PBS	61%	71%	61%	48%	47%	33%	25%	17%	2%
LP	83%	85%	82%	71%	79%	57%	44%	39%	17%
ALG	66%	73%	60%	66%	56%	33%	25%	12%	23%
SAU	78%	71%	76%	67%	72%	58%	43%	44%	28%
SAL	77%	77%	67%	64%	76%	48%	26%	34%	29%

Legenda: PBS - Soro Bovino Fetal; LP - Lisado Plaquetário; ALG - Alginato; SAU - Soro Autólogo; SAL - Soro Alogênico.

O Lisado Plaquetário teve um desempenho de mais de 75% de células vivas entre 6 a 24 horas, tanto à 20°C quanto à 4°C, demonstrando ter os melhores resultados dentro dos grupos avaliados, como é possível observar nos gráficos (figura 3 e 4). É notável principalmente a 4°C, onde a viabilidade se sobressaiu visivelmente em relação aos outros meios de armazenamento.

O soro autólogo apresentou um excelente desempenho no animal 1, tendo chegado a 96 horas à 4 °C com 79% das células vivas e a 48 horas à 20°C com 80% das células vivas. Porém esse resultado se mostrou diferente nos outros dois animais, onde podemos, ainda assim, observar que a média se manteve alta de 6 à 24 horas tanto à 20°C quanto à 4°C.

No soro alogênico avaliou-se que pela média dos 3 animais, o mínimo de 75% de células vivas se manteve de 12 até 24 horas à 4°C e à 20°C.

Em relação ao Alginato, esse grupo teve um bom resultado no animal 1, onde 86% das células se encontravam vivas em 12 horas à 4°C. Nos outros animais avaliados o meio não atingiu o mínimo de 75% de células vivas desde as primeiras 2 horas observadas.

Nota-se que em 20°C e em 4°C o grupo do PBS não apresentou um bom desempenho, tendo mais de 75% de células vivas até no máximo 6 horas.

4.2 Resultados do Teste de Normalidade da Porcentagem de Células Vivas em Cada Grupo e Momento à 20°C e 4°C.

Tabela 3 - Teste de normalidade da porcentagem média obtida a 4°C. Botucatu, 2022.

T4°C	PBS	LP	ALG	SAL	SAUT	P
M2	0.613 ab	0.837 ab	0.667 ab	0.773 a	0.783 a	0.551
M4	0.710 a	0.857 a	0.730 a	0.710 ab	0.773 a	0.794
M6	0.617 ab	0.820 ab	0.607 ab	0.673 abc	0.760 a	0.65
M12	0.480 abc	0.717 abc	0.667 ab	0.643 abc	0.673 ab	0.532
M24	0.470 abc	0.793 ab	0.563 abc	0.767 a	0.723 ab	0.394
M48	0.333 bc	0.570 bcde	0.337 bcd	0.480 abc	0.587 ab	0.438
M72	0.253 c	0.443 cde	0.250 cd	0.267 c	0.437 ab	0.629
M96	0.173 c	0.393 de	0.123 b	0.347 abc	0.443 ab	0.498
M120	0.0200 c	0.177 e	0.237 cd	0.290 bc	0.283 b	0.708
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.006	

Legenda: Letras maiúsculas se referem a diferença estatística nas linhas horizontais e as letras minúsculas se referem as diferenças estatísticas nas linhas verticais.

A tabela acima demonstra que, em relação a comparação de grupos num mesmo momento a temperatura de 4°C, não houve significância de nenhum meio de armazenamento em nenhuma das horas avaliadas e que, com o tempo, todos os grupos resultaram no decaimento da viabilidade celular.

Tabela 4 - Teste de normalidade da porcentagem média obtida a 20°C. Botucatu, 2022.

T20°C	PBS	LP	ALG	SAL	SAUT	P
M2	0.747 a	0.887 a	0.67 a	0.81 a	0.85 a	0.628
M4	0.687 AB	0.913 Aa	0.65 Ba	0.853 ABa	0.867 ABa	0.025
M6	0.497 Bab	0.873 Aa	0.523 ABab	0.847 ABa	0.823 ABab	0.012
M12	0.5 ab	0.793 a	0.62 ab	0.773 a	0.747 abc	0.157
M24	0.477 ab	0.723 ab	0.543 ab	0.667 ab	0.713 abc	0.658
M48	0.543 ab	0.557 bc	0.563 ab	0.557 abc	0.597 bcd	0.998
M72	0.437 ab	0.443 bc	0.493 ab	0.430 bc	0.507 cde	0.995
M96	0.383 ab	0.367 c	0.223 ab	0.320 c	0.393 de	0.929

M120	0,137 b	0.330 c	0.0567 b	0.293 c	0.323 e	0.386
P	0.017	<0.001	0.007	<0.001	<0.001	

Legenda: Letras maiúsculas se referem a diferença estatística nas linhas horizontais e as letras minúsculas se referem as diferenças estatísticas nas linhas verticais.

