

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MELINE DE PAULA COUTINHO

**Estudo comparativo de proliferação e viabilidade celular pós
criopreservação em células-tronco mesenquimais, obtidas do
epitélio olfatório, tecido adiposo e âmnio de fetos caninos em terço
final de gestação.**

Pirassununga
2023

MELINE DE PAULA COUTINHO

**Estudo comparativo de proliferação e viabilidade celular pós
criopreservação em células-tronco mesenquimais, obtidas do
epitélio olfatório, tecido adiposo e âmnio de fetos caninos em terço
final de gestação.**

(Versão corrigida)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

Pirassununga

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CB71e COUTINHO, MELINE DE PAULA COUTINHO
Estudo comparativo de proliferação e viabilidade
celular pós criopreservação em células-tronco
mesenquimais, obtidas do epitélio olfatório, tecido
adi / MELINE DE PAULA COUTINHO COUTINHO ;
orientadora Carlos Eduardo Ambrósio. --
Pirassununga, 2023.
73 f.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
1. Âmnio. 2. Tecido adiposo. 3. Epitélio
olfatório. 4. Células-tronco. 5. Criopreservação. I.
Ambrósio, Carlos Eduardo, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial desta documento, desde que citada a fonte - o autor



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Pirassununga, SP

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo - FZEA/USP

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo comparativo de células-tronco mesenquimais, obtidas do epitélio olfatório, tecido adiposo e âmnio de fetos caninos e produtos derivados do cultivo.", protocolada sob o CEUA nº 2725260721 (ID 001854), sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Ambrósio e equipe; Meline de Paula Coutinho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 13/04/2022.

We certify that the proposal "Comparative study of mesenchymal stem cells obtained from the olfactory epithelium, adipose tissue and amnion of canine fetuses and products derived from culture.", utilizing 3 Dogs (3 females), protocol number CEUA 2725260721 (ID 001854), under the responsibility of **Carlos Eduardo Ambrósio and team; Meline de Paula Coutinho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 04/13/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2021 a 08/2023 Área: Medicina Veterinária

Origem: Animais provenientes de doação espontânea

Espécie: Cães

sexo: Fêmeas

idade: 1 a 5 anos

Quantidade: 3

Linhagem: SRD

Peso: 5 a 30 kg

Pirassununga, 28 de agosto de 2023

Prof. Dra. Luciane Silva Martello
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Fabiana Fernandes Bressan
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP



AGRADECIMENTOS

Por ter me recebido e ter me orientado neste projeto, com dedicação e afinco, sou imensamente grata ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, muito obrigada professor.

À Dra. Luciana Cristina Machado, pela ajuda, apoio e café bem como a amizade e apoio em minha jornada.

À Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins, pelo apoio, conhecimento e por abrir portas para novos horizontes.

À Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan, por me auxiliar quando necessário.

Agradeço á toda a equipe do laboratório GDTI, principalmente ao Clésio pelo apoio.

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

Agradeço o amor e apoio recebido, por todos aqueles a quem acabei não citando e principalmente a quem me protege, e não dorme.

E mais do que nunca agradeço minha família, meus pais, meus heróis aos quais dedico mais um sonho e o encerramento desta etapa, meu pai Valdir e minha mãe Edna, aceitam partir para uma nova fase comigo? Amo vocês.

RESUMO

COUTINHO, M. P. **Estudo comparativo de proliferação e viabilidade celular pós criopreservação em células-tronco mesenquimais, obtidas do epitélio olfatório, tecido adiposo e âmnio de fetos caninos em terço final de gestação.** 2023. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

O uso de células-tronco em medicina humana e veterinária vem despertando grande interesse, devido ao elevado potencial apresentado por elas quanto à regeneração tecidual, reparo a órgãos lesionados, bem como no auxílio de tratamentos de patologias crônicas e degenerativas, como consequência destes parâmetros, estudos vem fomentando a aplicação terapêutica dentro da engenharia tecidual. Constituindo a classe de Células-Tronco (CT) encontram-se as células-tronco mesenquimais (CTMs), destacando-se quanto à variedade de fontes de obtenção e viabilidade em cultivo *in vitro*. As CTM apresentam relevância, na imunomodulação, na regeneração tecidual, e no tratamento de patologias com prognóstico atualmente desfavoráveis. Dentre as fontes de CTM, o tecido adiposo, âmnio e epitélio olfatório, vêm sendo amplamente estudadas. Visando as qualidades apresentadas pelas CTM, bem como potencial terapêutico demonstrado, estudos vem sendo embasados, em necessidades de expansão e armazenamento por períodos prolongados. Os criobancos surgem como uma alternativa para a manutenção da diversidade biológica, por meio da redução do metabolismo celular através da criopreservação, a qual permite o uso futuro em terapias, e análises subsequentes. Haja vista a necessidade de recuperação otimizada destas células pós descongelamento, objetivamos avaliar estas três fontes promissoras de CTMs, pós caracterização, em duas fases, estabelecendo assim um estudo comparativo. Na 1ª fase, sendo ela o cultivo celular, foi realizado a caracterização das células, enquanto na 2ª fase foram avaliadas a viabilidade celular e proliferação *in vitro*, quando utilizado o protocolo padrão de criopreservação, suplementado com soro fetal bovino e Dimetil-Sulfóxido (DMSO). As células foram criopreservadas e armazenadas pelo período de trinta dias em nitrogênio líquido.

A proliferação e a viabilidade celular foram analisadas através de curva de crescimento pós descongelamento em 24, 48 e 72 horas, e pelo teste de exclusão, por azul de Tripán e teste de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) nos mesmos intervalos. Inicialmente o cultivo das CTM de âmnio, tecido adiposo e epitélio olfatório, de fetos caninos em terço final de gestação (> 42 dias), foi estabelecido, onde as culturas apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico, heterogenicidade e proliferação, esta demonstrada pela curva de crescimento que se mostrou ascendente nas CTM's oriundas dos três tecidos, tendo as do âmnio atingido o pico na passagem de número 8 (P8), com proliferação até P13, as do epitélio olfatório apresentando proliferação até P10 com pico em P6 e as provenientes de tecido adiposo com pico em P8 e proliferação até P13. As CTMs dos três tecidos apresentaram potencial á diferenciação multilinhagens, sendo elas a adipogênica, osteogênica e condrogênica, quanto a imunofenotipagem por citometria de fluxo, os três tecidos analisados apresentaram marcação negativa para os marcadores hematopoiéticos CD 34 e CD 45, sendo < que 1% e marcação para o CD 90 e o CD 44, sendo as CTMs do âmnio de 14% e <1%, as do epitélio olfatório com 86,5% e 10% e as do tecido adiposo com 87,8% e 90,8% respectivamente. Na 2ª fase as células demonstraram pós descongelamento uma viabilidade superior a 70%, tanto nas provenientes do âmnio com 76,07%, o epitélio olfatório com 72,67% e o tecido adiposo com 93,78%. As curvas de crescimento, na análise de proliferação, se mostraram ascendentes nas células dos três tecidos, somente nas células do epitélio olfatório o grupo 1, das células criopreservadas recuperadas (Ccr) obteve maior proliferação quando comparado ao grupo controle, células não criopreservadas (Cnc). Quando analisada a atividade mitocondrial entre o grupo 1 e o grupo controle, houve diferença significativa ($P < 0,05$), com exceção das células do tecido adiposo no período de 48 e 72 horas que não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$). Quando comparada a viabilidade pela análise de atividade mitocondrial do grupo 1 em relação ao controle, as células provenientes do âmnio se mostraram com porcentagem inferior aos demais tecidos, sendo o epitélio olfatório sem diferenças significativas, porém com aumento da viabilidade no períodos de 48 horas e as células do tecido

adiposo as que apresentaram viabilidade superior ao grupo controle bem como ascendência na porcentagem ao longo dos períodos avaliados.

Palavras-chave: Âmnio. Tecido Adiposo. Epitélio olfatório. Celulas-tronco. Criopreservação

ABSTRACT

COUTINHO, M. P. **Comparative study of cell proliferation and viability after cryopreservation in mesenchymal stem cells, obtained from the olfactory epithelium, adipose tissue and amnion of canine fetuses in the final third of pregnancy.** 2023. Dissertation (Master's) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2023.

The use of stem cells in human and veterinary medicine has aroused great interest, due to the high potential presented by them in terms of tissue regeneration, repair of injured organs, as well as in aiding the treatment of chronic and degenerative pathologies, as a result of these parameters, studies have been promoting the therapeutic application within tissue engineering. Comprising the class of SC are mesenchymal stem cells (MSCs), standing out in terms of the variety of sources for obtaining and viability in in vitro culture. MSCs are relevant in immunomodulation, tissue regeneration, and in the treatment of pathologies with currently unfavorable prognosis. Among MSC sources, adipose tissue, amnion and olfactory epithelium have been widely studied. Aiming at the qualities presented by MSCs, as well as the demonstrated therapeutic potential, studies have been based on needs for expansion and storage for prolonged periods. Cryobanks emerge as an alternative for maintaining biological diversity, by reducing cell metabolism through cryopreservation, which allows future use in therapies and subsequent analysis. Given the need for optimized recovery of these cells after thawing, this research project aimed to evaluate the three promising sources of MSC, mentioned above, after characterization, in two phases, establishing a comparison. In the 1st phase, which is cell culture, the characterization of the cells was carried out, while in the 2nd phase cell viability and in vitro proliferation were evaluated, when the standard cryopreservation protocol was used, supplemented with fetal bovine serum and Dimethylsulfoxide (DMSO). The cells were cryopreserved and stored for a period of thirty days in liquid nitrogen. Cell proliferation and viability were analyzed by post-thawing growth curve at twenty-four, forty-eight and seventy-two hours, and by exclusion test, by trypan blue and Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) test in the same breaks. Initially, the cultivation of MSCs from amnion, adipose tissue and olfactory epithelium, from canine fetuses in the final third of gestation (> 42 days), was established, where the cultures showed fibroblastoid morphology and adherence to plastic, heterogeneity and proliferation

, is demonstrated by the growth curve that showed ascending in MSCs originating from the three tissues, with those from the amnion reaching a peak in passage number 8 (P8), with proliferation up to P13, those from the olfactory epithelium showing proliferation up to P10 with a peak in P6 and those from of adipose tissue with a peak at P8 and proliferation up to P13. The MSCs of the three tissues showed potential for multilineage differentiation, namely adipogenic, osteogenic and chondrogenic, regarding immunophenotyping by flow cytometry, the three tissues analyzed showed negative marking for hematopoietic markers CD 34 and CD 45, with < 1% and marking for CD 90 and CD 44, with amnion MSCs of 14% and <1%, olfactory epithelium MSCs with 86.5% and 10% and adipose tissue MSCs with 87.8% and 90.8 % respectively. In the 2nd phase, the cells showed a viability of over 70% after thawing, both in those originating from the amnion with 76.07%, the olfactory epithelium with 72.67% and the adipose tissue with 93.78%. The growth curves, in the proliferation analysis showed ascending in the cells of the three, only in the cells of the olfactory epithelium, group 1 of recovered cryopreserved cells (Ccr) obtained greater proliferation when compared to the control group, non-cryopreserved cells (Cnc). When analyzing mitochondrial activity between group 1 and the control group, there was a significant difference ($P < 0.05$), with the exception of adipose tissue cells in the 48 and 72 hour period that did not show significant differences ($P > 0.05$). When comparing the viability by analyzing the mitochondrial activity of group 1 in relation to the control, the cells from the amnion showed a lower percentage than the other tissues, with the olfactory epithelium without significant differences, but with an increase in viability in periods of 48 hours and the tissue cells. When comparing the viability by analyzing the mitochondrial activity of group 1 in relation to the control, the cells from the amnion showed a lower percentage than the other tissues, with the olfactory epithelium without significant differences, but with an increase in viability in the period of 48 hours and the cells of the fabric adipose the ones that presented viability superior to the control group as well as ascending in the percentage along the evaluated periods.

Keywords: Amnion. Adipose tissue. Olfactory epithelium. Stem cells. Criopreservation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plasticidade das células tronco CT.....	20
Figura 2- Etapas de preparação para a criopreservação.....	28
Figura 3- Sequência e temperaturas da fase de congelamento.....	29
Figura 4- Taxas de resfriamento e danos relacionados	30
Figura 5- Relação entre viabilidade máxima e taxa de resfriamento intermediária.....	30
Figura 6- Danos relacionados à criopreservação.....	31
Figura 7- Sequência de temperaturas e tempo da fase de descongelamento.....	32
Figura 8- Desenho experimental do projeto.....	35
Figura 9 - Coleta do âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo.....	46
Figura 10- Caracterização da idade gestacional.....	47
Figura 11- Cultura de células de âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo.....	47
Figura 12 - Curva de crescimento das células isoladas de âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo.....	48
Figura 13- Diferenciação <i>in vitro</i>	49
Figura 14- Análise de viabilidade das CTMs, células coradas e não coradas.....	53
Figura 15- Análise de viabilidade das CTMs pós descongelamento.....	54

Figura 16- Viabilidade das CTMs, relação entre viáveis e inviáveis.....	55
Figura 17- Avaliação da proliferação das CTMs <i>in vitro</i>	56
Figura 18- Atividade mitocondrial.....	57
Figura 19- Atividade da viabilidade mitocondrial do grupo 1 (Ccr) em comparação ao grupo controle (Cnc).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferenças entre as células-tronco embrionárias e adultas.....	22
Tabela 2- Modelo de Técnica de Crown-Rump	34
Tabela 3 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo das CTMs de tecido amniótico.....	36
Tabela 4 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo das CTMs de tecido adiposo.....	37
Tabela 5 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo das CTMs de epitélio olfatório.	38
Tabela 6 - Relação de anticorpos para análise imunofenotípica por citometria de fluxo...	39
Tabela 7 - Meio de cultivo inicial com base no tecido de origem celular.....	40
Tabela 8- Linhagem, períodos de cultivo de cultivo inicial, indução e métodos de coloração.....	40
Tabela 9 - Composição do meio de criopreservação.....	42
Tabela 10 – Passagens (P) trabalhadas em cada grupo e fase.....	43
Tabela 11 - Composição do meio de criopreservação de criopreservação.....	43
Tabela 12- Caracterização imunofenotípica das CTMs do âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo.....	51
Tabela 13- Avaliação da atividade mitocondrial.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

CT - Células-tronco

CTE- Células-tronco embrionárias

CTA- Células-tronco adultas

CTM- Células-tronco mesenquimais

CD- Grupamento de diferenciação

CTH- Células- tronco hematopoiéticas

EO- Epitélio olfatório

AMCs-Células amnióticas mesenquimais

ASCs- Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

EO-CTMs- Células-tronco ectomesenquimais olfatórias

PBS- Phosphate-Buffered Saline - Tampão fosfato salina

SFB- Soro fetal bovino

D-Mem- Meio Dubelco modificado/ Dulbecco's Modified Eagle Medium

CO₂- Gás carbônico

D-MEM/F-12- Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

RPM- Rotações por minuto

DMSO- Dimetil-Sulfóxido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	CÉLULAS-TRONCO (CT), CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO	21
2.2	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTM) E SUAS FONTES.....	23
2.3	ÂMNIO	24
2.4	TECIDO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO.....	25
2.5	TECIDO ADIPOSEO.....	26
2.6	CELULAS TRONCO MESENQUIMAIS E A CRIOPRESERVAÇÃO.....	27
2.7	PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO.....	28
2.8	MECANISMOS, FASES E DANOS ENVOLVIDOS NA CRIOPRESERVAÇÃO	28
2.9	AMBIENTE CRIOPROTETOR E CRIOPROTETORES	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA IDADE GESTACIONAL	34
3.3	DESENHO EXPERIMENTAL	34
3.4	EXPERIMENTO 1- CARACTERIZAÇÃO DAS CTM DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPITÉLIO OLFATÓRIO.	35
3.4.1	Coleta, isolamento e cultivo dos tecidos	35
3.4.2	Âmnio.....	35
3.4.3	Tecido adiposo.....	36
3.4.4	Epitélio olfatório	37
3.4.5	Curva de crescimento	38
3.4.6	Análise imunofenotípica por citometria de fluxo.....	39
3.4.7	Diferenciação <i>in vitro</i>	39
3.4.7.1	Diferenciação Osteogênica	40
3.4.7.2	Diferenciação Adipogênica	40
3.4.7.3	Diferenciação Condrogênica.....	41
3.5	REPIQUE CELULAR	41
3.6	CRIOPRESERVAÇÃO PARA BANCO CELULAR INICIAL.....	42
3.7	EXPERIMENTO 2- ANÁLISE DA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E DANOS MORFOLÓGICOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO DAS CTMS DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPITÉLIO OLFATÓRIO.....	42
3.7.1	Experimento 2- Delineamento.....	42
3.7.2	Células não criopreservadas (Cnc) - Grupo controle	42
3.7.3	Criopreservação.....	43

3.7.4	Descongelamento e avaliação de viabilidade pelo teste de exclusão por azul de Tripan.....	43
3.7.5	Avaliação da proliferação celular <i>in vitro</i>	44
3.7.6	Avaliação da viabilidade celular <i>in vitro</i> através da atividade mitocondrial	44
3.7.7	Avaliação de danos morfológicos e nucleares	44
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	RESULTADOS	46
5.1	EXPERIMENTO 1- COLETA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CTM DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPITÉLIO OLFATÓRIO	46
5.1.1	Coleta, isolamento, cultivo e caracterização da CTMs	46
5.1.2	Curva de crescimento	48
5.1.3	Diferenciação <i>in vitro</i>	49
5.1.4	Caracterização imunofenotípica.....	50
5.2	EXPERIMENTO 2- ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO, VIABILIDADE CELULAR E DANOS MORFOLÓGICOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO DAS CTM DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPITÉLIO OLFATÓRIO.....	51
5.2.1	Criopreservação.....	51
5.2.2	1º Avaliação da viabilidade celular pós descongelamento.....	51
5.2.3	Avaliação da proliferação celular <i>in vitro</i>	54
5.2.4	2º Avaliação da viabilidade celular <i>in vitro</i> através da atividade mitocondrial.....	55
6	DISCUSSÃO	58
6.1	EXPERIMENTO 1- CARACTERÍSTICAS DAS CTM DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPITÉLIO OLFATÓRIO.....	58
6.1.1	Morfologia celular, diferenciação, curva de crescimento.....	58
6.1.2	Expressão imunofenotípica.....	59
6.2	EXPERIMENTO 2- ANÁLISE DA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E DANOS MORFOLÓGICOS PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DAS CTM DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPITÉLIO OLFATÓRIO.....	59
6.2.1	Período e solução de congelamento.....	59
6.2.2	Avaliação de viabilidade pelo teste de exclusão de azul de tripan.....	60
6.2.3	Avaliação de proliferação celular <i>in vitro</i>	60
6.2.4	Avaliação mitocondrial.....	60

7	CONCLUSÃO.....	62
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, em todo o mundo, as terapias com células tronco vem obtendo destaque, haja visto seu potencial terapêutico, ao qual juntamente ao avanço tecnológico vêm norteando pesquisas inovadoras, viabilizando o tratamento de doenças em fase crônica (RIEDEL et al.,2021).

Classificadas como indiferenciadas, as células-tronco (CT) são dotadas de potencial de autorrenovação, e capacitadas à diferenciação em vários tipos celulares de linhagens específicas, apresentando destaque quanto ao uso terapêutico em medicina regenerativa (LEE et al., 2021).

As CT podem ser divididas quanto a sua natureza em embrionárias, presentes na fase de blastocistos, as adultas, presente em órgãos e tecidos ao longo da vida e as células –tronco pluripotentes induzidas, (iPS) as quais possuem propriedades que se assemelham as células-tronco embrionárias (CTE), mas são originadas à partir de células adultas geneticamente modificadas (PRANKE, 2004; MACHADO et al., 2018).

O uso de CTE levanta questões éticas polêmicas, quanto ao início da vida, pela destruição do feto ou blastocistos em estágio inicial, procedimento esse necessário para o isolamento celular (LO; PARHAM, 2009; WEATHERBEE; CUI; ZERNICKA-GOETZ, 2021).

Visto os impasses éticos apresentados pelo obtenção das células-tronco embrionárias (CTE), estudos tem demonstrado que as células-tronco adultas (CTA) ou somáticas, vem sendo amplamente pesquisadas (SEGURA et al., 2007).

Apesar das CTA apresentarem plasticidade restrita e proliferação limitada, não substituindo as CTE, elas vem sendo vastamente estudadas e empregadas por não apresentam restrições éticas e implicações polêmicas (MARCUS; WOODBURY, 2008).