A tabela acima demonstra que, em relação a comparação de grupos num mesmo momento a temperatura de 20°C, houve significância estatística nos momentos 4 horas e 6 horas onde os grupos do lisado plaquetário, soro autólogo e soro alogênico se sobressaíram com relação aos demais. Também é possível observar que, com o tempo, todos os grupos resultaram na diminuição da viabilidade celular.

4.3 Comparação de Desempenho das Células à temperatura ambiente 20°C e a refrigeração 4°C.

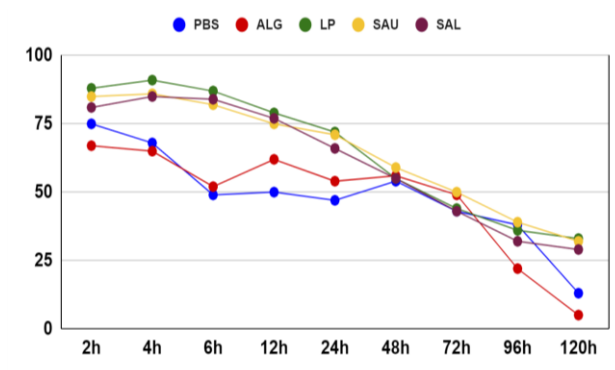


Figura 1 - Desempenho em porcentagem das células nos diferentes meios de armazenamento à 20°C. Botucatu, 2022.

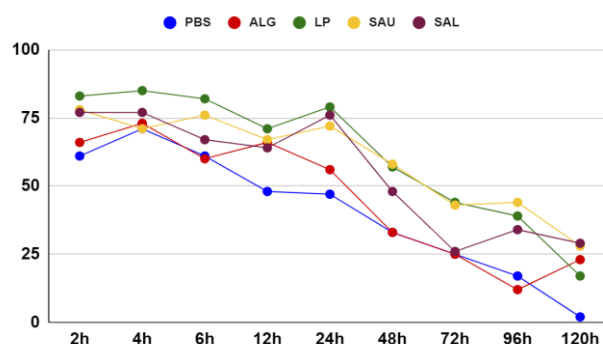


Figura 2 - Desempenho em porcentagem das células nos diferentes meios de armazenamento à 4°C. Botucatu, 2022.

As células armazenadas a -20°C apresentaram uma queda brusca de viabilidade rapidamente. Em menos de 6 horas de congelamento a viabilidade em todos os diferentes meios chegou a 0%. Portanto, os resultados a -20°C não foram comparados com os demais.

4.4 Discussão

Uma observação geral dos dados apresentados permite afirmar que o lisado plaquetário, o soro autólogo e o soro alogênico possibilitaram que as células se mantivessem vivas a uma média de 75% até 24 horas de armazenamento, nas duas temperaturas observadas, sendo então considerados os melhores meios de transporte e armazenamento até então avaliados.

É possível pontuar os resultados do lisado plaquetário, que demonstraram ter os melhores resultados dentro dos grupos avaliados, sendo notável principalmente a 4°C, onde a viabilidade se sobressaiu visivelmente em relação aos outros meios de armazenamento. Assim como o excelente desempenho do soro autólogo no animal 1, tendo chegado a 96 horas à 4 °C com 79% das células vivas e a 48 horas à 20°C com 80% das células vivas, o que abre a possibilidade de novas avaliações futuras a fim de obter resultados mais precisos.

Esses resultados possivelmente se devem ao fato de que, o soro alogênico, soro autólogo e lisado plaquetário possuem diversos fatores de crescimento, que auxiliaram as células a se manterem vivas por mais tempo por terem um meio de nutrição mais adequado.

Como foi relatado por Louzada (2018), o lisado plaquetário possui altas concentrações de fatores de crescimento a partir das plaquetas, que possuem propriedades regenerativas, com ação sobre a angiogênese, proliferação e migração celular.