Durante a vida, as CTA agem como sistema reparador interno, substituindo células comprometidas por lesões, doenças, bem como pelo desgaste natural, estando em estado de quiescência durante longos períodos, até serem recrutadas para reparação celular, sendo consideradas como repositoras fisiológicas presentes no organismo, dentre os tipos de CTA, as células tronco mesenquimais (CTM) constituem, um dos dois grupos principais (BARRY et al., 2004; JURGA et al., 2006; BYDLOWISKI et al., 2009).

A possibilidade de isolamento da CTM de tecidos variados como da placenta, tecido adiposo, polpa dentária e medula óssea, vêm proporcionando a aplicabilidade da medicina regenerativa com CT, sendo amplamente estudadas, fomentando o desenvolvimento da engenharia tecidual, como em terapias empregadas no tratamento de patologias imunomediadas, degenerativas (SÁNCHEZ-BERNÁ; SANTIAGO-DÍAZ; JIMÉNEZ-ALONSO, 2015), neurológicas, hematológicas, traumáticas e cardíacas (CARMO; SANTOS, 2009; SEO et al., 2021).

Dentre as fontes alternativas de CTM estão os tecidos extraembrionários como o âmnio, onde estas células apresentam propriedades primitivas, como características embrionárias confirmadas por apresentarem expressão positiva aos marcadores embrionários OCT-4 (POU5F1), NANOG (Nanog homeobox), ausência de tumorigenicidade, bem como potencial de expansão (ABDULRAZZAK et al., 2010; UMEZAWA et al., 2019).

Pela apresentação de propriedades imunomoduladoras as CTMs de âmnio, são elencadas como mais acessíveis para a realização de transplantes alogênicos, tornando-as uma escolha de grande potencial dentro da engenharia tecidual e terapia celular (HUO et al., 2010).

Com características imunomoduladoras, como as apresentadas pelo âmnio, o tecido adiposo é considerado uma das principais fontes de CTM, pela facilidade na obtenção e isolamento, bem como pelo grande número de células (ALVES et al., 2014; RAUTIAINEN; LAAKSONEN; KPIVINIEMI, 2021).

Na medicina veterinária, bem como na medicina humana, o uso terapêutico de CT provenientes do epitélio olfatório (EO) tem demonstrado ser uma fonte promissora, especialmente em doenças relacionadas com o sistema nervoso central e periférico (MAZZARELLA et al., 2016).

As CTM caninas, apresentam dificuldades quanto à propagação prolongada de passagens em cultura *in vitro*, sobretudo diante da diversidade entre fontes de tecidos de obtenção celular, bem como um limitado período de viabilidade, sendo estes obstáculos diante de investigações voltadas ao estudo, ensaios pré clínicos e uso terapêutico (WRIGHT et al., 2020).

Diante da necessidade de armazenamento por longos períodos das CTMs, preservando a viabilidade e suas propriedades biológicas, houve a necessidade da criação dos criobancos, possibilitando o emprego terapêutico bem como os avanços científicos celulares (EROL et al., 2021).

Os criobancos, estoques de CT e CTM armazenados em nitrogênio líquido, constituem uma fonte promissora de células pré-prontas para uso clínico, porém a criopreservação depende expressivamente de crioprotetores, suplementos de crescimento dentre outros fatores, aos quais devem visar a manutenção estrutural e funcional das células por períodos prolongados (ISILDAR et al., 2019).

Haja vista a necessidade de criopreservação e uma recuperação otimizada destas células pós descongelamento, este projeto de pesquisa teve como objetivo avaliar as três fontes promissoras de CTMs: âmnion, tecido adiposo e epitélio olfatório, pós-caracterização, estabelecendo um comparativo quanto à proliferação e viabilidade celular,

bem como os possíveis danos morfonucleares, quando empregado o protocolo padrão de congelamento, fomentando o estudo sobre CTM e seu emprego relevante em terapias e estudos posteriores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

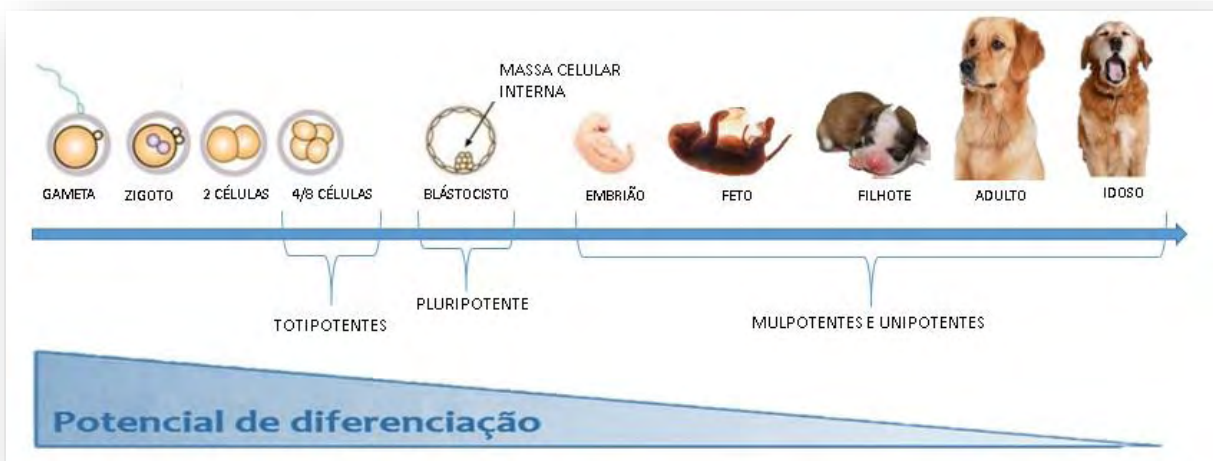
2.1 CÉLULAS-TRONCO (CT), CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

Capacitadas a proliferação extensiva, as Células-tronco (CT), são classificadas como indiferenciadas, apresentando amplo potencial de diferenciação celular, sendo encontrada em todas as fases da vida (KOLIOS et al., 2013).

Recebem classificações quanto a origem, sendo denominadas embrionárias ou adultas, bem como pelo grau de potencialidade, podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes, como demonstrado na Tabela 1 abaixo (BYDLOWSKI et al., 2009; VITA et al., 2012).

Dotada de capacidade de gerar um indivíduo completo, as CT totipotentes (Figura 1), dão origem aos três folhetos germinativos e apresentam a capacidade de gerar ainda, todos os anexos embrionários que compõem a placenta, enquanto as CT pluripotentes, dão origem somente aos três folhetos embrionários, sem a capacidade de gerar os anexos fetais. As CT multipotentes, se apresentam quiescentes em tecidos totalmente formados e adultos, sendo requisitadas para reparo tecidual dos mesmos, podendo ainda gerar os três folhetos embrionários através de estímulos específicos (LAKSMIPATHY et al., 2005).

Figura 1- Plasticidade das CT.



Fonte: Adaptado de MITALIPOV; WOLF, 2009.

As CTE derivadas do zigoto, são encontradas em fase de blastômeros, quando esse a partir de uma série de divisões mitóticas é constituído de quatro à oito células, nesta fase as CTE são classificadas, quanto ao potencial de diferenciação em totipotentes, estando capacitadas a originar os folhetos embrionários bem como tecidos extraembrionários (GRINFELD; GOMES, 2004; KMIECIK, et al., 2013).

A partir de uma divisão contínua é atingido o estágio de mórula, onde os blastômeros mais internos originam a massa celular interna em fase de blastocistos sendo as células

obtidas nesse estágio como CTE pluripotentes, originam as células dos três folhetos embrionários, o ectoderma, mesoderma e endoderma. (BOTTEGA et al., 2018).

Por apresentarem características de pluripotência as CTE possuem capacidade de originar qualquer tipo celular, bem como possibilidade de expansão *in vitro*, sem perda da capacidade de autorrenovação e potencialidade (STOCUM, 2001; BYDLOWSKI et al., 2009).

O emprego das CTE, contam com diferentes iniciativas, porém o uso do conjunto celular da massa interna, incita controversas opiniões entre os pesquisadores, desde o momento inicial da vida do indivíduo, bem como a existência de crenças arraigadas quanto a humanização do embrião (BARBOSA et al., 2018).

Dentre os impasses apresentados às CTE quanto às terapias aplicacionais, destacam-se apresentação de diferenciação espontânea, a toxicidade e respectivo rendimento em produção celular, apresentada por alguns dos métodos de diferenciação e ainda questões quanto à interação das CTE frente à implantação (NONES et al., 2008).

As CT classificadas como adultas (CTA) ou somáticas são definidas por apresentarem potencial de auto-renovação prolongado e capacidade quanto a diferenciação em tipos celulares especializados aos quais se originaram (NHI, 2001). Capacitadas a manter a homeostase tecidual as CTA são responsáveis pela reposição celular frente a injúrias ou processos apoptóticos, sendo classificadas quanto ao potencial de diferenciação em multipotentes (AMORIN et al., 2012).

Pelo potencial de diferenciação em múltiplas linhagens celulares, as CTA estão presentes em diversos tecidos, como hematopoiético, hepático, muscular, epitelial e nervoso, principalmente naqueles que apresentam proliferação celular elevada, possibilitando a reparação e renovação celular, conseqüentemente demonstrando grande relevância em terapia celular, apresentando ainda facilidade quanto á isolamento, cultivo bem como possibilidade de criação de banco celular (DOMINICI et al., 2006; TAKEUCHI; TANNURI, 2006; CARMO; SANTOS, 2009; NERY et al., 2013).

Visto os impasses éticos e frente a implantação apresentados pelas CTE, pesquisas tem se voltado para as CTA. Porém as CTA não apresentam as mesmas características quando comparadas as CTE, apresentando mecanismos diferentes, como demonstrado abaixo (Tabela 1) (BONGSO: RICHARDS, 2004).

Tabela 1- Células-Tronco embrionárias (CTE)x Células-Tronco adultas (CTA)

Parâmetros	CTE	CTA
Potencial de diferenciação	Totipotente/ Pluripotente	Multipotente
Auto-renovação	Ilimitada	Limitada

Mecanismo de apoptose	Tardio	Rápido
Formação de teratomas	Há riscos pós transplante	Não há á riscos pós transplante
Questões éticas	Uso limitado por questões éticas	Seu uso não é limitado por questões éticas
Tipo de transplante	Heterólogos	Autólogos e Heterólogos

Fonte: Adaptado de Bongso e Richards, 2004

Embora as CTE apresentem capacidade de diferenciação ilimitada quando comparadas as CTA, há vantagens, quanto a facilidade de isolamento, capacidade de propagação em cultivo, possibilitando e destacando o emprego das CTA (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006).

Há dois grupos principais dentro das CTA, sendo as células-tronco hematopoiéticas (CTH), responsáveis pela homeostásia e diferenciação em células que compõem o sangue e as células-tronco mesenquimais (CTM) responsáveis pela renovação de órgãos e tecidos (BIANCO et al., 2008; BYDLOWSK et al., 2009).

2.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTM) E SUAS FONTES.

As células-tronco mesenquimais (CTM), destacam-se quanto à variedade de fontes de obtenção e viabilidade em cultivo *in vitro*, apresentando relevância, na imunomodulação, na regeneração tecidual, e no tratamento de patologias com prognóstico atualmente desfavoráveis (PITTENGER et al., 1999).

As CTM dão origem à linhagens condrogênica, osteogênica, neurogênica e adipogênica o que ressalta seu potencial regenerativo em tecidos e órgãos das mesmas linhagens. Seu isolamento se dá, em particular, à sua facilidade de aderência ao plástico das placas de cultivo e a significativa expansão em consecutivas passagens *in vitro* e ainda pelas suas características fibroblastóides (DOMINICI et al., 2006).

Certos critérios devem ser apresentados, para que as CT recebam a nomenclatura de CTM, como: crescimento em cultivo, poder de adesão, marcação positiva para diversos anticorpos dentre eles o CD 90 (Thy-1), CD 105 (endoglina: marcador angiogênico), CD 73 (SH3 e SH4 ecto-5- nucleotidase), e marcadores negativos para anticorpos expressos pelas células-tronco hematopoiéticas (CTH), como o CD 34 (receptor de células endoteliais), CD 14 (receptor de lipopolissacarídeos) e CD 45 (marcador de células de natureza linfóide / hematológica), bem como a diferenciação, quando induzidas à

diferenciação *in vitro* em linhagens condrogênicas, osteogênicas e adipogênicas (LIMA et al., 2012).

Fatores como a facilidade de isolamento, possibilidade de transplantes alogênicos e risco baixo de indução tumoral, tornam as CTM fonte promissora em terapia celular (NERY et al.,2013).

As CTM podem ser isoladas de vários tecidos, tais como o fígado, pulmão, músculo esquelético, rim, medúla óssea, flúidos amnióticos e tecido adiposo (WANG et al.,2014) .

Nos tecidos extraembrionários as CTM também podem ser encontradas, como no âmnio, estas células apresentam propriedades primitivas, como pluripotência e expressão positiva aos marcadores embrionários OCT-4 (POU5F1), NANOG (Nanog homeobox), ausência de tumorigenicidade bem como potencial de expansão, tornando-as uma escolha de grande potencial dentro da medicina regenerativa visando a engenharia tecidual e terapia celular (ABDULRAZZAK et al., 2010).

O tecido adiposo é considerado uma das principais fontes de CTM, pela facilidade na obtenção e isolamento, bem como pelo grande número de células (ALVES et al., 2014).

Em medicina veterinária bem como em medicina humana, o uso terapêutico de CT provenientes do epitélio olfatório (EO) tem demonstrado ser uma fonte promissora, especialmente em doenças relacionadas com o sistema nervoso central e periférico (MAZZARELLA et al., 2016).

2.3 ÂMNIO

Dentre os tecidos extraembrionários, se destaca o âmnio, constituinte da placenta, favorece o desenvolvimento, proporcionando resistência ao impacto e proteção (PEREIRA et al., 2011).

Constituído por uma vesícula ectodérmica, revestida com mesoderme, o âmnio envolve e protege o feto, juntamente com o líquido amniótico, apresentado como uma das quatro membranas fetais, sendo elas o córion, âmnio, alantóide e saco vitelino (BJÖRKMAN, 1982).

O âmnio é composto por uma faixa epitelial de células cuboides, lâmina e membrana basal espessa e colágeno tipo IV (PARK et al., 2012). De origem mesodérmica extraembrionária, as células amnióticas mesenquimais, encontram-se distribuídas aleatoriamente na matriz extra celular (PEREIRA et al., 2011).

Pelo descarte das membranas amnióticas após o nascimento, as CTMs amnióticas são obtidas sem implicações éticas, de maneira facilitada e não invasiva (URANO et al., 2011; PARK et al., 2012).

Caracterizadas a partir do âmnio em felinos, caninos, equinos e humanos, as CTMs amnióticas, são relatadas como boa fonte celular (BACENKOVA et al., 2011; VIDANE et al., 2014).

As CTMs amnióticas caninas, apresentam elevada capacidade proliferativa e regenerativa, apresentando capacidade à diferenciação em células distintas como adipócitos, condrócitos, osteócitos e células neurais *in vitro*, diante destes aspectos relevantes, vários estudos bem como testes vem sendo desenvolvidos a fim de otimizar terapias no âmbito clínico. O âmnio apresenta características de CTMs, demonstrando ainda propriedades citoprotetoras, angiogênicas e anti-teratogênicas (FAVARON et al., 2015).

Uma diferença significativamente vantajosa é apresentada pelo âmnio, quando comparado as demais membranas fetais, ele é composto de populações celulares tanto pluripotentes quanto multipotentes (FERNANDES et al., 2012).

As células amnióticas mesenquimais (AM-CTMs) preservam características embrionárias, como pluripotência e propriedades imunossupressoras, confirmadas por apresentarem expressão positiva aos marcadores embrionários OCT-4 e NANOG. Por todas as qualidades apresentadas as AMCs são consideradas como fonte excelente de CT com grande potencial no emprego de terapias regenerativas (AMBRÓSIO et al., 2019).

2.4 TECIDO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO

Classificado como órgão sensorial o epitélio olfatório (EO) é encarregado da sensibilidade olfativa, apresentando neurogênese continuada por toda a vida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SAMUELSON, 2007).

O EO é constituído de células de suporte, neurônios olfatórios receptores, células tronco basais horizontais e globais, responsáveis pela renovação e substituição quando a danos celulares (JANG et al., 2007). Nos mamíferos a mucosa encontra-se posteriormente dorsal, na cavidade nasal, cobrindo as faces mediais e laterais do septo nasal (MACKAY-SIM, 2010).

Por estar em constante exposição direta ao ambiente externo bem como a substâncias e agentes nocivos, a regeneração celular apresentada pela neurogênese prolongada local é de grande valia para a população celular (HASSENKLOEVER et al., 2009). A neurogênese prolongada, bem como a regeneração celular demonstrada, pós lesões indica, que a mucosa olfatória tem sua plasticidade assegurada parcialmente pelas células-tronco ectomesenquimais olfativas (EO-CTMs) (GRAZIADEI et al., 1979).

Estudos vem comprovando a existência de CT caracterizadas como mesenquimais presentes no EO de fetos caninos (ALVES, 2009).

As OE-CTMs apresentam multipotência e sob determinadas condições, originam tanto neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, o que as caracteriza como células-tronco neurais, quanto apresentar capacidade de originar adipócitos, osteócitos e miócitos, caracterizando-as como células não neurais (ALVES et al., 2010).

As CTMs do EO, segundo ALVES (2009), apresentam morfologia fibroblastóide, proliferação acelerada e alta viabilidade pós criopreservação, se mostrando similar a culturas celulares não congeladas, facilitando a criação de banco celular. Análises imunofenotípicas vem demonstrando a expressão inespecífica de marcadores como o HLA-ABC, HLA-DR, CD 29 (Integrinas VLA-B), CD 31, CD 13, CD 73 (Ecto-5'-nucleotidase), CD 105 (Endoglina) e CD 90 (Thy-1), bem como expressões positivas do CD 29 (Integrina β 1), com sutil expressão do CD 34 (ICO 115, receptor de células endoteliais) e 13 (3D8) bem como ausência de expressão de marcadores como o CD 44 e do hematopoético CD 45. Diante destas relevantes características as CTMs derivadas do EO fetal canino, se destacam como fonte promissora de CT, apresentando grande relevância na terapia celular e medicina regenerativa.

2.5 TECIDO ADIPOSEO

Considerado de alta complexidade o tecido adiposo é constituído de pré-adipócitos, adipócitos maduros, células endoteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos, linfócitos e células do músculo liso vascular (CASPAR-BAUGUILS et al., 2005).

As células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (TA-CTMs), apresentam quando cultivadas *in vitro*, características típicas das CTM, sendo isoladas da fração vascular estromal do tecido adiposo subcutâneo (WON et al., 2017).

As TA-CTMs, são vistas como uma fonte celular autóloga, particularmente interessante, apresentando capacidade elevada de proliferação *in vitro*, ampla diferenciação celular, bem como potencial secretor de vários fatores de crescimento aos quais cabe a indução regenerativa tecidual (BAER, 2014).

Isoladas à partir de métodos menos invasivos, as TA-CTMs apresentam capacidade imunossupressora, capaz de inativar as células T. Estudos têm demonstrado essa ação a partir da liberação de um rico secretoma composto não só por fatores de crescimento, mas também por fatores tróficos e quimiocinas, responsáveis pela indução a proliferação e diferenciação das células, bem como de migração e melhoramento na proteção celular e do microambiente (FISHER et al., 2002).

Embora as TA-CTMs apresentem origem mesodérmica, elas possuem capacidade de diferenciação em células de origem ectodérmicas e endodérmicas, apresentando capacidade de diferenciação multilinhagens, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, dentre elas as

condrogênicas, osteogênicas, adipogênicas, bem como células tenogênicas, células de Schwann e células endoteliais vasculares (NADERI et al., 2017).

Caracterizadas como multipotentes, as TA-CTMs, demonstram resultados satisfatórios em tratamentos médicos com efeitos positivos quanto ao uso terapêutico exercendo atividades prorregenerativas (MIZUNO et al., 2002).

As TA-CTMs apresentam capacidade de fusão com outros tipos celulares, adquirindo suas características, bem como a produção de fatores parácrinos de atividades antiapoptótica e pró angiogênica. Além da ausência quanto a expressão dos complexos de histocompatibilidade I e II principais, indicando as células tronco do tecido adiposo como adequadas para transplantes autólogos e alogênicos (SUZUKI et al., 2015).

2.6 CELULAS TRONCO MESENQUIMAIS E A CRIOPRESERVAÇÃO

Apesar das vantagens apresentadas pelas CTMs, persistem vários impecílios quanto à aplicação clínica, tal qual a variabilidade apresentada quanto à dose utilizada visando a terapêutica regenerativa, apresentando números variando entre 50 a 400 milhões de células, por exemplo (HAQUEN et al., 2015; PITTENGER et al., 2019).

A impossibilidade de extração de um grande número de células provenientes de um tecido doador, bem como a coleta de tecidos autólogos, em certas doenças pode ser altamente problemático e por vezes impossível, implicando no uso amplo das CTMs em casos de urgência, (SCHLARB, 2018).

Diante das possibilidades terapêuticas, vêm crescendo a necessidade de expansão *in vitro* em grande escala, com o intuito de garantir números de CTMs, adequadas para a aplicação clínica, o cultivo e principalmente o armazenamento, acaba por favorecer desde centros de pesquisa, fabricantes e principalmente o destinatário final, que seriam as clínicas veterinárias (SUELZU et al., 2020; GRIVTSOVA et al., 2020).

Mediante a necessidade de expansão e de armazenamento celular por períodos prolongados, onde os aspectos estruturais e funcionais sejam promovidos, a quiescência celular obtida através da criopreservação é uma alternativa para a manutenção da diversidade biológica, visando o futuro das CTMs em terapias aplicacionais e em análises posteriores ao isolamento celular (EROL et al., 2021).

Baseados na utilização de baixas temperaturas, os biobancos, tem a criopreservação como técnica mais difundida e empregada ultimamente, mesmo apresentando influência de inúmeros fatores, tais como a composição e concentração de agentes crioprotetores, taxa de congelamento, duração do período de criopreservação, regime de temperatura bem como de descongelamento, dentre outros (JANG et al., 2017; DUAN et al., 2018).

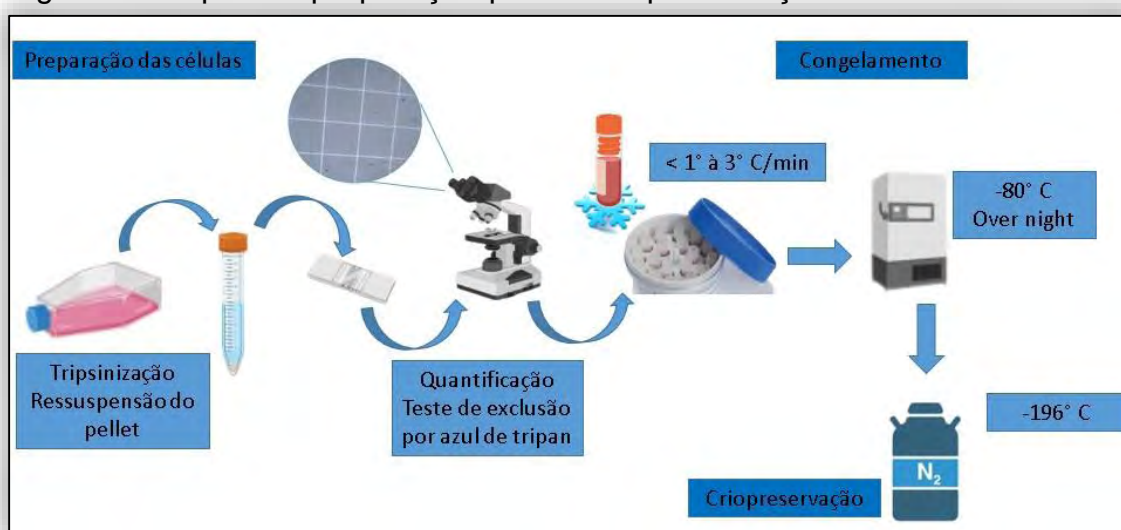
2.7 PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR

A massa tecidual, complexo de arranjos celulares, é composta por aproximadamente 80% de água, o que justifica a ligação íntima do fenômeno de congelamento intra e extra celular, com alterações estruturais e bioquímicas nocivas quando há um congelamento desprotegido (PEGG, 2007).

O resfriamento por meio de temperatura muito baixas, buscando a preservação das células é denominado de criopreservação, que por meio de estase metabólica, capacidade apresentada pelas células frente a decréscimos de -120°C , proporciona a criação de criobancos que por sua vez permitem a otimização, quanto ao período de obtenção celular bem como de oferta imediata, além de favorecer o controle e padronização das células, permitindo a comercialização pós cultivo e armazenamento bem sucedidos (DOUCET et al., 2017; LE BLANC et al., 2018).

As etapas da criopreservação, convencionalmente se iniciam à partir da quantificação e ressuspensão celular em meio adequado, suplementado com crioprotetores (CPAs) (WANG et al., 2022). Os criotubos contendo os aditivos e as células passa para um compartimento de taxa de resfriamento controlada, sendo de -1 à -3°C por minuto, com armazenamento à -80°C , posteriormente sendo armazenados em tanque de nitrogênio líquido para conservação a longo prazo à -196°C , como ilustrado na Figura 2 (CALMELS et al., 2003).

Figura 2- Etapas de preparação para a criopreservação.



Fonte: Própria autoria

2.8 MECANISMOS, FASES E DANOS ENVOLVIDOS NA CRIOPRESERVAÇÃO

Por meio da criopreservação, visa-se a preservação da viabilidade, conservando as propriedades anatômicas e fisiológicas desde a coleta, transporte e por fim a implantação (HÃO et al., 2020).

A criopreservação por sua vez exige mudanças de fase que implicam em alterações quanto ao estado da amostra, tais como de sólido à líquido e vice e versa recebem a denominação de “congelamento” (Figura 3) e “descongelamento” (Figura 7). Na fase de congelamento, as células podem sofrer criolesões irreversíveis, processo este intimamente ligada a mudança de fase real da amostra, (BAUST et al., 2009).

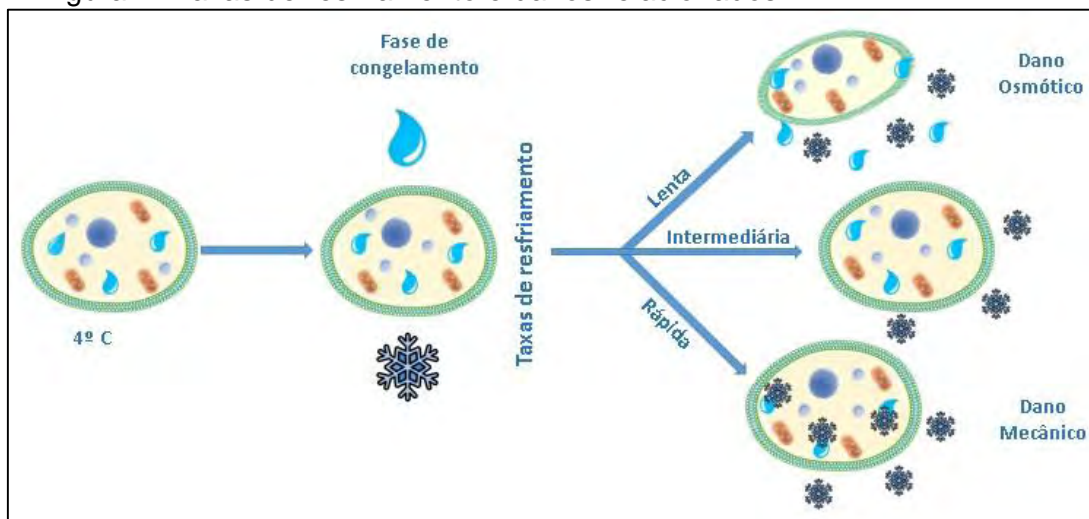
Figura 3- Sequência e temperaturas da fase de congelamento



Fonte: Própria autoria

As criolesões estão relacionadas a velocidade da mudança de fase da amostra, no momento do congelamento, sendo denominada taxa de resfriamento. Quando a taxa de resfriamento é lenta há o dano osmótico; já a taxa de resfriamento rápida ocasiona o dano mecânico (Figura 4) (MAZUR, 1963; MAZUR et al., 1972; ELLIOT et al., 2017; STRECZYNSKI et al., 2019).

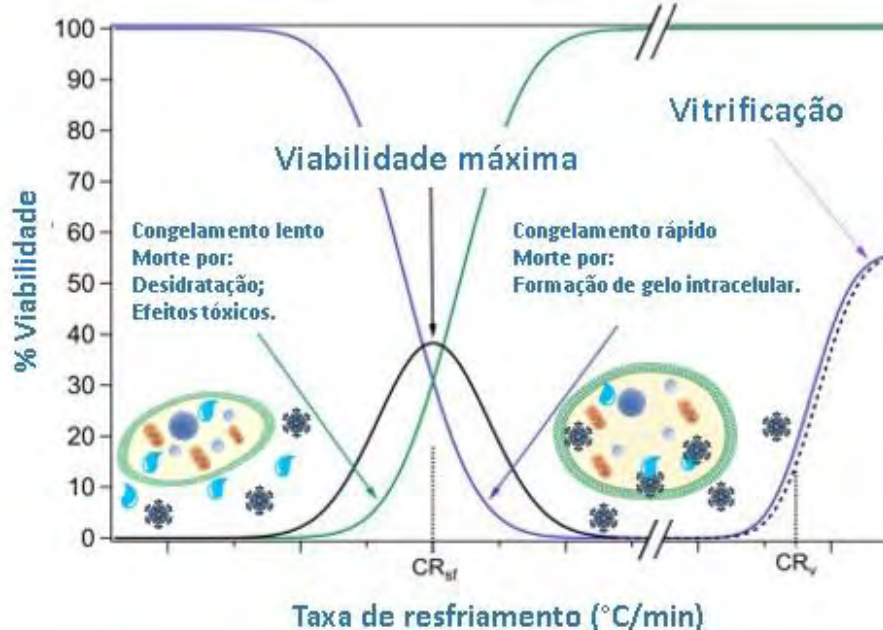
Figura 4- Taxas de resfriamento e danos relacionados



Fonte: Própria autoria

A relação entre efeitos de soluto e danos relacionados ao gelo, originou a “Hipótese dos dois fatores”, a qual sugere que a máxima viabilidade celular pode estar relacionada a uma taxa de resfriamento intermediária, demonstrada pela curva “U” invertida (Figura 5), está sendo influenciada por fatores como permeabilidade e tamanho celular. A taxa de resfriamento ideal está intimamente ligada a fatores como tipo e concentração do crio protetor empregado bem como do tipo celular criopreservado (MAZUR et al., 1972; ELE, 2011; ZHAO et al., 2017).

Figura 5- Relação entre viabilidade máxima e taxa de resfriamento intermediária

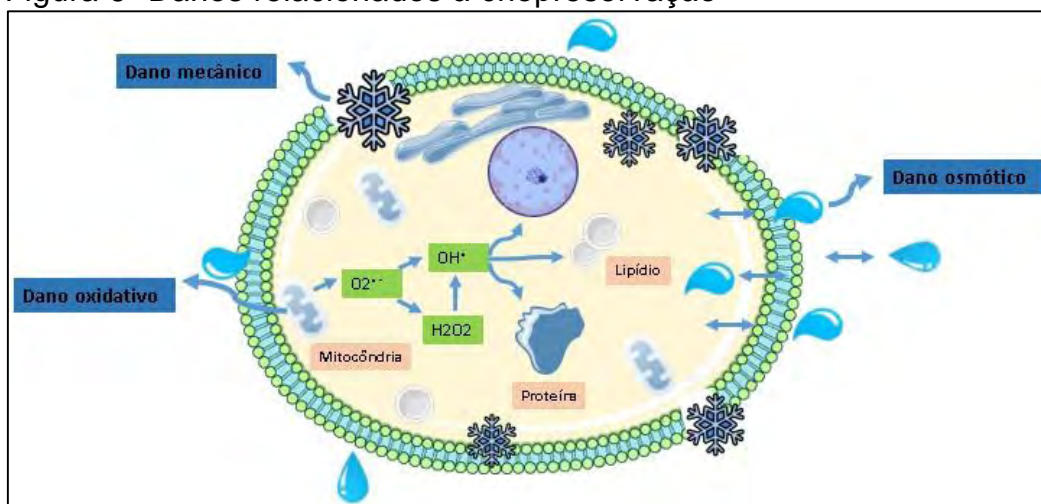


Fonte: Adaptada de MAZUR et al., 1972; ELE, 2011; ZHAO et al., 2017.

Na fase de congelamento há mecanismos que interferem diretamente na viabilidade celular pós descongelamento, dentre eles o dano físico, o osmótico e o oxidativo representados na Figura 6 (PEGG, 2015; YANG et al., 2017; FINGER e

BISCHOF, 2018).

Figura 6- Danos relacionados à criopreservação



Fonte: Própria autoria; Figura com partes adaptadas de SMART-Servier Medical Art;

Servier: <https://smart.servier.com>

Legenda: $O_2^{\bullet-}$ Radical Superóxido; OH^{\bullet} Radical Hidróxila; H_2O_2 Peróxido de Hidrogênio.

Quando as células são resfriadas rapidamente (Figura 6) ocorre o dano mecânico e estrutural, gerado pela falta de tempo suficiente para que o fluido passe do meio intracelular para o extracelular, ocasionando nucleação e recristalização de gelo nas células (BAKHACH, 2009). O dano osmótico ocorre no congelamento lento (Figura 5) onde há a formação de gelo extracelular, causando uma remoção osmótica de água no espaço intracelular podendo ocasionar morte celular pela hipertonicidade (YOUSEFIAN et al., 2018). A lesão infligida por ROS formados na criopreservação gera o dano oxidativo, por vezes culminando na oxidação de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (CHEN e LI, 2020; LIM et al., 2021).

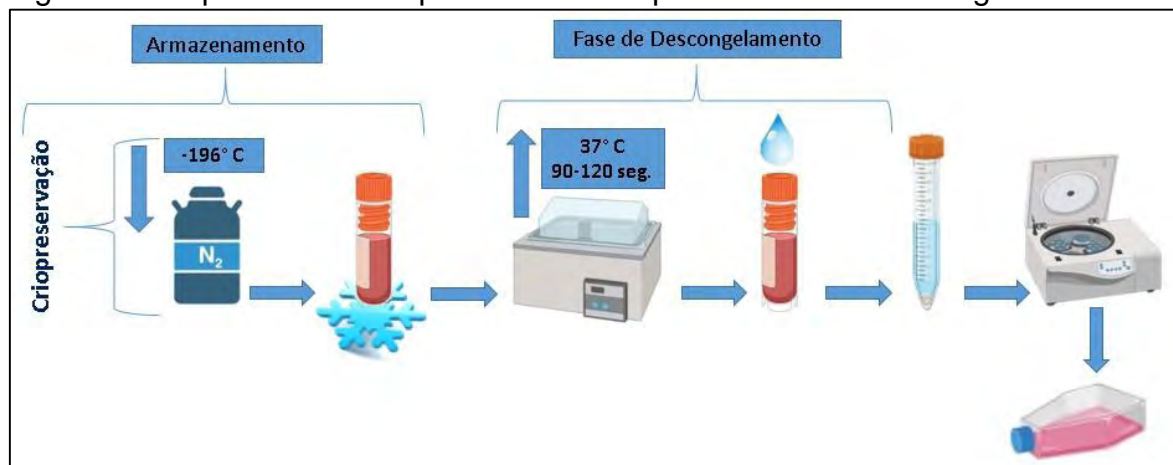
As fases de aquecimento e posterior descongelamento total das células (Figura 7) não é considerada crítica quando comparada a fase de resfriamento. A teoria empregada na fase de descongelamento rápido, à fim de evitar a recristalização é norteada pelos princípios da termodinâmica, comparando a forma cristalizada e a água vitrificada, sendo a fase de vitrificação compreendida como um estado de maior energia, quase estável e passiva de se arranjar em baixa energia no momento do descongelamento com estabilidade (BENSON et al., 2012; BABOO et al., 2019).

Porém há parâmetros a serem medidos quanto ao efeito da taxa de aquecimento na viabilidade, dentre eles o uso de crioprotetores e método de resfriamento, etapas que antecedem o descongelamento (TERRY et al., 2010).

Para a fase de descongelamento protocolos atuais sugerem o aquecimento rápido a 37°C em banho-maria (Figura 7), pelo período de 90 a 120 segundos para a

maximização da viabilidade celular (BABOO et al., 2019).

Figura 7- Sequência de temperaturas e tempo da fase de descongelamento



Fonte: Própria autoria

2.9 AMBIENTE CRIOPROTETOR E CRIOPROTETORES

Durante o congelamento vários efeitos físicos indesejáveis ocorrem e causam com isso morte celular, com o intuito de proteger as células e minimizar os efeitos adversos da criopreservação, são utilizados agentes crioprotetores (ACs), visando garantir a viabilidade celular pos descongelamento (BUHL et al., 2012; GRITSAEV et al., 2015).

Os ACs recebem classificação quanto a capacidade ou incapacidade de transpor a membrana celular, sendo subdivididos em agentes crioprotetores penetrantes (ACPs) (intracelulares) e agentes crioprotetores não penetrantes (extracelulares), quando comparados quanto a toxicidade, geralmente os ACPs apresentam maior potencial toxico que os ACs não penetrantes (RAJU et al., 2021).

Os ACPs apresentam capacidades de preservação célula frente aos danos osmótico e mecânico porém essa capacidade depende de propriedades como a alta solubilidade em água quando em baixas temperaturas, a capacidade de ter efeitos minimamente tóxicos bem como a facilidade de transpor as membranas biológicas (PEGG, 2007).

Na atualidade, apesar de apresentar efeitos adversos quanto a infusão, como toxicidade, agregação celular e presença de detritos apoptóticos o ACP preconizado é o dimetilsulfóxido (DMSO), estudos vêm apontando o uso em concentrações de 5-10% (v/v) como eficiente (YAMATOYA et al., 2022).

Em formações de bancos celulares o DMSO apresenta emprego frequente devido a facilidade de uso, custo reduzido bem como alta capacidade de permeabilização de membrana (LOVELOCK et al., 1865).

Considerado um AC não permeável, o soro fetal bovino (SFB), mesmo com implicações quanto à biossegurança e a ausência de uniformidade entre lotes, tem seu uso combinado ao DMSO, como protocolo padrão aplicado à criopreservação celular

(CROWE et al., 2000; VERDANOVA et al., 2014).

Haja visto as necessidades de manter as características biológicas por meio da criopreservação bem como a recuperação otimizada das células quando descongeladas o objetivo deste projeto de pesquisa foi avaliar as três fontes promissoras de CTMs, âmnion, tecido adiposo e epitélio olfatório, pós caracterização, estabelecendo um comparativo, quanto à proliferação e viabilidade celular, quando empregado o protocolo padrão, de congelamento, fomentando o estudo sobre CTMs, e seu emprego relevante em terapias e estudos futuros.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo o Comitê de Ética Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (CEUA nº 2725260721). O estudo foi realizado no Laboratório de Células-tronco e Terapias Gênicas (GDTI-FZEA-USP) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo USP-FZEA – Pirassununga.

Os úteros, provenientes de cinco fêmeas caninas, sem raça definida e em terço final de gestação, foram coletados através de campanhas de castração, onde ocasionalmente essas fêmeas são recebidas em estado de prenhez. Os úteros foram transportados, fechados em caixas de isopor contendo gelo reciclado, armazenados e embalado em sacos plásticos.

Em fluxo laminar e em condições estéreis, úteros e cornos uterinos passaram por lavagem com solução composta de PBS (Phosphate Buffer Solution) 1X e 5 % de penicilina/estreptomicina, para retirada de debris celulares e/ou muco.

Posteriormente os cornos uterinos passaram por dissecação, iniciada por cuidadosa incisão para exposição dos fetos, proporcionando a retirada dos mesmos, ao longo do projeto foram utilizados vinte fetos, sendo coletados quatro fetos por fêmea.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA IDADE GESTACIONAL

O período gestacional dos fetos foi definido por meio de análise macroscópica e pela Técnica de Crown-Rump, segundo protocolos adaptados de Evans e Sack (1973) e Pieri et al. (2015). A avaliação por meio da macróscopia se dá pela formação e presença de estruturas tais como, pelos, pálpebras, coxins e dígitos, glândulas mamárias, bem como pela possibilidade de diferenciação da genitália externa (Tabela 2).

Tabela 2- Modelo de Técnica de Crown-Rump

Idade Gestacional - Modelo de Crown-Rump		
Desenvolvimento Embrionário	Cães	Crown-rump (MM)
Desenvolvimento completo de cabeça e cauda	26-27	20
Desenvolvimento das cavidades nasais	28-32	22-30
Retina pigmentada Corpo totalmente formado Diferenciação das genitálias	35	30-35

Fonte: Adaptado de Pieri et al. (2015).