O soro autólogo foi descrito não somente como lubrificante na superfície ocular, mas também como fornecedor de diversas substâncias essenciais para a reconstrução dos danos epiteliais, incluindo vitamina A, fator de crescimento epitelial, fibronectina e uma variedade de citocinas. (RIBEIRO, et al., 2017)

Com relação a comparação das células à 20°C e à 4°C, chegou-se a conclusão que a porcentagem de células vivas nos grupos do lisado plaquetário, soro autólogo e soro alogênico se manteve relativamente semelhante tanto a 20°C quanto a 4°C, enquanto os grupos do alginato e PBS mantiveram a viabilidade das células por mais tempo a 4°C.

A viabilidade das células que estavam nos grupos do alginato e PBS decaiu mais rapidamente do que os demais grupos, porém esse resultado pode ter sido retardado a 4°C devido a baixa temperatura que manteve as células inalteradas por mais tempo, em comparação a temperatura ambiente de 20°C.

Na avaliação do teste de normalidade foi possível observar que houve uma diferença significativa a 20°C nos momentos 4 horas e 6 horas onde o grupo do lisado plaquetário, soro autólogo e soro alogênico se sobressaiu com relação aos demais grupos. No demais, não houve diferença significativa nos demais grupos e momentos que seja relevante ao teste.

Visto que, num estudo foi possível observar que a maior viabilidade de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea autólogas de 70,6% dentro da faixa positiva, foi observada em sobrenadante de medula óssea à 4°C em 2 h (ESPINA et al., 2016), estes resultados abrem possibilidades de novas avaliações e obtenção de diferentes protocolos de pesquisa, a fim de concentrar-se nos meios com melhor desempenho, e utilizar uma maior quantidade amostral para melhorar a comparação de dados futuramente.

As células não conseguiram sobreviver a -20°C sem a introdução de um crioprotetor, visto que, o congelamento lesiona a estrutura celular tornando-as inviáveis rapidamente.

A formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação é um evento importante e é a principal causa de destruição celular e retardo na recuperação medular após infusão das células descongeladas. (MASSUMOTO et al., 1997)

O soro bovino fetal (PBS) e o alginato não demonstraram ser bons meios de armazenamento, pois a viabilidade celular decaiu rapidamente em todos os testes realizados.

O alginato é um carboidrato, que em comparação ao PBS consegue nutrir minimamente as células armazenadas, porém não tão adequadamente quanto o necessário para que elas mantenham a sua viabilidade por muito mais tempo do que o observado.

Os resultados se mostraram distintos aos resultados do estudo de Pezanitte e colaboradores sobre o impacto do soro autólogo, soro alogênico e PBS nas propriedades funcionais de células estromais mesenquimais equinas, onde foi observado que quando analisado via contagem automatizada de células, havia um número significativamente maior de células em cultura às 48 e 72 h em meio PBS em comparação com autólogo e soro equino alogênico ($p < 0,001$ para todos).

5. CONCLUSÃO

Após avaliar e discutir todos os dados, foi possível obter resultados parciais sobre os referidos meios de condicionamento das AdCTM's avaliados que se mostraram promissores.

Na avaliação do soro autólogo; soro alogênico e lisado plaquetário, foi possível observar resultados notáveis com 75% de células vivas numa média de 24 horas, à temperatura ambiente de 20°C e à refrigeração a 4°C, o que abriu possibilidades de novas avaliações e obtenção de diferentes protocolos de pesquisa futuramente.

No que se refere ao desempenho das células a -20°C, a não-introdução de crioprotetor inviabilizou o armazenamento e transporte nesta temperatura.

O soro fetal bovino (PBS) e o alginato, não demonstraram ser promissores durante o estudo, tendo um baixo desempenho desde as primeiras horas avaliadas nos três animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Maia L, Dias MC, de Moraes CN, de Paula Freitas-Dell'Aqua C, da Mota LS, Santiloni V, da Cruz Landim-Alvarenga F. **Conditioned medium: a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells.** Cell Biol Int. 2017 Mar;41(3):239-248. doi: 10.1002/cbin.10708. Epub 2017 Feb 2. PMID: 27888544.

Norkus M, Kilmartin L, Fay D, Murphy MJ, Olaighin G, Barry F. **The effect of temperature elevation on cryopreserved mesenchymal stem cells.** Cryo Letters. 2013 Jul-Aug;34(4):349-59. PMID: 23995402.

Pezzanite L, Chow L, Griffenhagen G, Dow S, Goodrich L. **Impact of Three Different Serum Sources on Functional Properties of Equine Mesenchymal Stromal Cells.** Front Vet Sci. 2021 Apr 30;8:634064. doi: 10.3389/fvets.2021.634064. PMID: 33996964; PMCID: PMC8119767.