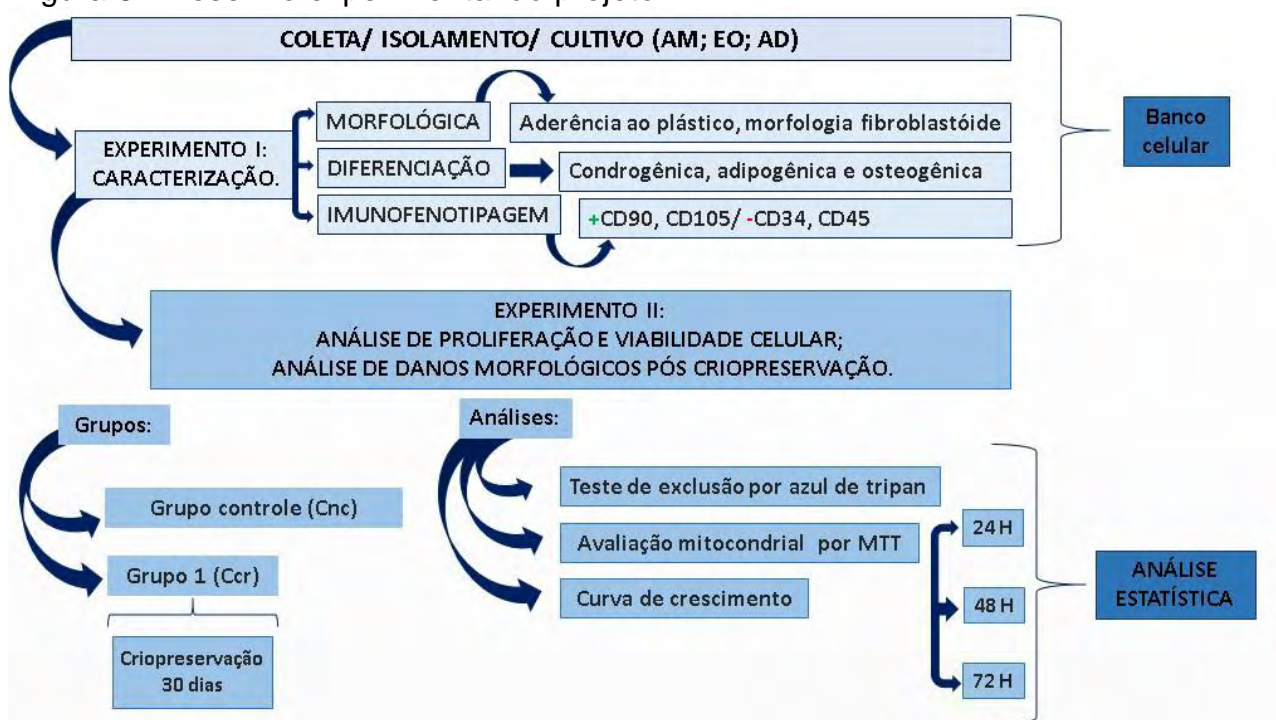
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado mediante coleta dos tecidos fetais, seguido de

isolamento, cultivo celular primário e repiques. Em cada passagem, as células foram criopreservadas para obtenção de banco celular, na densidade de 1×10^6 .

Permaneceram em cultivo cerca de 2×10^6 para expansão celular e utilização nas análises de caracterização, bem como de criopreservação, como demonstrado abaixo, no desenho experimental do projeto (Figura 8).

Figura 8 - Desenho experimental do projeto



Fonte: Própria autoria.

Legenda: Grupo Controle/ Cnc: Células não criopreservadas; Grupo 1/ Cci: Células criopreservadas imediatas; Grupo 2/ Ccr: Células criopreservadas recuperadas.

3.3 EXPERIMENTO 1- CARACTERIZAÇÃO DAS CTM DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPITÉLIO OLFATÓRIO.

3.3.1 COLETA, ISOLAMENTO E CULTIVO DOS TECIDOS

3.3.2 ÂMNIO

Seguindo o protocolo de PARK, et al (2012), o âmnio foi separado das outras membranas fetais manualmente, em fluxo laminar estéril. Em placa de Petri, o âmnio foi lavado com solução tampão fosfato salina (PBS- phosphate buffered saline) e antibióticos (Penicillin- Streptomycin, Gibico™, New York, USA). Posteriormente em nova placa, foi feita a maceração mecânica através de lâmina de bisturi estéril até a obtenção de consistência homogênea, com fragmentos de mais ou menos 3 mm de diâmetro.

Seguindo para digestão enzimática, com colagenase tipo I, a 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pelo período de 45 minutos a 1 hora e meia a $37,5^{\circ}\text{C}$, após este período,

a amostra passou por centrifugação, sendo plaqueadas em garrafas de 25mm, passando para meio de cultivo com α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification-Gibico™, New York, USA), suplementado conforme Tabela 3.

As células em passagem de número 0 (P0) foram mantidas em incubação a 37,5°C e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. Quando atingiram a confluência de 70-80%, as células passaram por tripsinização (Triple Express- Gibico™, New York, USA) com incubação a 37,5°C por 10 minutos, seguindo para centrifugação por 5 minutos a 1200 rotações por minuto (RPM), o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em meio suplementado, sendo replaqueadas em placa de 75mm para obter maior expansão celular (PARK et al., 2012).

Tabela 3 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo das CTM de tecido amniótico.

Componente	Porcentagem	Concentração	50 mL
α -MEM	86%		43 mL
SFB (10%		5 mL
Penicilina e Estreptomicina	1%	100Ui/ml e 100 μ g/ml	500 μ l
Anfotericina	1%	250 μ g/ml	500 μ l
L-Glutamina (Gibico™, New York, USA)	1%	200mM/ml	500 μ l
Aminoácido não-essenciais (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	1%		500 μ l

Tabela modificado de Park, et al 2012.

3.3.3 EPITÉLIO OLFATÓRIO

O protocolo seguido foi segundo ALVES, et al (2010), a coleta foi feita pós decapitação, com incisão mediana longitudinal do crânio do feto e coleta do epitélio olfatório, da porção superior da cavidade nasal, anterior ao bulbo olfatório e abaixo da lâmina crivosa do osso etmoidal. A coleta se deu sob condições estéreis em fluxo laminar, respeitando o tempo de 1 a 2 horas “*post- mortem*”.

O material foi submetido à lavagem com PBS acrescido de antibióticos (Penicillin-Streptomycin, Gibico™, New York, USA), por 5 vezes, sendo dois minutos cada.

A amostra passou por digestão enzimática com 1ml triple Express (Gibico™, New York, USA), 0,25%, sendo mantido em estufa por 30 minutos e posterior inativação com D-MEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) e SFB (LGC

Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Seguindo para tubos Falcon com fundo cônico de 15ml, foram centrifugadas a 1200 RPM, pelo tempo de 5 minutos. Pós descarte do sobrenadante foi feita a resuspensão em 1ml de meio, descrito na Tabela 4 abaixo:

Tabela 4 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo das CTMs de epitélio olfatório.

Componente	Porcentagem	Concentração	50 mL
DMEM/F12	86%		43 mL
SFB	10%		5 mL
Penicilina e Estreptomicina	1%	100Ui/ml e 100 µg/ml	500 µl
Anfotericina	1%	250 µg/ml	500 µl
L-Glutamina	1%	200mM/ml	500 µl
Aminoácido	1%	-	500 µl

Tabela modificada de Alves, et al 2010.

O conteúdo celular foi plaqueado e encaminhado para cultivo em estufa a 37,5°C umidificada e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

3.3.4 TECIDO ADIPOSEO (AD)

A coleta foi feita, segundo protocolo adaptado de ALVES et al. (2017) e PETERSEN et al. (2017). O tecido adiposo inguinal, gonadal e da região supra escapular, regiões de maior evidencia de tecido adiposo, foi coletado por meio de incisão em pele com acesso ao subcutâneo, na região inguinal e gonadal, com retirada por meio de pinça e auxílio de lâmina de bisturi, do tecido adiposo. As amostras foram lavadas com PBS a 0,15 molar, por duas vezes, passando para a digestão enzimática, em tubo Falcon de 15 ml contendo Colagenase Tipo I a 0,1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), sendo encubadas em sequência em estufa a 37,5°C e atmosfera gasosa de 5% de CO₂, durante 45 minutos, passando a cada 15 minutos, por agitação manual vigorosa, facilitando com isso a digestão, em seguida foram centrifugadas pelo período de 5 minutos a 100 RPM, o sobrenadante com a fração adiposa foi descartado e o pellet ressuspendido em 3 ml de PBS 0,15 molar para lavagem e retirada dos resíduos de colagenase.

A amostra foi colocada em um tubo falcon novo, passando por nova centrifugação por 5 minutos a 1200 RPM. Após o descarte do o pellet, fração estromal, foi ressuspendido em 1 ml de meio de cultura DMEM (Modified Eagles Medium High Glucose- Gibico™, New York, USA) suplementado, como descrito na Tabela 5 abaixo:

Tabela 5 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo das CTMs de tecido adiposo.

Componente	Porcentagem	Concentração	50 mL
DMEM	86%		43 mL
SFB	10%		5 mL
Penicilina e Estreptomicina	1%	100Ui/ml e 100 µg/ml	500 µl
Anfotericina	1%	250 µg/ml	500 µl
L-Glutamina Gibico™, New York, USA)	1%	200mM/ml	500 µl
Aminoácido (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	1%		500 µl

Tabela modificado de Alves, et al 2017.

Posteriormente o material contendo as células foi plaqueado e homogeneizado, seguida de incubação em estufa umidificada a 37,5°C e e atmosfera gasosa de 5% de CO².

Sendo realizada após 48 horas, a troca parcial do meio de cultura, com renovação de apenas 5,0 ml do meio. Após mais 48 horas, as células foram lavadas com PBS 0,15 molar, por 2 vezes, no intuito de remover as células não aderidas e os debris. As células passaram por troca de meio duas vezes por semana para a eliminação de células adiposas não aderidas, auxiliando na obtenção das CTMs o replaqueamento foi feito quando atingiram confluência de 70-80%.

3.3.5 Curva de crescimento

Buscando avaliar o perfil celular de replicação e capacidade de proliferação em cultivo, foi seguido o protocolo de PINHEIRO et al (2020) onde as células dos três tecidos foram plaqueadas na densidade de 3×10^4 , em placas de 12 poços, em duplicata técnica. As células plaqueadas atingiram confluência de 90% em 72 horas, passando então por tripsinização com Triple Express (-Gibico™, New York, USA), a 0,25%, pelo período de 5 minutos em incubadora de CO₂. Após esse período, a inativação enzimática foi efetuada com as respectivos meios, de cada tecido, suplementados com 10 % de SFB. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1400 RPM por 5 minutos, passando por quantificação em Câmara de Newbauer e novo plaqueamento. As passagens foram realizadas até a densidade quantificada ser menor, que a inicial de 3×10^4 .

3.3.6 Análise imunofenotípica por citometria de fluxo.

O protocolo de análise imunofenotípica por citometria de fluxo foi realizado segundo Pinheiro et al. (2016), através dos anticorpos de CTMs CD 90 (Thy-1), CD 105 (Endoglina: marcador angiogênico) e o CD 44 e dos hematopoiéticos que devem ser negativos, CD 34, CD 45 (Proteína tirosina fosfatase, tipo receptor C).

As células em P3 foram lavadas com PBS e centrifugadas a 200xg por 7 minutos, logo após este período, foi adicionado o anticorpo primário (1:100) com incubação por 1 hora, em temperatura ambiente. Para a incubação do anticorpo secundário, as células passaram por nova lavagem, centrifugação e incubação dos secundários (1:1000) por 40 minutos no escuro. Uma terceira lavagem e centrifugação foi realizada antes da fixação com paraformoldeído a 2% pelo período de 10 minutos, posterior à esse período foi realizada a análise em citômetro de fluxo.

A relação de anticorpos que serão utilizados neste processo encontram-se listados na Tabela 6.

Tabela 6 - Relação de anticorpos para análise imunofenotípica por citometria de fluxo

Anticorpo	Antígeno	Espécie	Mono/poli	Esp./Reatividade
CD90-Conjugado	IgG2b	Rato	Mono	Canina
CD44-Conjugado	IgG2b	Rato	Mono	Canina, Bovina, Equina, Felina
CD34-Conjugado	IgG1	Camundongo	Mono	Canina e Primatas (Humanos e macacos)
CD45-Conjugado	IgG2b	Rato	Mono	Canina

Fonte: Adaptado de Vidane et al., 2014.

A análise foi realizada em citômetro de fluxo (Accuri) utilizando o software Cell Quest e analisado com o Software Pain-A-Gate.

3.3.7 Diferenciação *in vitro*

Para a diferenciação *in vitro*, foi utilizado o protocolo segundo a empresa Gibco® (EUA). As células obtidas dos tecidos do epitélio olfatório, âmnion e tecido adiposo de fetos caninos foram cultivadas com meio basal, sendo o meio respectivo para cada tecido (Tabela 7) e posteriormente testadas quanto à capacidade de diferenciação nas três linhagens, a osteogênica, adipogênica e condrogênica, com o auxílio do kit de diferenciação StemPro® (Gibco, EUA), de acordo com o método preconizado pelo fabricante, sendo utilizadas células em P3, com períodos das respectivas linhagens

conforme a Tabela 8 abaixo, com posterior documentação por fotomicrografia em microscópio digital de fluorescência colorida Invitrogen™ EVOS™ e barra de 400µm.

Tabela 7- Meios de cultivo inicial com base no tecido de origem celular

Tecidos	Meio de cultivo inicial
Âmnio	α-MEM
Epitélio Olfatório	DMEM/ F12
Tecido adiposo	DMEM

Fonte: Própria autoria

Tabela 8 – Linhagens, períodos de cultivo inicial, indução e métodos de coloração

Linhagens	Período de cultivo inicial	Período de indução à diferenciação	Métodos de Coloração
Osteogênica	Confluência de 70/80%	21 dias	Alizarin Red
Adipogênica	Confluência de 70/80%	14 dias	Oil Red
Condrogênica	Isenta de cultivo, aguardar 2 horas	21 dias	Alcian Blue

Fonte: Própria autoria.

3.3.7.1 Diferenciação Osteogênica.

A densidade celular utilizada foi de 3×10^5 (P3) em triplicata, em placas de 24 poços. As células após atingirem a confluência de 70-80%, em o cultivo inicial, tiveram seus meios-basais trocados pelo meio diferenciador Osteocyte/Chondrocyte StemPro® differentiation basal médium (A10069-01), sendo adicionado o osteogenesis supplement (A100066-01) e 1% de antibiótico, o quarto poço permaneceu com o mesmo meio basal, sendo o grupo controle. A troca do meio indutor foi realizada a cada quatro dias. Após o término, os poços foram lavados com solução PBS 1X e fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos. As células foram lavadas por duas vezes em água destilada e os poços corados pelo período de três minutos. Ao final as células passaram por lavagem com água destilada por três vezes e fotomicrografia.

3.3.7.2 Diferenciação Adipogênicas

Foram usadas células em P3, plaqueadas na densidade de 3×10^5 , em placa de

24 poços, passando por cultivo com o meio basal até atingirem a confluência de 70-80% com troca do meio a cada 48 horas. Após o período de cultivo inicial houve a troca pelo meio diferenciador StemPro® Adipocyte Differentiation Basal Medium (A10410-01) com adição de 1% de antibiótico e StemPro® adipocyte supplement (A10065-01), os poços de controle negativo foram mantidos com o meio basal, ambos foram trocados a cada quatro dias. Após 14 dias de cultivo os meios foram removidos e os poços foram lavados com solução PBS 1X, duas vezes durante cinco minutos cada e posteriormente foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos. Posteriormente foram lavadas por três vezes em PBS 1X e em seguida foram coradas durante 15 minutos no escuro passando por três lavagens consecutivas, sendo posteriormente fotomicrografias.

3.3.7.3 Diferenciação condrogênicas

As células permaneceram em cultivo com o meio-basal até atingirem a confluência de 70-80%, sendo posteriormente plaqueadas na densidade de $1,6 \times 10^7$ /ml células (P3) sendo plaqueados 5 μ L/poço, em placas de 24 poços com armazenamento em estufa pelo período de duas horas, a 37,5°C. Posteriormente passaram para cultivo com meio diferenciador Osteocyte/Chondrocyte StemPro® differentiation basal médium (A10069-01) sendo adicionado Chondrogenesis supplement (A100064-01) e 1% de antibiótico, o quarto poço permaneceu com o meio basal sendo o grupo controle. Os poços foram cultivados durante 21 dias e os meios trocados a cada quatro dias. Após o término, os poços foram lavados com solução PBS 1X e fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos. As células passaram por lavagem, duas vezes em água destilada e posteriormente os poços foram corados por Alcian Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) pelo período de trinta minutos. Ao final sucederam-se 3 lavagens com água destilada e fotomicrografia.

3.3.8 Repique celular

As células foram plaqueadas até atingirem a confluência de 70 a 80%. Para o processo de repique celular, as células foram tripsinizadas com Triple Express (Gibico™, New York, USA) pelo período de 5 minutos á 37,5°C, posteriormente as células foram transferidas para Tubo Falcon de fundo cônico de 15 ml, para centrifugação, por 5 minutos a 1400 RPM. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em meio basal respectivo ao tecido de origem celular, passando por contagem em Câmara de Neubauer utilizando a fórmula abaixo e posterior replaqueamento na densidade de $0,3 \times 10^6$, em placas de 6 poços, para retorno ao cultivo em condições iguais as anteriores ou armazenamento em método de criopreservação (PARK et al., 2012).

$$\frac{\text{Número total de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrantes contados}}$$

3.3.9 Criopreservação para banco celular inicial

A criopreservação para o banco celular inicial se deu segundo ERCOLIN, et al (2016), sendo as células dos tecidos, âmnio, tecido adiposo e do epitélio olfatório criopreservadas na densidade de 1×10^6 , em P0, P1 e P2. Foram armazenadas em criotubos, contendo o meio de congelamento descrito na Tabela 9, com adição de SFB (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e o Dmetil-Sulfóxido (DMSO- Sigma- Aldrich, St. Louis, USA).

Devidamente identificados os criotubos foram colocados em container de congelamento lento (Mr. Frosty™ Freezing Container), encaminhadas ao congelamento no $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo mantido e transferidos após 24 horas para armazenamento no tanque de nitrogênio líquido, para formação de banco celular.

Tabela 9 – Composição do meio de criopreservação celular

Componente	Concentração
Meio basal	40%
SFB (Invitrogen)	50%
Dimetil-Sulfóxido (DMSO)	10%

Fonte: Adaptado de Ercolin, et al 2016.

3.4 EXPERIMENTO 2- ANÁLISE DA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E DANOS MORFOLÓGICOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO DAS CTMs DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPITÉLIO OLFATÓRIO.

3.4.1 Experimento 2- Delineamento

3.4.2 Células não criopreservadas (Cnc) - Grupo controle

Para fins de controle, células obtidas do âmnio, tecido adiposo e do epitélio olfatório, foram, após a coleta foram mantidas em cultivo, até a passagem de número 2, com troca de meio a cada 3 dias, e quando atingiram a confluência de 70% passaram por a ser quantificadas, e a partir da densidade de 1×10^6 passaram por plaqueamento para as análises em P3.

3.4.2.1 Células criopreservadas recuperadas (Ccr) - Grupo 1

Para as análises das células criopreservadas recuperadas, as células obtidas do âmnio, tecido adiposo e do epitélio olfatório, após a coleta, foram mantidas em cultivo, até P2, com troca de meio a cada 3 dias, passando por congelamento na densidade celular de 1×10^6 , pelo período de 30 dias, após este período foram descongeladas imediatamente, sendo realizada a análise de viabilidade pelo Teste de Exclusão de Azul de Tripán e plaqueamento para recuperação em P2 e então na passagem de número 3 (P3) as células foram analisadas, como descrito na Tabela 10.

Tabela 10- Passagens (P) trabalhadas em cada grupo e fase

Grupos	P em cultivo	P para congelamento	P para análises
Controle/ Cnc	3	-----	3
Grupo 1/ Ccr	2	2	3

Fonte: Coutinho, 2023

Legenda: Grupo Controle/ Cnc: Células não criopreservadas; Grupo 1/ Ccr: Células criopreservadas recuperadas.

3.4.3 Criopreservação

Para o grupo 1 (Ccr), as células em P2 foram congeladas, na densidade de 1×10^6 , com o meio de congelamento descrito na tabela 6, pelo período de 30 dias. Os criotubos com um total de 1 ml foram criopreservados segundo o método e o meio da Tabela 11.

Tabela 11- Composição do meio e método de criopreservação

Componente	Concentração	Método de congelamento
Meio basal	40%	1- 1°C/min dispositivo de resfriamento
SFB (Invitrogen)	50%	1' - 80°C/ 12 horas
Dimetil-Sulfóxido (DMSO)	10%	2- Nitrogênio/ 30 dias

Fonte: Adaptada de Ercolin, et al 2016; Ginani et al., 2012.

Legenda: 1- colocação em dispositivo para diminuição controlada da temperatura; 1' - Adjunto ao passo 1, dispositivo permanecerá pelo período de 12 horas em freezer -80°C; Transferência e armazenamento em tanque de nitrogênio líquido pelo período de 30 dias.

3.4.4 Descongelamento e avaliação de viabilidade pelo Teste de Exclusão por Azul de Tripán

Após o período de 30 dias, as células foram retiradas do botijão de nitrogênio líquido e seguiram imediatamente para banho-maria na temperatura de 37°C. Posteriormente, o meio de congelamento contendo as células foi transferido para um Tubo Falcon de 15 ml

com adição de meio de cultivo (sendo usado o respectivo meio de cultivo para cada tecido), para inativação do DMSO, passando por centrifugação à 1400 RPM, descarte do sobrenadante e resuspensão do pellet.

A viabilidade pós descongelamento foi avaliada pela quantificação em Câmara de Neubauer através do Teste de Exclusão por Azul de Tripán. Depois da homogeneização do pellet foram coletados 10 µl do meio contendo células que foram adicionados a 10 µl de Trypan Blue (Gibco, New York, USA) em um Eppendorf®, e após 5 minutos, foram colocados 10 µl, desta junção, para a quantificação de células viáveis e não viáveis.

As células foram quantificadas em Câmara de Neubauer, posteriormente a análise de células viáveis *versus* não viáveis foi realizado pela % das células vivas (ZHANG et al.,2022)

3.4.5 Avaliação da proliferação celular *in vitro*

Na passagem de número 3 (P3) foi realizada a avaliação da proliferação e viabilidade celular, onde células do grupo controle (Cnc) e grupo 1 (Ccr) foram plaqueadas na densidade de 3×10^4 células por poço em quadruplicata ($n = 4$), a fim de se obter a curva de crescimento e o rendimento nos diferentes grupos, em intervalos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente após plaqueamento.

3.4.6 Avaliação da viabilidade celular *in vitro* através da atividade mitocondrial

O ensaio de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), foi empregado para a avaliação da proliferação celular. As células foram cultivadas com 100 µL de seus respectivos meios-base, na densidade de 5×10^3 células por poço, em placas de 96 poços, durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas. Ao fim de cada intervalo foi acrescentado ao meio base 22µL de MTT, com o armazenamento a 37,5°C/ 2 horas. Neste período, o anel de tetrazólio do MTT (amarelo) é convertido a cristais de formazan de tonalidade aroxeadada, por NAD(P)H-oxidoreduções intracelulares. Os cristais de formazan por sua vez são insolúveis em solução aquosa, sendo solúvel em contato com o DMSO, que age como tampão de solubilização. Por esse motivo, após a formação dos cristais o sobrenadante foi retirado de cada poço e os mesmos receberam 100 µL de DMSO, onde a densidade óptica foi obtida pela leitura das placas em espectrofotômetro BD Accuri™ C6 Plus no comprimento de onda de 570 nm.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a obtenção de dados quantitativos provenientes de viabilidade pós criopreservação, foi realizado o Teste de Mann-Whitney, para avaliação de diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos no grupo controle (Cnc) e grupo 1 (Ccr).

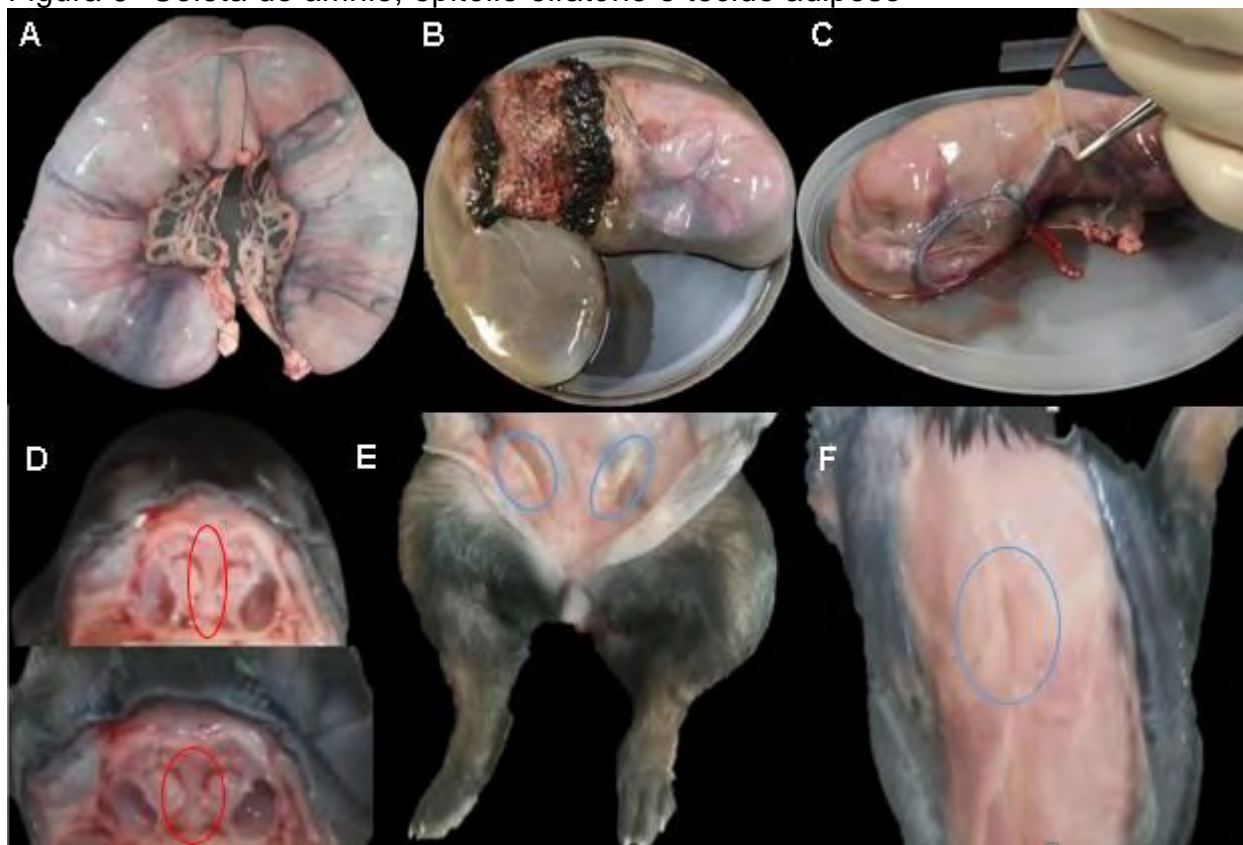
5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1- COLETA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CTM DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSITO E EPTÉLIO OLFATÓRIO

5.1.1 Coleta, isolamento, cultivo e caracterização da CTMs

Foram realizadas 20 coletas, onde os fetos apresentavam idade gestacional entre os 41 a 54 dias. A coleta foi iniciada pela coleta do âmnio (Figura 9- C), seguida pela coleta do eptélio olfatório (Figura 9- D) e por fim do tecido adiposo (Figura 9- E e F).

Figura 9- Coleta do âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo

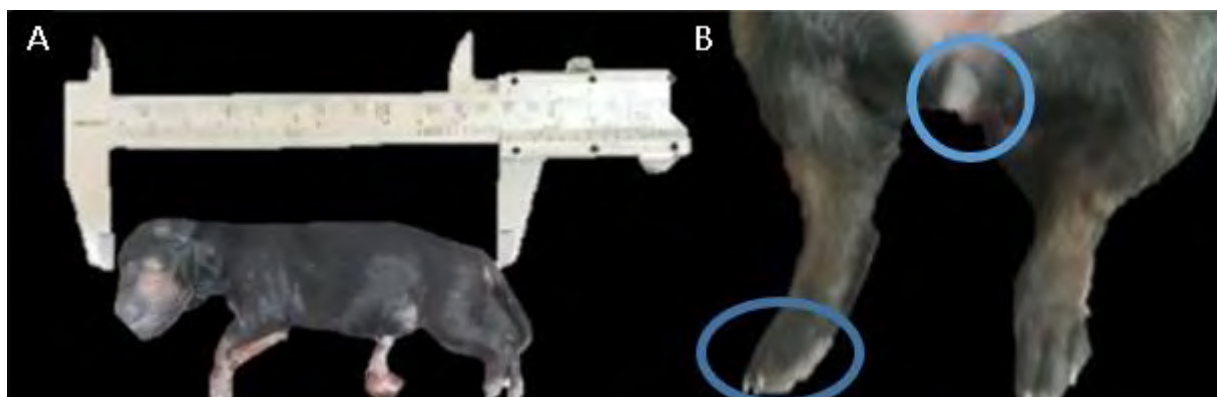


Fonte: Própria autoria

Legenda: A- útero gravídico; B- feto com os anexos fetais; C- separação do cõrion e do âmnio; D- círculos vermelhos evidenciando a lâmina cribforme; E- traços localizados abaixo da gordura inguinal; F- círculo azul circundando a gordura supra escapular.

O período gestacional dos fetos foi definido por meio de análise macroscópica e pela Técnica de “Crown-Rump” (CR). A avaliação por meio da macroscopia se deu pela formação e presença de estruturas como, pêlos, pálpebras, coxins e dígitos, glândulas mamárias, bem como pela possibilidade de diferenciação da genitália externa (Fig. 10 A e B).

Figura 10- Caracterização da idade gestacional dos fetos.

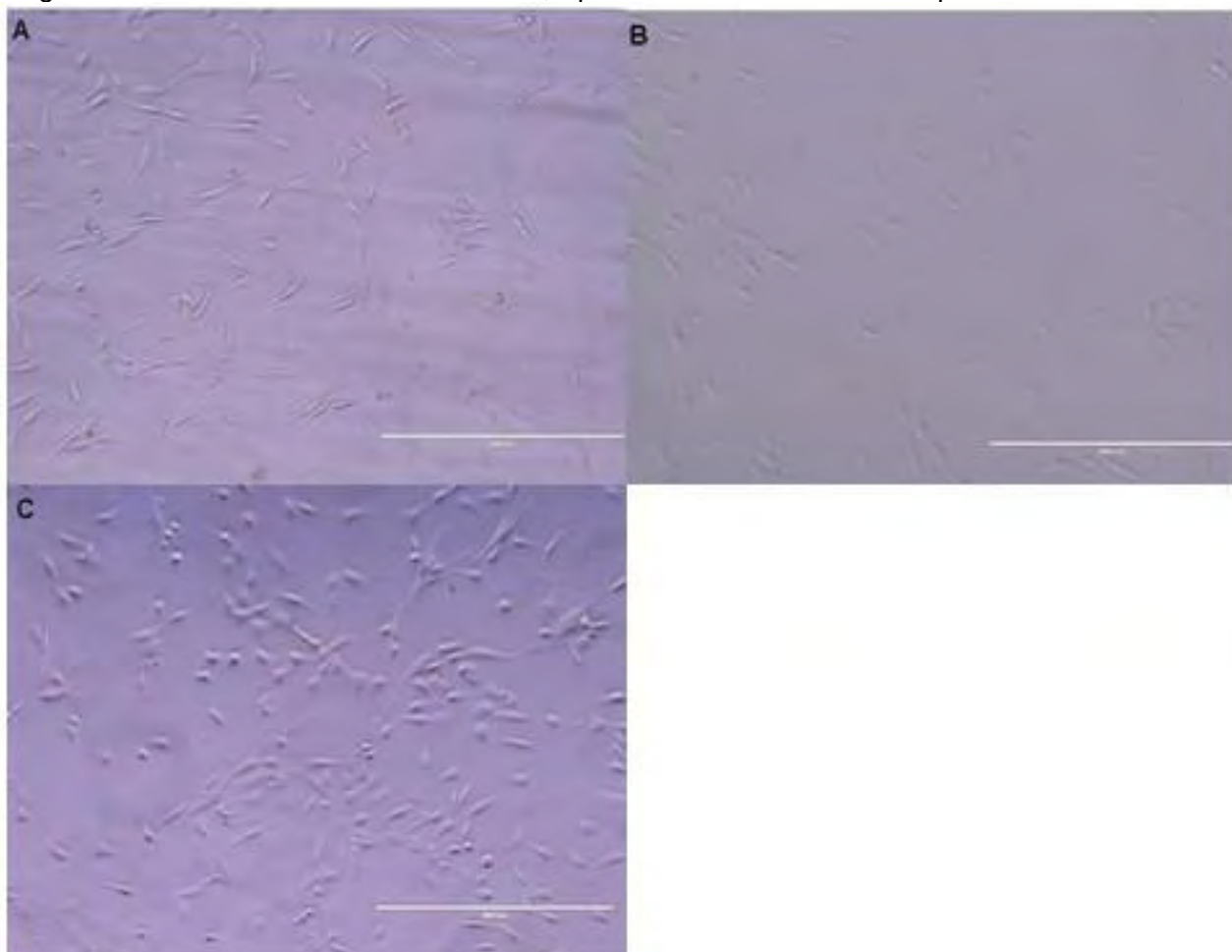


Fonte: Própria autoria

Legenda: A- Feto com pelos e palpebras; B- Genitalha externa (vúlva), coxins e digitos.

Em cultivo as células do âmnio demonstraram morfologia fibroblastóide e poligonal com 72 horas, enquanto o tecido adiposo e o epitélio olfatório apresentaram o mesmo formato com o período de 48 horas. Além da morfologia poligonal e fibroblastóide as células do tecido adiposo demonstraram morfologia em fuso (Figura 11 A, B e C).

Figura 11 - Cultura de células de âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo.



Fonte: Própria autoria

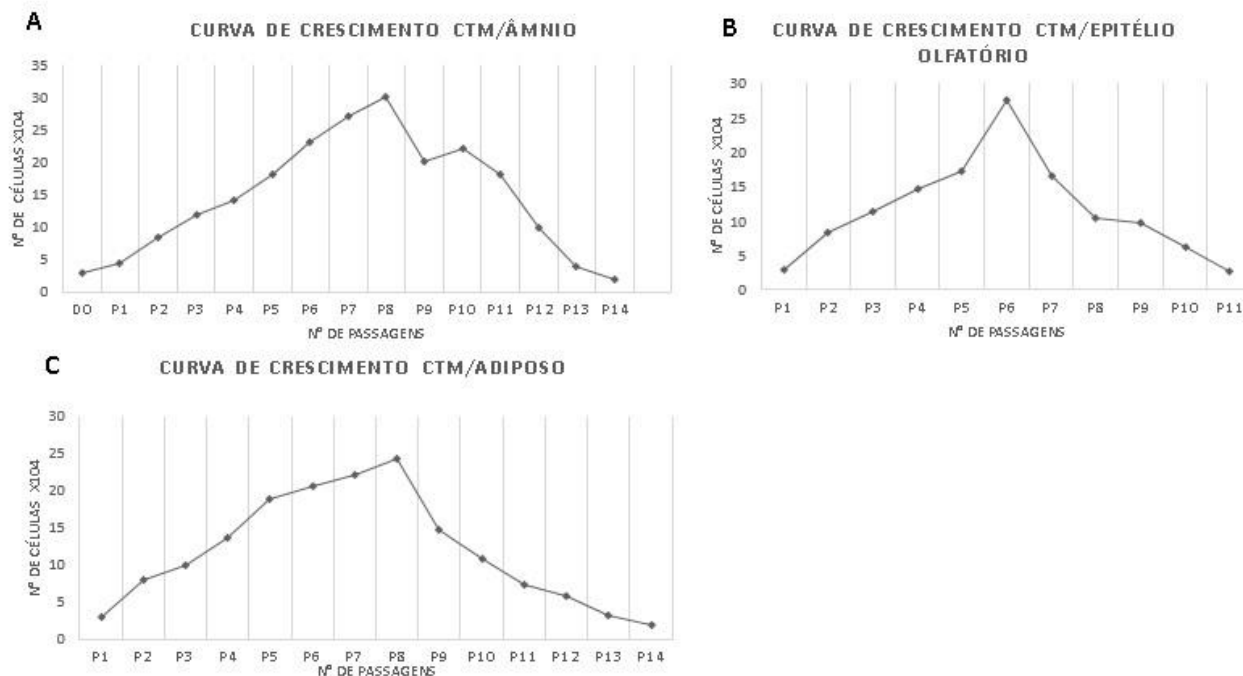
Legenda: Fotomicrografia de células de âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo: A- células isoladas de âmnio, com 72 horas apresentando morfologia fibroblastóide e poligonal; B- células isoladas do epitélio olfatório, com 48 horas,

apresentando morfologia fibroblastóide e poligonal; C- células isoladas do tecido adiposo com 48 horas, apresentando morfologia fibroblastóide, poligonal e em fuso; 20X (Barra: 200 μm).

5.1.2 Curva de crescimento

Para a curva de crescimento, as células tronco isoladas dos três tecidos, tecido adiposo, âmnio e epitélio olfatório, foram plaqueadas em primeira passagem (P1) na densidade de 3×10^4 em placas de 24 poços, em triplicata, até atingirem a confluência de 70-80%, sendo tripisinizadas e replaqueadas na densidade inicial até que o número contado fosse inferior ao plaqueado inicialmente mediante quantificação em Câmara de Neubauer. As células isoladas de âmnio, apresentaram crescimento até a décima terceira passagem (P13), com pico na oitava passagem (P8) (Figura 12A). Enquanto as células obtidas do epitélio olfatório, atingiram o pico em sexta passagem (P6) e crescimento até a décima passagem (P10) (Figura 12B). Já as células do tecido adiposo, demonstraram crescimento até a passagem de treze (P13), atingindo o pico na passagem de número número oito (P8) (Figura 12C).

Figura 12- Curva de crescimento das células isoladas de âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo.



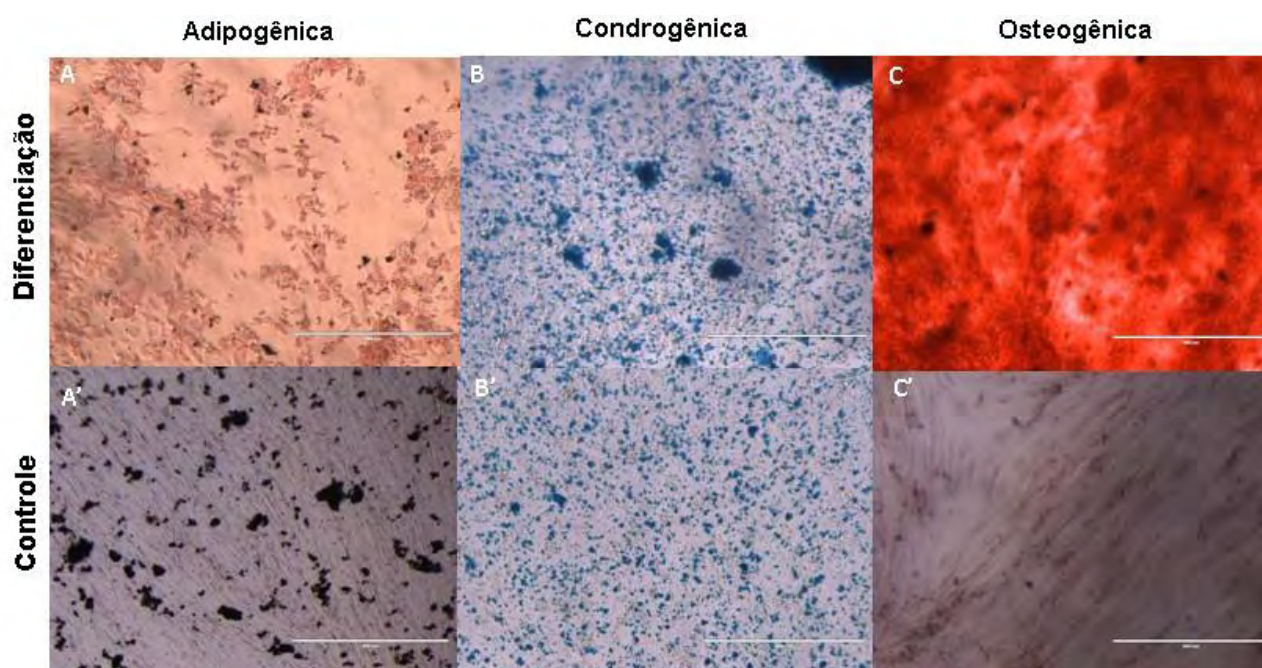
Fonte: Própria autoria

Legenda: A – Curva de crescimento das células isoladas de âmnio, apresentaram crescimento até a décima terceira passagem (P13), com pico na oitava passagem (P8) B – Curva de crescimento das células obtidas do epitélio olfatório, com pico em sexta passagem (P6) e crescimento até a décima passagem (P10). C – Curva de crescimento das células do tecido adiposo, com crescimento até a passagem de treze (P13), atingindo o pico na passagem de número número oito (P8).