Garvican, E.R., Cree, S., Bull, L. *et al.* **Viability of equine mesenchymal stem cells during transport and implantation.** *Stem Cell Res Ther* 5, 1 (2014).

Bahsoun S, Coopman K, Akam EC. **The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review.** J Transl Med. 2019 Nov 29;17(1):397. doi: 10.1186/s12967-019-02136-7. PMID: 31783866; PMCID: PMC6883667.

Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. **Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects.** Cryobiology. 2015 Oct;71(2):181-97. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.07.003. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26186998.

Renzi S, Lombardo T, Dotti S, Dessì SS, De Blasio P, Ferrari M. **Mesenchymal stromal cell cryopreservation.** Biopreserv Biobank. 2012 Jun;10(3):276-81. doi: 10.1089/bio.2012.0005. PMID: 24835066.

Ribitsch I, Burk J, Delling U, Geißler C, Gittel C, Jülke H, Brehm W. **Basic science and clinical application of stem cells in veterinary medicine.** Adv Biochem Eng Biotechnol. 2010;123:219-63. doi: 10.1007/10_2010_66. PMID: 20309674.

Al Naem M, Bourebaba L, Kucharczyk K, Röcken M, Marycz K. **Therapeutic mesenchymal stromal stem cells: Isolation, characterization and role in equine regenerative medicine and metabolic disorders.** Stem Cell Rev Rep. 2020 Apr;16(2):301-322. doi: 10.1007/s12015-019-09932-0. PMID: 31797146.

Gugjoo MB, Amarpal, Makhdoomi DM, Sharma GT. **Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential Therapeutic Applications.** J Equine Vet Sci. 2019 Jan;72:16-27. doi: 10.1016/j.jevs.2018.10.007. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30929778.

Seok Heo, Han-Soo Kim, Youjeong Choi, Hyun Ok Kim. **Duration of *in vitro* storage affects the key stem cell features of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for clinical transplantation.** Original paper mesenchymal stromal cell. Jan 2013. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.10.015>.

Mitchell, A., Rivas, K.A., Smith, R. *et al.* **Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95 % autologous serum and 5 % DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95 % and DMSO at 10 or 5 %.** *Stem Cell Res Ther* 6, 231 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0230-y>

Barrachina L., Remacha A.R., Romero A., et al. **Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implications in intra-articular treatments.** J Vet Sci. 2017;18(1):39–49. - PMC

Espina M., Jülke H., Brehm W., Ribitsch I., Winter K., Delling U. **Evaluation of Transport Conditions for Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Therapeutic Application in Horses.** *PeerJ*. 2016;4:e1773. doi: 10.7717/peerj.1773.

Dos Santos N C. **Detecção do vírus da diarreia bovina a vírus (BVDV) em soros fetais bovinos (SFB) comerciais utilizados em culturas celulares**, 2017. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Plataforma Sucupira.

Louzada J G., **Plasma rico em plaquetas em equinos: obtenção e efeito sobre a proliferação de células tronco mesenquimais in vitro**, 2018. UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO - INSTITUTO DE VETERINÁRIA.

Albrecht C A., **Avaliação in vitro do comportamento de células tronco mesenquimais em scaffolds contendo diferentes concentrações de alginato e cloreto de cálcio como estratégia em medicina regenerativa**. 2017. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul - Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

Janz F L., **Células tronco mesenquimais: definição, características e principais fontes de obtenção**, 2018. Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo (FFLCH-USP).

Ribeiro, M. V. M. R., Melo, V. F. de ., Barbosa, M. E. F. C., Tozzi, M. U. de F., Ramos, M. S. B., Gaia, N. M. S. R. S., Santos, V. M. G., Neri, W. de O., Barbosa, F. T., & Ribeiro, Ê. A. N.. (2017). **O uso do concentrado de plaquetas na oftalmologia: uma revisão de literatura**. Revista Brasileira De Oftalmologia, 76(6), 319–324. <https://doi.org/10.5935/0034-7280.20170067>

C.M. Massumoto, S. Mizukami, M.F. Campos, L.A.G. Silva, A. Mendrone Jr., A. Sakashita, E. Zambon, M. Ostronoff, M.C. A. Macedo, R. Medeiros, P. Dorlhiac, D. Chamone, F. Dulley., **Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos**. 1997. Departamento de Transplante de Medula Óssea da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP. Rev Ass Med Brasil; 43(2): 93-8