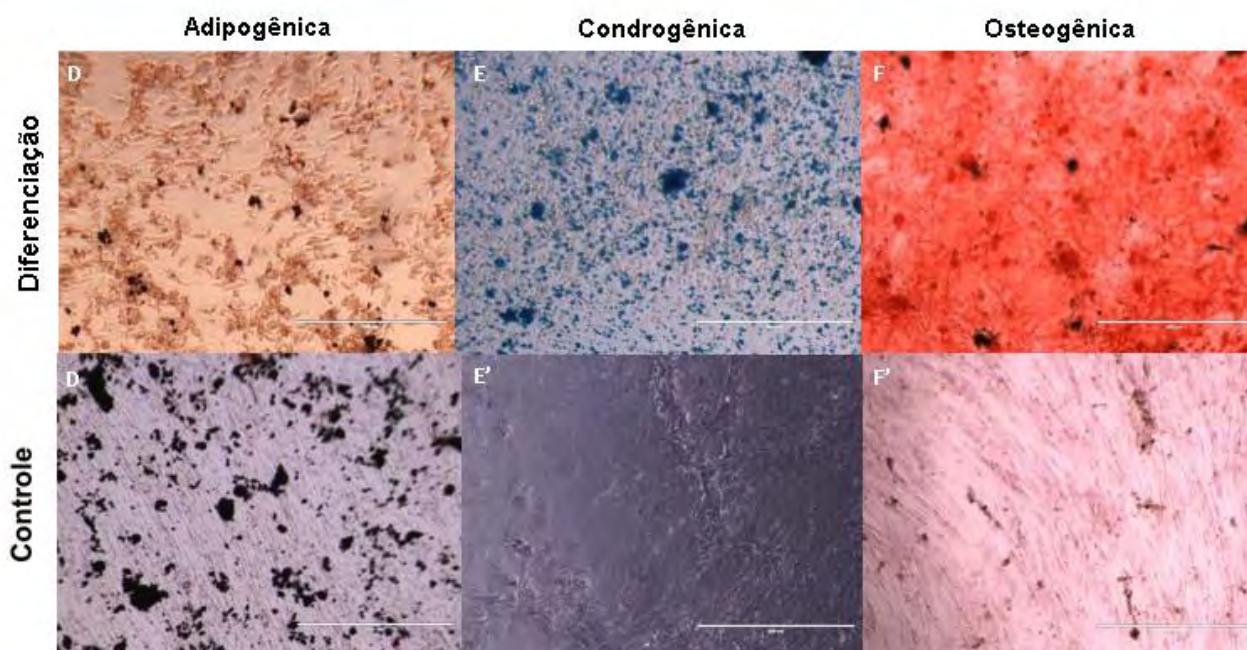
5.1.3 Diferenciação *in vitro*

Foi realizada a diferenciação *in vitro* para linhagens do mesoderma, sendo elas a adipogênica, condrogênica e osteogênica, das células isoladas do âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo. Na diferenciação das linhagens adipogênicas, após coloração com Oil Red, foram evidenciados por fotomicrografia, a presença de vacúolos lipídicos (Figura 13 A, D e G), já a diferenciação condrogênica apresentou formação de proteoglicanos, após coloração com Alcian Blue (Figura 13 B, E e H) enquanto nas fotomicrografia da diferenciação em linhagem osteogênica, as células apresentaram morfologia com formação de matriz extra celular óssea quando corada com Alizarin Red (Figura 13 C, F e I).

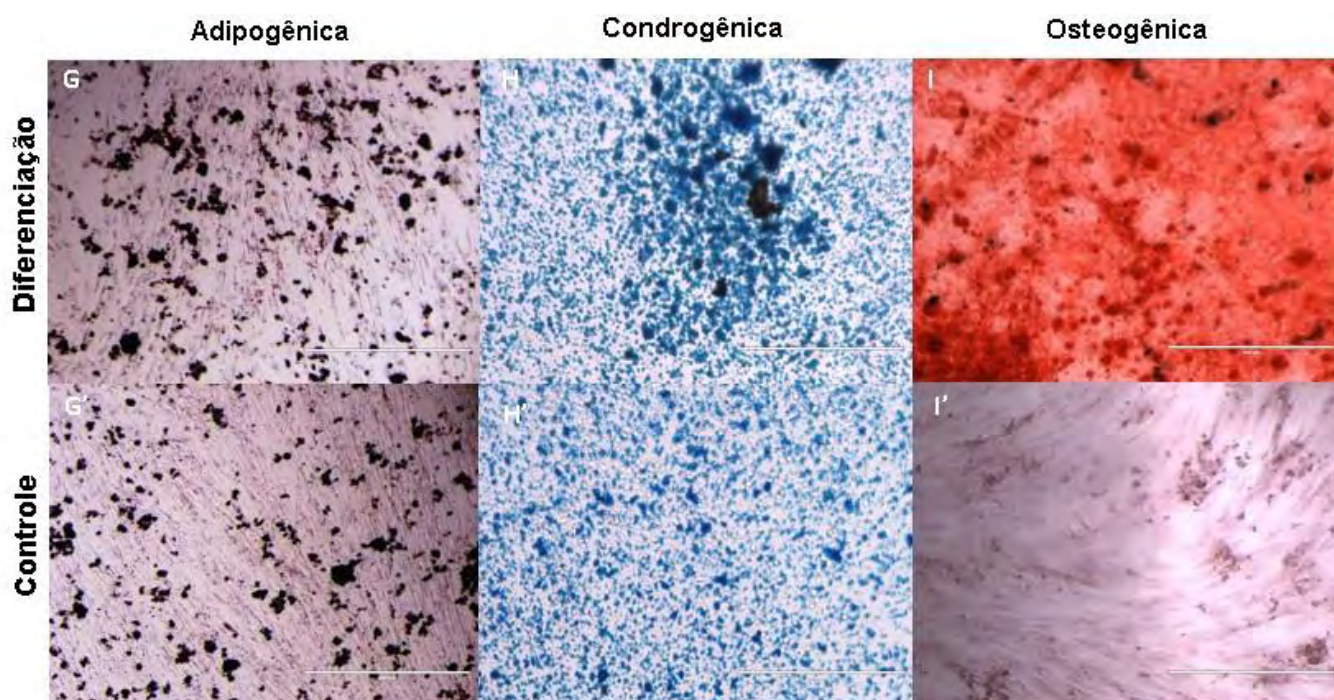
Figura 13- Diferenciação *in vitro*
Âmnio



Tecido do epitélio olfatório



Tecido do epitélio olfatório



Fonte: Própria autoria.

Legenda: Fotomicrografias das células induzidas a diferenciação in vitro. A, D e G - Diferenciação adipogênica, coradas com Sudan Black. A', D' e G' - Controle com morfologia fibroblastóide. B, E e H - Diferenciação condrogênica, coradas com Alcian Blue. B', E' e H' - Controle com morfologia fibroblastóide. C, F e I - Diferenciação osteogênica, coradas com Alizarin Red. C', F' e I' - Controle com morfologia fibroblastóide, com 100% de confluência. Barra: 400µm.

5.1.4 Caracterização imunofenotípica

Através das técnicas de citometria de fluxo, foi realizada a caracterização imunofenotípica, com os marcadores de CTMs, CD44 e CD90 bem como os de CTHs como o CD 34 e o CD 45. As expressões em porcentagem se encontram na Tabela 12 abaixo

Tabela 12- Análise imunofenotípica das células isoladas de âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo.

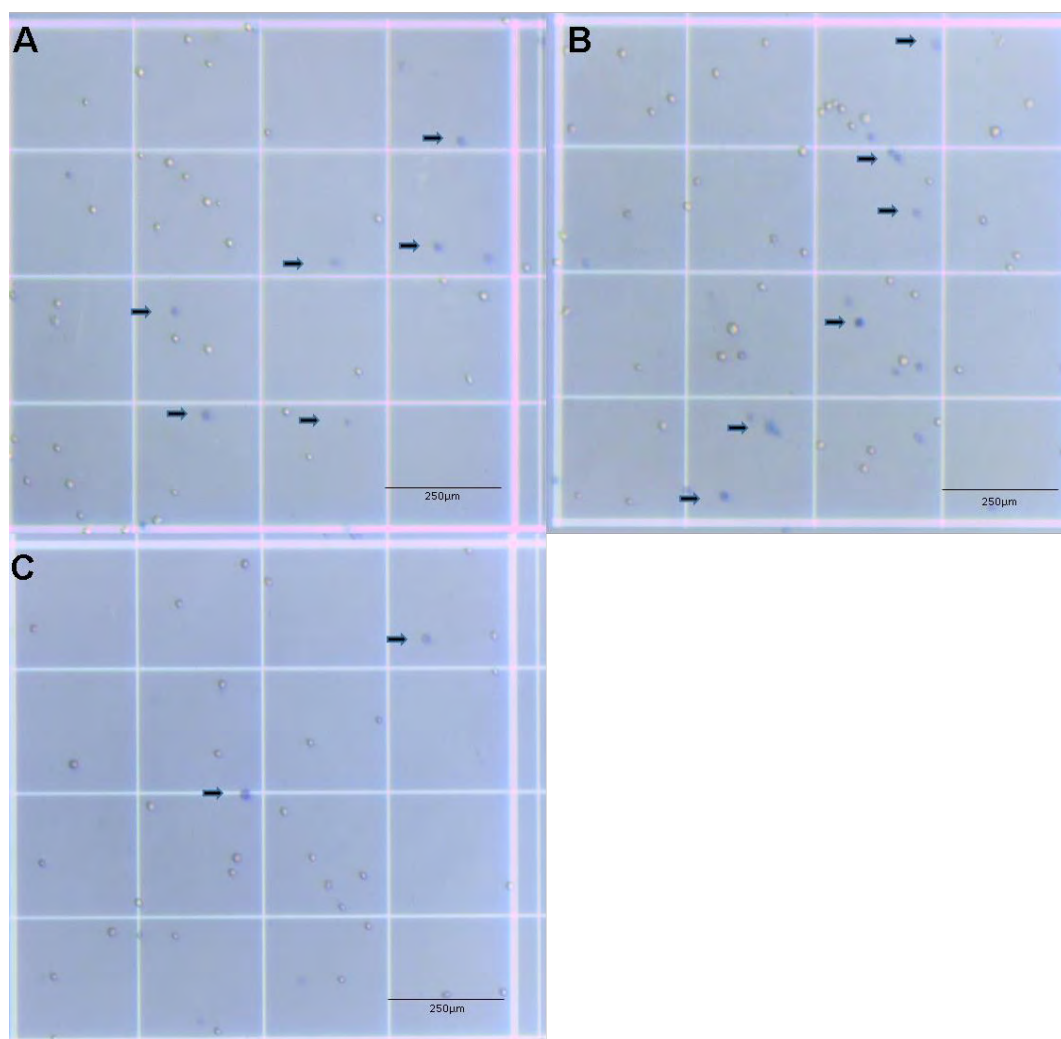
Tecidos de origem celular	Marcadores monoclonais (CD)			
	CD 44	CD 90	CD34	CD 45
Âmnio	<1%	14%	<1%	<1%
Epitélio olfatório	10%	86,5%	<1%	<1%
Tecido adiposo	90,8%	87,8%	<1%	<1%

5.2 EXPERIMENTO 2- ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO, VIABILIDADE CELULAR E DANOS MORFOLÓGICOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO DAS CTM DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPTÉLIO OLFATÓRIO.

5.2.1 1º Avaliação da viabilidade celular pós descongelamento

Através da visualização para posterior quantificação de células viáveis e não viáveis, em Câmara de Neubauer, foi possível visualizar uma quantidade menor de células coradas em campo, do tecido adiposo quando comparado ao âmnio e ao epitélio olfatório (Figura 14).

Figura 14- Análise de viabilidade das CTMs, células coradas e não coradas

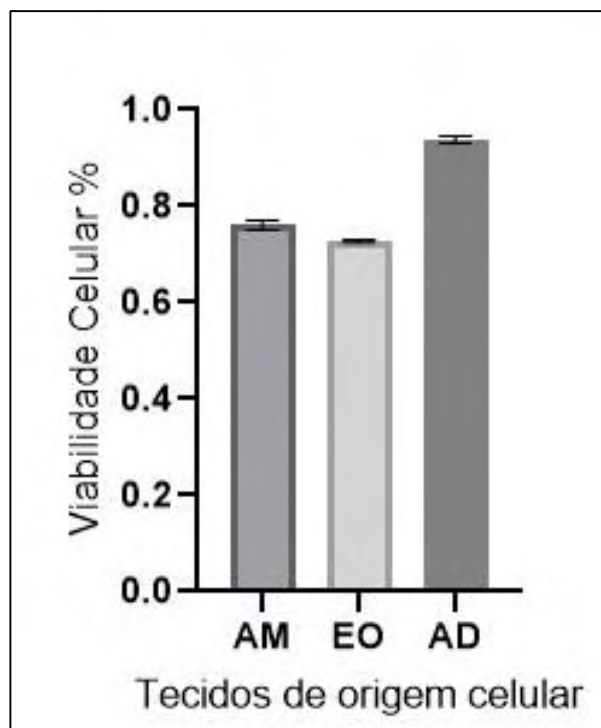


Fonte: Própria autoria.

Legenda: Figura de quadrantes da câmara de newbauer com células inviáveis apontadas com setas, coradas com triplan blue; A- Células do âmnio; B- Células do tecido do epitélio olfatório; C- Células do tecido adiposo. Barra: 250 µm.

As células a demonstrar maior viabilidade quando quantificadas em Câmara de Newbauer foram as isoladas do tecido adiposo (93,78%) seguido das oriundas, do âmnio (76,04%) e pelas do epitélio olfatório (72,67%), como demonstrado na figura do histograma abaixo (Figura 15).

Figura 15- Análise de viabilidade das CTMs pós descongelamento

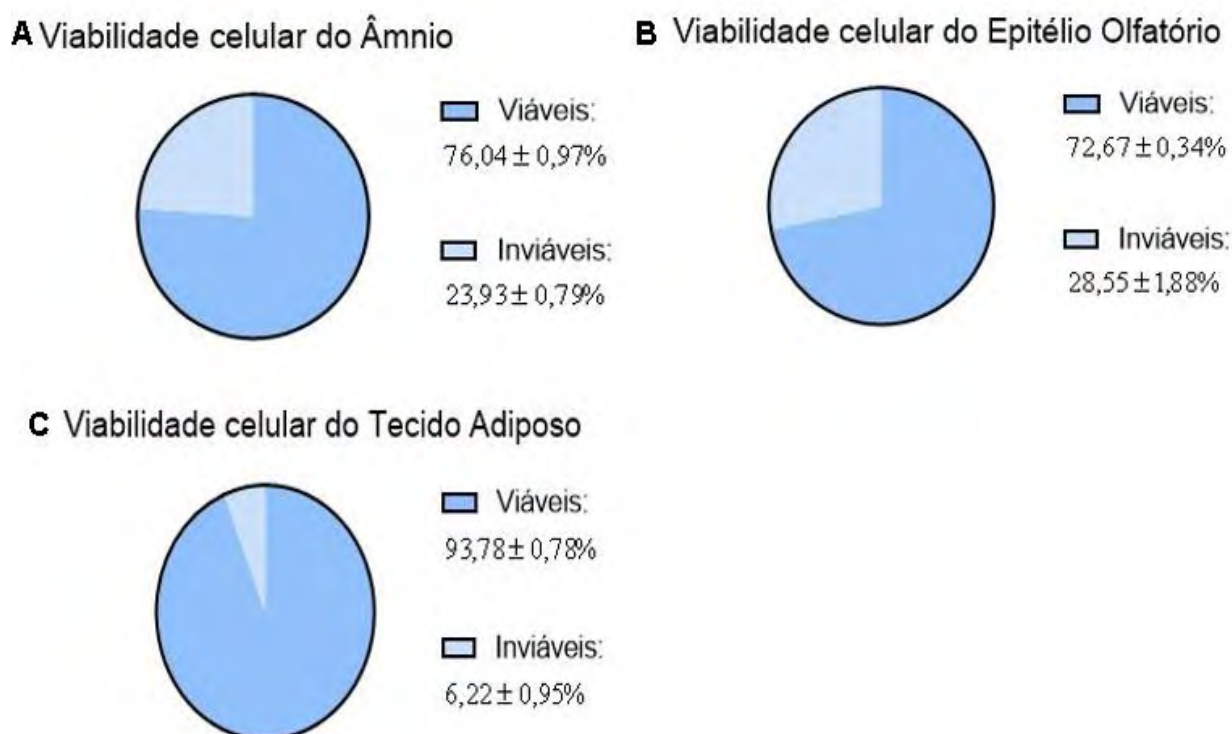


Fonte: Própria autoria.

Legenda: Figura do histograma da viabilidade celular dos tecidos do âmnio (AM), epitélio olfatório (EO) e tecido adiposo (AD), imediatamente pós descongelamento e quantificação em câmara de newbauer, com o teste de exclusão por azul de tripan.

A relação entre células viáveis e inviáveis (Figura 16) demonstrou que as CTMs dos tecidos do âmnio, adiposo e epitélio olfatório, apresentaram variações porém se mantiveram acima de 70% pós criopreservação e descongelamento.

Figura 16- Viabilidade das CTMs, relação entre viáveis e inviáveis



Fonte: Própria autoria.

Legenda: Figura da relação entre células viáveis e inviáveis, pós coloração com azul de tripan e quantificação em câmara de newbauer, analisadas por média e desvio padrão; A- viabilidade e inviabilidade de células do âmnio; B- viabilidade e inviabilidade de células do epitélio olfatório; C- viabilidade e inviabilidade de células tecido adiposo.

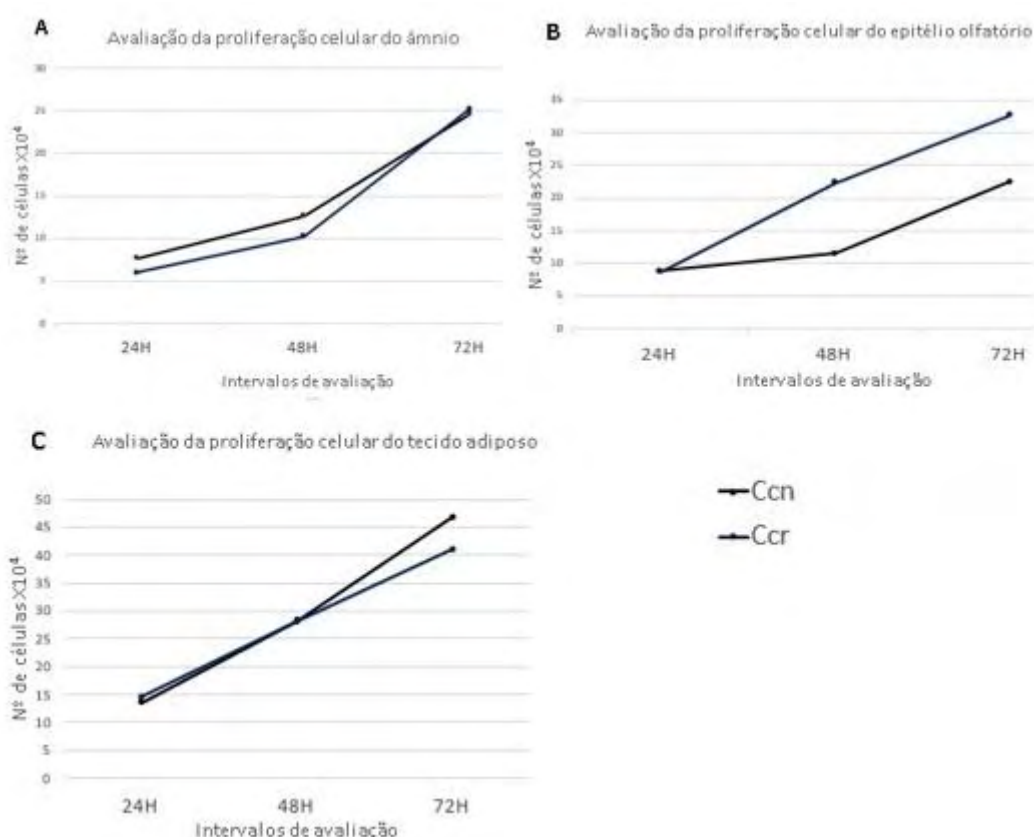
5.2.2 Avaliação da proliferação celular *in vitro*

As curvas se mostraram ascendentes nas células oriundas dos três tecidos, e em comparação aos grupos controle (Cnc) e grupo 1 (Ccr) (Figura 19).

As células advindas do âmnio, demonstraram similaridades porém com discreta ascendência do grupo controle quando comparado ao grupo 1 nos períodos de 24 e 48 horas. Porém no período de 72 horas, houve discreta ascendência da curva no grupo 1 (Figura 17 A).

A avaliação de proliferação das células do epitélio olfatório, demonstrou nos períodos de 24, 48 e 72 horas curva ascendente, sendo demonstrada quando comparados os grupos controle e grupo 1, com maior proliferação em todos os períodos no grupo 1 (Figura 17 B).

A proliferação das células do tecido adiposo apresentou curva ascendente em todos os períodos, sendo no período de 24 horas, quando comparado os grupos controle e grupo 1, houve uma discreta ascensão do grupo 1, no período de 48 horas os grupos se mostram similares, porém na avaliação da curva no período de 72 horas o grupo controle apresenta densidade maior quando comparado ao grupo controle (Figura 17 C).

Figura 17- Avaliação da proliferação das CTMs *in vitro*

Fonte: Própria autoria.

Legenda: A – Curva de crescimento das células isoladas de âmnio; B – Curva de crescimento das células obtidas do epitélio olfatório; C – Curva de crescimento das células do tecido adiposo; Nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, do grupo controle (Ccn) e grupo 1(Ccr).

5.2.3 2º Avaliação da viabilidade celular *in vitro* através da atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial, analisada através do ensaio de viabilidade com MTT, demonstrou diferenças entre os grupos avaliados ($P < 0,05$) (Tabela 13), com exceção das CTMs do tecido adiposo no período de 48 e 72 horas, os quais não apresentaram diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

Tabela 13- Avaliação da atividade mitocondrial

	Grupo controle/ Ccn			Grupo 1/ Ccr		
	AM	EO	AD	AM	EO	AD
24H	26±0,04%	12±0,03%	30±0,05%	16±0,04%	12±0,05%	37±0,04%
48H	57±0,11%	55±0,13%	81±0,12%	33±0,06%	44±0,12%	64±0,10%
72H	128±0,23%	84±0,06%	141±0,23%	125±0,32%	83±0,06%	187±0,26%
		Períodos	CTMs AM	CTMs EO	CTMs AD	
P*		24H	<001	0,840	0,478	
		48H	<001	0,068	0,012	
		72H	0,551	0,453	0,024	

Fonte: Coutinho (2023).

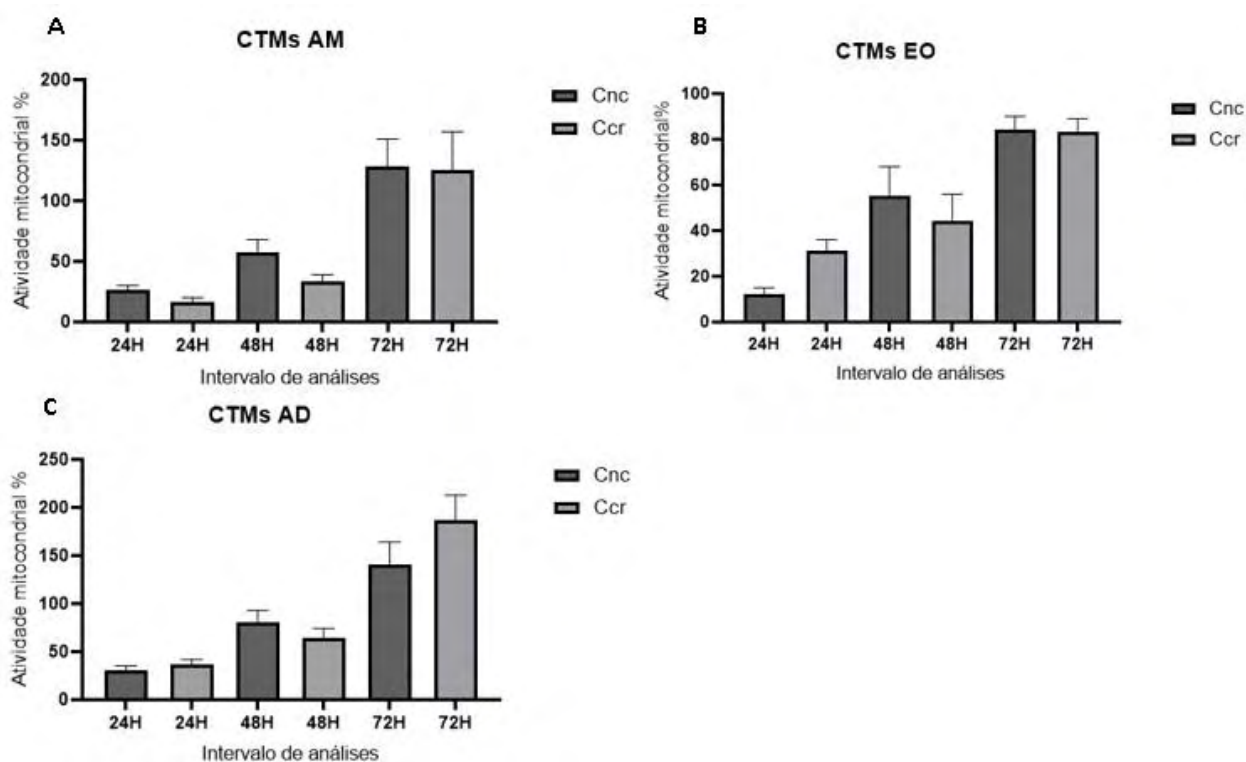
Legenda: Média +- desvio padrão; P*.

A atividade mitocondrial se manteve em evidente elevação no grupo controle (Cnc) em todos os períodos avaliados nas CTMs do âmnio, sendo a avaliação mais perto da homogênea, diferindo em apenas 3%, do grupo controle para o grupo 1 (Ccr) no período de 72 horas (Figura 18 A).

As CTMs do epitélio olfatório apresentaram uma atividade mitocondrial com elevação maior no grupo 1 em comparação ao grupo controle no período de 24 horas, porém no período de 48 horas o aumento passou a ser do grupo controle. No período analisado de 72 horas, o grupo 1 diferiu em menos de 1% em comparação ao grupo controle (Figura 18 B).

A avaliação da atividade mitocondrial das CTMs do tecido adiposo apresentaram aumentos no período de 24 e 72 horas, sendo de 7% e 45 % respectivamente quando comparado o grupo 1 ao controle, a viabilidade só foi inferior no grupo 1 no período de 72 horas, sendo menor em 10% (Figura 18 C).

Figura 18- Atividade mitocondrial



Fonte: Propria autoria.

Legenda: Cnc- Células não criopreservadas; Ccr- Células criopreservadas recuperadas; AM- âmnio; EO- epitélio olfatório; AD- tecido adiposo; H- horas.

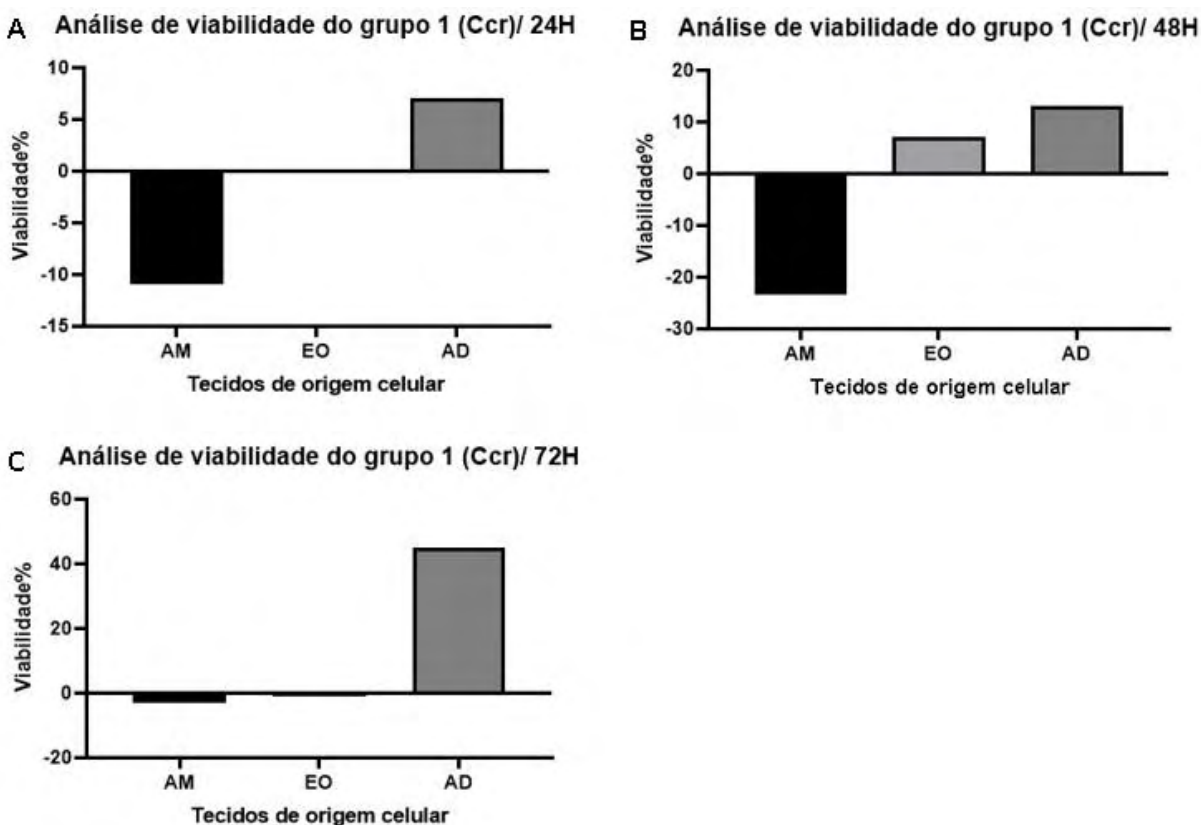
Quando comparada a viabilidade do grupo 1 (Ccr) ao grupo controle (Cnc), através da atividade mitocondrial, pelo teste de MTT, as CTMs do âmnio apresentaram nos períodos avaliados uma viabilidade reduzida em comparação ao grupo controle, sendo 11% menor no período inicial de 24 horas, aumentando para uma viabilidade de 23,50 %

a menos no período de 48 horas e diminuindo para menos 3 % nas 72 horas da análise (Figura 19 A).

A viabilidade das CTMs do epitélio olfatório no grupo 1 se apresentou homogênea no período de 24 horas, tendo um aumento de 7% nas 48 horas analisadas e diminuindo em 1% nas 72 horas em comparação ao grupo controle (Figura 19 B).

As CTMs do tecido adiposo no grupo 1 apresentaram viabilidade maior quando comparadas ao grupo controle em todos os intervalos avaliados, sendo de 7, 13 e 45 %, nos intervalos de 24,48 e 72 horas respectivamente (Figura 19 C).

Figura 19- Atividade da viabilidade mitocondrial do grupo 1 (Ccr) em comparação ao grupo controle (Cnc).



Fonte: Própria autoria.

Legenda: Ccr- Células criopreservadas recuperadas; AM- âmnio; EO- epitélio olfatório; AD- tecido adiposo.

6 DISCUSSÃO

6.1 EXPERIMENTO 1- CARACTERÍSTICAS DAS CTM DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPITÉLIO OLFATÓRIO.

6.1.1 Morfologia celular, diferenciação, curva de crescimento

Inicialmente, o cultivo das linhagens de CTM de âmnio, tecido adiposo e epitélio olfatório, de fetos caninos e terço final de gestação (42-63 dias), com base na metodologia descrita por Alves et al. (2010), Park et al. (2012) e Alves et al.(2017) respectivamente, usados em modelo canino. Realizando-se o isolamento e cultivo das células de âmnio, tecido adiposo e epitélio olfatório, que se mostraram heterogêneas e proliferativas, com células de morfologia fibroblástóide, e aderência ao plástico, sendo uma das características iniciais das CTMs (DOMINICI et al., 2006; BYDLOWSKI et al., 2009; MAURO et al., 2010; FILIOLI URÂNIO et al., 2011; PARK et al., 2012; SAULNIER et al., 2016; CARDOSO et al., 2016; BORGHESI et al., 2017).

As CTMs do âmnio, tecido adiposo e epitélio olfatório foram induzidas a diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica. As células apresentaram capacidade a diferenciação nas três linhagens como descrito anteriormente por Scassiotti et al. (2023), quanto as células provenientes do âmnio, as do tecido adiposo, por Kim et al. (2022), bem como as do epitélio olfatório por Delorme et al. (2010), sendo o período de indução o suficiente para a diferenciação satisfatório, que se mostra contrário ao relatado por Kozłowska et al. (2019), que citou a baixa ou nula diferenciação das CTMs provenientes do âmnio e tecido adiposo na linhagem adipogênica, sugerindo ser necessário a adaptação no período de indução a diferenciação.

Foram analisadas as curvas de crescimento das CTMs obtidas dos três tecidos, âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo. A curva de crescimento das CTMs obtidos do âmnio, aqui apresentado, demonstrou fase ascendente até a oitava passagem, seguida pela fase de declínio da 9ª à 14ª passagens, resultado contrário ao relatado por Vidane et al. (2014) e Karam et al. (2019) aos quais relatam fase ascendente até a passagem de número 2, seguida de fase de declínio progressivo até a passagem de número 5 já apresentando senescência celular.

As CTMs do epitélio olfatório apresentaram curva ascendente até a passagem de número 5 (P5) com pico em P6 e fase de declínio progressivo até P11, corroborando com Vidane et al. (2014) que citaram crescimento progressivo nas passagens iniciais indicando proliferação acentuada nesse período, com declínio nas passagens posteriores. Porém os

achados neste trabalho contradizem os resultados encontrados por Oliveira et al. (2016) que relatou a fase ascendente até a 3ª passagem.

A curva de crescimento das CTMs obtidas do tecido adiposo neste estudo apresentaram fase de ascensão até a passagem de número 8, com posterior declínio e senescência na passagem de número 14, resultado que corrobora com os achados de Russell et al. (2016) e com Aliborzi et al. (2016).

6.1.2 Expressão imunofenotípica

Quanto a expressão dos marcadores, as CTMs do âmnio apresentaram marcação positiva somente para o CD 90 (14%), discordando dos achados por Tsuji et al. (2017) ao qual relatou a expressão quase nula do mesmo, porém demonstrando a baixa marcação do CD 44 que no presente trabalho apresentou menos de 1% de expressão.

As CTMs do epitélio olfatório apresentaram marcação positiva para o CD 90 (86,5 %) conforme já demonstrado por Pinheiro et al. (2016), porém a expressão dos marcadores CD44 e CD 105 se apresentaram baixas com menos de 1% em contrapartida á resultados encontrados por Veron et al. (2018).

A expressão das CTMs do tecido adiposo, para o CD 90 (87,8%) bem como para o CD 44 (90,2%) foram positivas como demonstrado também por Humenik et al. (2023). A expressão dos marcadores hematopoiéticos como o CD 34 e CD 45 como já descrito por Alves et al. (2017) abaixo de 1%.

As células CTMs do tecido adiposo foram as que mais apresentaram expressões de marcadores mesenquimais.

6.2 EXPERIMENTO 2- ANÁLISE DA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E DANOS MORFOLÓGICOS PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DAS CTM DE ÂMNIO, TECIDO ADIPOSEO E EPITÉLIO OLFATÓRIO.

6.2.1 Período e solução de congelamento

O período de avaliação quanto a criopreservação, em estudos anteriores, vem sendo de curto a prolongado. No presente estudo decidiu-se pela utilização de 30 dias, período este já descrito por Woods et al. (2009), Temmerman et al. (2010) e Vasconcelos et al. (2011).

O meio de congelamento não é descrito ou padronizado para fontes de células específicas, sendo utilizado o de CT com mais frequentemente, composto de DMSO (10%) e SFB (45%). Mediante a falta de protocolos específicos, não há um consenso, voltado à

fontes de CTMs, para apoiar o uso de concentrações de DMSO bem como da solução a qual ele será diluído (WU et al., 2012; RENZI et al., 2012).

Estudos anteriores corroboram com o crioprotetor utilizado no presente estudo, Katkovet et al. (2011) relatou o uso do DMSO como superior, quando analisada a viabilidade celular pós criopreservação.

Sendo assim no presente estudo, a diluição feita conforme descrito anteriormente por Chen et al. (2013) e Balci, Can (2013), com 10% de DMSO, tendo sido amplamente utilizada na criopreservação celular de diversas fontes. Diante da viabilidade superior a 70%, apresentada pelas CTMs advindas dos três tecidos, o presente estudo corrobora com a utilização do DMSO como crio protetor bem como com a porcentagem utilizada e descrita anteriormente.

6.2.2 Avaliação de viabilidade pelo teste de exclusão por azul de tripan

Estudos anteriores aos quais analisaram a viabilidade pós criopreservação através do teste de exclusão por azul de tripan demonstraram uma porcentagem de 20 a 30 % de morte celular pós descongelamento (GALIPEAU, 2013). A viabilidade pós descongelamento das CTMs do âmnio (76,04%), epitélio olfatório (72,67%) e tecido adiposo (93,78%), descritas neste estudo, se mostra aceitável, pois os três tecidos avaliados apresentaram viabilidade superior a 70% como descrito anteriormente por Lee et al. (2005) e Ginis et al. (2012). Comparativamente, foi observado uma viabilidade maior nas CTMs do tecido adiposo, seguido do âmnio e por último do epitélio olfatório.

6.2.3 Avaliação da proliferação celular *in vitro*

As curvas de crescimento dos três tecidos, quando avaliadas no grupo controle (Cnc) e grupo 1 (Ccr) se apresentaram ascendentes, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas como descrito por Gonda et al. (2008), quando avaliadas células adiposas humanas, que também relatou uma maior proliferação apresentada pelo grupo controle quando comparado ao grupo criopreservado.

Os resultado obtido neste trabalho quanto a curva pós criopreservação das CTMs obtidas do eptélio olfatório, que apresentou uma proliferação mais acentuada no grupo 1 (Ccr), resultado este encontrado também por Ginani et al. (2012) em análises realizadas com CTMs do tecido adiposo de camundongos.

6.2.4 Avaliação da atividade mitocondrial

Quanto a avaliação mitocondrial, as CTMs do âmnio apresentaram resultados no presente estudo que corroboram com Nitsch et al. (2014) ao qual descreveu, em estudos

realizados em CTMs de medula óssea de macacos, uma menor atividade metabólica quando comparadas células criopreservadas e não criopreservadas, porém os resultados obtidos neste estudo quanto as CTMs do tecido adiposo, apresentam discordância quanto ao apresentado, haja visto que a atividade metabólica do mesmo foi superior no grupo de células congeladas recuperadas quando comparadas ao grupo controle.

A atividade avaliada nos períodos de 24, 48 e 72 horas, no presente estudo corroboram com os achados de Lauterboeck et al. (2016), que relatam a atividade metabólica em CTMs de medula óssea em macacos, como prejudicada nas 48 horas analisadas, com posterior recuperação às 72 horas, sendo controverso para as CTMs do epitélio olfatório ao qual nas 48 horas avaliadas apresentou evidente melhora da atividade mitocondrial e para as CTMs do tecido adiposo que se mostrou em todos os períodos uma atividade metabólica elevada quando comparados o grupo 1 (Ccr) ao grupo controle (Cnc).

Quando comparadas as três fontes de células tronco no presente estudo, a atividade metabólica mitocondrial do tecido adiposo se mostrou elevada nos dois grupos estudados.

As CTMs do epitélio olfatório por sua vez apresentaram variações dentro dos períodos avaliados, porém demonstrou um início de estabilidade na análise feita no período de 72 horas.

A atividade metabólica do âmnio foi a que mais diferiu nas primeiras duas análises sendo elas nos períodos de 24 e 48 horas, mas demonstrou recuperação na sua via metabólica no períodos de 72 horas.

7 CONCLUSÃO

Diante das análises e resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que as CT oriundas do âmnio, epitélio olfatório e tecido adiposo apresentam características de CTMs como morfologia fibroblastóide e aderência à placa, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, marcação positiva para pelo menos um marcador monoclonal mesenquimal, bem como marcação negativa para os marcadores de células tronco hematopoiéticas.

Quanto a análise de criopreservação, logo após o descongelamento a viabilidade das CTMs oriunda dos três tecidos se mostrou promissora, mediante a porcentagem descrita na literatura de até 70 % em células criopreservadas como desejável, mediante aplicação terapêutica. Quando comparadas as três fontes de CTMs, podemos ressaltar a viabilidade superior das advindas do tecido adiposo, seguidas pelas do âmnio e por último as do epitélio olfatório.

Para a análise de proliferação celular, diante dos achados, as curvas de crescimento das CTMs dos três tecidos apresentaram fase de ascendência homogênea ou superior quando comparado os grupos controle e grupo 1, o que demonstra no período avaliado atividade proliferativa normal sem alterações mediante congelamento, dentro dos períodos estudados.

Quanto a atividade metabólica mitocondrial, apesar dos grupos avaliados apresentarem diferença estatística significativa dentro dos intervalos de 24 e 48 horas, as CTMs dos três tecidos analisados apresentaram nas 72 horas uma recuperação e resposta positiva, o que reforça a relação direta do processo de criopreservação ao processo de apoptose celular bem, como a necessidade de avaliações tardias quanto ao descongelamento.

Quando comparadas as três fontes de CTMs, quanto a atividade metabólica dentro dos grupos, controle sendo as não congeladas e as do grupo 1 sendo as congeladas recuperadas, podemos sugerir a superioridade das CTMs advindas do tecido adiposo, as quais apresentaram viabilidade superior as não congeladas em todos os períodos analisados, seguida das CTMs do epitélio olfatório e por último as do âmnio.

Conclui-se diante das análises que mais estudos voltados a criopreservação de CTMs com protocolos específicos para cada tecido de origem se faz de suma importância, haja visto a diferença metabólica e resistência celular.

Análises em diferentes períodos são necessárias para avaliar a relação de apoptose com respostas tardias ao congelamento, fato esse demonstrado quando comparada a análise de viabilidade pós descongelamento imediato e a resposta obtida através da avaliação metabólica, as quais demonstraram diferenças significativas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULRAZZAK, H. et al. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. London: **The Journal Royal Society Interface**, v. 7, p 689-706, 2010.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 336, 2015.

ALIBORZI, G. A. Isolamento, caracterização e comparação da cinética de crescimento da medula óssea e células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de cobaia. *Int. J. London: Células Tronco*. 9 :115–123, 2016.

ALVES, Endrigo G. L. et al. Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. Belo Horizonte: **BCM Veterinary Reserarch**, v. 10, n.190, p. 1746-6148, 2014.

ALVES, E. G. L. et al. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo e da medula óssea de cães. Rio de Janeiro: **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, p. 1-14, 2017.

ALVES, F. R. **Avaliação da cultura de células-tronco do epitélio olfatório de cães sem raça definida (Canis Familiares Linnaeus, 1758)**. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) Departamento de Cirurgia Universidade de São Paulo, São Paulo, 138 f. 2009.

ALVES, F. R. et al. Establishment of a protocol for obtention of neuronal stem cells lineagens from the dog olfactory epithelium. São Paulo: **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 363-372, 2010.

AMBRÓSIO, C. E. et al. Potential application of amniotic stem cells in veterinary medicine. São Paulo: **Animal Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2019.

BAČENKOVÁ, D. et al. Isolation and basic characterization of human term amnion and chorion mesenchymal stromal cells. Slovakia: **Cytotherapy**. v. 13, n. 9, p. 1047-1056, 2011.

BAER, P. C. Adipose derived mesenchymal stromal/stem cells: an update on their phenotype in vivo and in vitro. Baltimore: **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 3, p. 256-265, 2014.

BARBOSA, J. H. S. et al. Uso de terapia celular com células tronco nas especialidades médicas no Brasil: revisão sistemática. São Paulo: **Revista Uningá**, v.55, n.1, p. 85-100, 2018.

BARRY, F. P. et al. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. EUA: **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 4, p. 568-584, 2004.

Baust JG, Gao D, Baust JM. Criopreservação: Uma mudança de paradigma emergente. USA. *Organogênese*. 2009; 5:90–96.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. USA: **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. Poland: **Folia Histochemica et Cytobiologia**, v.44, n. 4, p. 215-230, 2006.

BJÖRKMAN, N. Placentação. In: Dellman, H. e Brox, EM, Eds., *Histologia Veterinária*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1982.

BORGHESI, J. et al. Phenotype and multipotency of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) amniotic stem cells. London: **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, p.1-14, 2017.

BOTTEGA, A. et al. Células tronco adultas no tratamento da diabetes mellitus tipo 1: uma revisão de literatura. Rio Grande do Sul: **Revista Saúde Santa Maria**, v. 44, n. 1, p. 1-9, 2018.

BONGSO, A.; RICHARDS, M. History and perspective of stem cell research. Singapore: **Best Practice & Research, Clinical obstetrics & Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 827-842, 2004.

BUHL, T. et al. Controlled-rate freezer cryopreservation of highly concentrated peripheral blood mononuclear cells results in higher cell yields and superior autologous T-cell stimulation for dendritic cell-based immunotherapy. Germany. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Nov;61(11):2021.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. São Paulo: **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, supl. 1, p. 25-35, 2009.

CARDOSO, M. T. et al. Characterization of teratogenic potential and gene expression. in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. Berlin: **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 1-7, 2016.

CARMO, D. D. D.; SANTOS Jr, A. R. **Aplicação clínica de CT**. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC SIC-UFABC, 2, 2009, Santo André. Anais... Santo André, 2009. p. 1-3.

CASPAR-BAUGUILS, S. et al. Adipose tissues as na ancestral imune organ: site-specific change in obesity. França: **Federation of European Biochemical Societies**, v. 579, p. 3487-3492, 2005.

CHEN, L. et al. **Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing**. San Francisco: *PLoS One*, v. 3, n. 4, p. 1-12, 2008.

CRISOSTOMO, P. R. et al. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK- dependent mechanism. Bethesda: **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 294, p. 675-682, 2008.

CRUVINEL, W. M. et al. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. São Paulo: *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUNHA, C. F. et al. **Citometria de Fluxo: Imunofenotipagem e Avaliação da Produção de Citocinas**. Curso de verão, Instituto Oswaldo Cruz, p. 1-93, 2012.

CURTI, A. et al. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. Washington: **Blood**, v. 113, n. 11, p. 2394-2401, 2009.

DELORME B, Nivet E, Gaillard J, et al. O nariz humano abriga um nicho de células-tronco ectomesenquimais olfativas com propriedades neurogênicas e osteogênicas. Barcelona: **Células-tronco Dev.** 19 :853–866, 2010.

DEUS, G. C. et al. Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais de filtros reutilizáveis e descartáveis de medula óssea. São Paulo: **Journal einsten**, v.10, n. 3, p. 296-301, 2012.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy positions statement. Langford **Lane: Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

Duan W., Lopez MJ, Hicok K. Criopreservação de células estromais multipotentes adultas: vantagens e armadilhas. *Veterinario. Cirurg.* 2018; 47 :19–29. doi: 10.1111/vsu.12730.

ERCOLIN, A. C. et al. Rabbit olfactory stem cells. Isolation protocol and characterization. São Paulo: **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 59-66, 2016.

EROL, O. D. et al. Effects of storage media, supplements and cryopreservation methods on quality of stem cells. Turkey: *Wold Journal of Stem Cells*, v. 13, n. 9, 2021.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, Berlin, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

FAITA, T. et al. Membrana amniótica: fonte alternativa de CT mesenquimais em diversas espécies animais. Rio de Janeiro: **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 520-525, 2016.

FAVARON, P. O. et al. The amniotic membrane: Development and potential applications- a review. São Paulo: **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, n. 6, p. 881-892, 2015.

FERNANDES, R. A. et al. Placental tissues as sources of stem cells—Review. São Paulo: **Open Journal of Animal Sciences**, v. 2, n. 3, 2012.

FISHER, G. J. et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. USA: **Arch Dermatol**, v. 138, n. 11, p. 1462-1470, 2002.

GALIPEAU, J. The mesenchymal stromal cells dilemma--does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? **Cytotherapy**. Jan;15(1):2-8, 2013.

GINANI, F. et al. Influência de um protocolo de criopreservação no rendimento in vitro de células-tronco derivadas do tecido adiposo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, p. 359-363, 2012.

GRIVTSOVA, L.Y. et al. Cell Biobank as a Necessary Infrastructure for the Development and Implementation of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy in the Treatment of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. Literature Review and Own Data. **Cardiovasc. Ther. Prev.** 2020;19:205–216. doi: 10.15829/1728-8800-2020-2733.

GRAZIADEI, P. P. C. et al. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. Flórida: **Journal of Neurocytology**, v. 8, n. 1, p. 1-18, 1979.

GRINFELD, S.; GOMES, R. G. C. Celulas-tronco: um breve estudo. Recife: **International Journal of Dentistry**, V. 3, p. 324-329, 2004.

GRITSAEV, S. V. et al. Método de criopreservação de células-tronco hematopoiéticas para transplante autólogo. Diretrizes. 2015; 151 :3–41.

HAQUE, N., ABU KASIM, N. H.; RAHMAN, M. T. Otimização das condições pré-transplante para aumentar a eficácia das células-tronco mesenquimais. **Int. J. Biol. ciência** 2015; 11 :324–334, 2015.

HASSENKLOEVER, T.; SCHWARTZ, P.; DETLEV, S. **Purinergic Signaling Regulates Cell Proliferation of Olfactory Epithelium Progenitors**. EUA: *Stem Cells*, v.27, p.2022-2031, 2009.

HAO, J. et al. Requisitos gerais para células-tronco. *Cel Prolif.* 53 (12), 2020.

HUMENIK, F. et al. A Comparative Study of Canine Mesenchymal Stem Cells Isolated from Different Sources. **Animals (Basel)**. 2022 Jun 9;12(12):1502, 2022.

HUO, S.; SHI, P.; PANG, X. Culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells. China: **Chinese Medical Sciences Journal**, v. 25, n. 4, p. 211-214, 2013.

ISILDAR, B. et al. Comparison of different cryopreservation protocols for human umbilical cord tissue as source of mesenchymal stem cells. Turkey: **Acta Histochemica**, v. 121, n. 3, p. 361-367, 2019.

JANG, W.; KIM, K. P.; SCHWOOB, J. E. Nonintegrin laminin receptor precursor protein is expressed on olfactory stem and progenitor cells. Massachusetts: **The Journal of Comparative Neurology**, v. 502, n. 3, p. 367-381, 2007.

JANG, T. H. et al. Criopreservação e suas aplicações clínicas. **Integr. med. res.** 6 :12–18, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, ed. 10, 2004.

JURGA, M. et al. Neurogenic potential of human umbilical cord blood: Neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. Poland: **Jornal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 4, p. 627-637, 2006.

KAMAT, P. et al. Adipose tissue and the vascularization of biomaterials: stem cells, microvascular fragments and nanofat- a review. Suíça: **Cytherapy International Society**, v. 22, p. 400-411, 2020.

KARIMINEKOO, S. et al. Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. Artificial Cells. London: **Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, p. 749-757, 2016.

KATKOV, I.I. et al. DMSO-free programmed cryopreservation of fully dissociated and adherent human induced pluripotent Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

KIM S. Y. et al. Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles Derived from Canine Adipose Tissue Ameliorates Inflammation, Skin Barrier Function and Pruritus by Reducing JAK/STAT Signaling in Atopic Dermatitis. **Int J Mol Sci**. Apr 27;23 (9), 2022.

KMIECIK, G. et al. Fetal membranes as a source of stem cells. Poland: **Advances in Medical Sciences**, v. 58, n. 2, p. 185-195, 2013.

KOLIOS, G. et al. Introduction to stem cells and regenerative medicine. Australia: **Respiration Thematic review series**, v. 83, p. 3-10, 2013.

KOZLOWSKA, U. et al. Semelhanças e diferenças entre células-tronco/progenitoras mesenquimais derivadas de vários tecidos humanos. **Mundo J. Células-tronco**. 11 :347–374, 2019

KRAMPERA, M. et al. **Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells**. Basel: Stem Cells, v. 24, p. 386-398, 2006.

LAFFEY, J.; HAYES, M. **Faculty Opinions recommendation of Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells**. The International Society for Cellular Therapy position statement. In *Faculty Opinions—Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature*; Taylor Francis Group: Abingdon, UK, v. 8, p. 315-317, 2011.

LAUTERBOECK, L. et al. Xeno-Free Cryopreservation of bone marrow-derived multipotent stromal cells from *Callithrix jacchus*. **Biopreserv Biobank**. 14: 530–538, 2016.

LAKSHMIPATHY, U. et al. Stem cell plasticity. Califórnia: **Blood Reviews**, v.19, n.1, p. 29-38, 2005.

LAZZAROTTO, S. C. **Estudos moleculares de células tronco mesenquimais cultivadas *in vitro***, tese (doutorado em oncologia) INCA-Instituto nacional do cancer, Rio de Janeiro, p. 159, 2009.

Le Blanc K., Davies LC MSCs — Cells with Many Sides. USA. *Citoterapia*. 20:273–278, 2018.

LEE, S. et al. ADSC-Based Cell Therapies for Musculoskeletal Disorders: A Review of Recent Clinical Trials. Korea: **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 19, 2021.

LIMA, S. A. F. et al. Diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. São Paulo: **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, 2012.

LO, B., PARHAM, L. Ethical issues in stem cell research. California: **Endocrine Society**, v. 30, n.3, 2009.

MACHADO, L. S. et al. Células-tronco pluripotentes induzidas (células iPS) em animais domésticos e a possibilidade de geração *in vitro* de gametas. Belo Horizonte: **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 42, n. 3-4, p. 114-119, 2018.

MACKAY-SIM, A. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. Itália: **Archives Italiennes de Biologie**, v. 148, p. 47-58, 2010.

MARCUS, A. WOODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. New Jersey: **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 3, p. 730-742, 2008.

MARTI, L. C.; RIBEIRO, A. A. F.; HAMERSCHLAK, N. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. São Paulo: **Einstein**, v. 9, n. 2, p. 224-228, 2011.

MARTINELLO, T. et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Res Vet Sci**. 91(1):18-24, 2011.

MAURO, A. et al. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. Dordrecht: **Veterinary Research Communications**, v. 34, p. 25-28, 2010.

MAZZARELLA, R. et al. Células-tronco derivadas do epitélio olfatório: perspectivas terapêuticas na medicina veterinária. São Paulo: **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 787-792, 2016.

MIZUNO, H. M. D. et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. Los Angeles: **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 109, p. 199-209, 2002.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. **Células-tronco mesenquimais**. Santa Maria: *Ciência Rural*, v. 40, n. 1, p. 238-245, 2010.

MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. L. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. London: **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, 54, p. 1-15, 2013

MURRELL, W. et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. Australia: **Developmental Dynamics American Association for Anatomy**, v. 233, p. 496-515, 2005.

NADERI, N. et al. The regenerative role of adipose-derived stem cells (ADSC) in plastic and reconstructive surgery. United Kingdom: **International Wound Journal**, v. 14, n. 1, p. 112-124, 2017.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. **Immunomodulatory properties of mesenchymal of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues**. Washington: *Transplantation*, v. 6, p. 230-247, 2007.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. **Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells**. Washington: *Blood*, v. 110, n. 10, p. 3499-3506, 2007.

NERY, A. A. et al. **Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications**. Hoboken: *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, v. 83, n. 1, p. 48-61, 2013.

NITSCH, S. Impact of cryopreservation on histone modifications of mesenchymal stem cells. Germany. **Biomedizinische Technik**. 59: S294–S297, 2014.

NONES, J.; REHEN, S. Perspectivas para a aplicação de células tronco embrionárias na

clínica veterinária. Londrina: **PUB Vet**, v. 2, n. 45, 2008.

OLIVEIRA, L. **Análise por citometria de fluxo do co-cultivo de células musculares esqueléticas e células tronco-mesenquimais para regeneração miocárdica**, Dissertação (mestrado), Centro de Ciências Biológicas e de Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, p.94, 2006.

PAPACCIO, G. et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. **J Cell Physiol**, 208(2):319-25, 2006.

PARK, Sang-Bum et al. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. Korae: **Journal Plos-One**, v.7, 2012.

PEREIRA, P. N. G. et al. Amnion formation in the mouse embryo: the single amniochorionic fold model. Belgium: **BMC Developmental Biology**, v.11, n. 48, p. 1-13, 2011.

PETERSEN, E. D. et al. Neural Stem Cells Derived Directly from Adipose Tissue. Michigan: **Stem Cells and Development**, v.27, n. 9, 2017.

PINHEIRO, A. O. et al. Controversial results of therapy with mesenchymal stem cells in the acute phase of canine distemper disease. **Genet Mol Res**. May 23;15, 2016.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. São Paulo: **Science Research Library Core**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI Mesenchymal Stem Cell Perspective: Cell Biology to Clinical Progress. *NPJ Reg. Med.* 4:22, 2019

PIERI, N. C. G. et al. Comparative development of embryonic age by organogenesis in domestic dogs and cats. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 50, p. 625–631. 2015.

PRANKE, P. A importância de discutir o uso de células tronco embrionárias para fins terapêuticos: São Paulo: **Ciência e Cultura** online, v. 56, n. 3, 2004.

RASMUSSEN, I. et al. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. New York: **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 4, p. 887-893, 2007.

RAUTIAINEN, S.; LAAKSONEN, T.; KOIVINIEMI, R. Angiogenic Effects and Crosstalk of Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles with Endothelial Cells. Finland: **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 19, 2021.

RUSSELL, K. A. et al. O Lisado de Plaquetas Caninas é Inferior ao Soro Fetal Bovino para o Isolamento e Propagação de Células Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo Canino e da Medula Óssea. **PLoS One**. 2015; 10 (9):1–14, 2015.

RUSSELL, K. A. Caracterização e efeitos imunomoduladores de tecido adiposo canino e células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea. **PLoS One**. 11 :e167442, 2011.

SCASSIOTTI, R. F. et al. Adipose and amnion-derived mesenchymal stem cells: Extracellular vesicles characterization and implication for reproductive biotechnology. *Brazil. Theriogenology* 198, 264-272, 2023.

SAMUELSON, D. A. **Tratado de Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

SÁNCHEZ-BERNÁ, I.; SANTIAGO-DÍAZ, C.; JIMÉNEZ-ALONSO, J. **Immunomodulatory properties of stem mesenchymal cells in autoimmune diseases**. Barcelona: Medicina Clínica, v. 144, n. 2, p. 88-91, 2015.

SATUCCI, M. et al. Monitoring of stem cells from adipose tissue injected via retrobulbar next to previously injured optic nerve of rabbits. São Paulo: **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 78, n. 6, 2019.

SAULNIER, N. et al. Canine placenta: a promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells. Amsterdam: **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 171, n. 47-55, 2016.

SEGURA, D. C. A. et al. Células-tronco: as células capazes de gerar outros tipos de células. São Paulo: **Arquivo Ciência Saúde Unipar Umuarama**, v. 11, n. 2, p. 115-152, 2007.

SEO, M.S. et al. Isolation and Characterization of Feline Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells. Korea: **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 2, 2021.

SO-YOUNG C. et al. Human Fibroblast Growth Factor-Treated Adipose-Derived Stem Cells Facilitate Wound Healing and Revascularization in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus, **CELLS**, V. 12, p. 1146.

SCHLARB D. Lipoaspiração. *Hautarzt*. 2018; 69 :165–176, 2018.

STAHL, N. et al. Association and Activation of Jak-Tyk Kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β Receptor Components. Nova York: **Science**, v. 263, p. 92-95, 1994.

STOCUM, D. L. Stem cells in regenerative biology and medicine. Hoboken: **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, p. 429-42, 2001.

STREETZ, K. L. Interleukin 6 and liver regeneration. Alemanha: **Gut**, v. 47, p. 309-312, 2000.

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.

SUELZU, C.M. et al. Xenobiotic-Free Medium Guarantees Expansion of Adipose Tissue-Derived Canine Mesenchymal Stem Cells Both in 3D Fibrin-Based Matrices and in 2D Plastic Surface Cultures. *Cells* 2020, 9, 2578. <https://doi.org/10.3390/cells9122578>

SUZUKI, E. et al. Adipose tissue derived stem cells as a therapeutic tool for cardiovascular disease. Japan: **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 8, p. 454-465, 2015.

TEMMERMAN, L. et al. Influence of cryopreservation on the pulpal tissue of immature third molars in vitro. **Cell Tissue Bank**.11 (3):281-9, 2010.

THIRUMALA, S. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. **Biotechnol Prog**. 21(5):1511-24, 2005.

TAKEUCHI, C. A.; TANNURI, U. A polêmica da utilização de células-tronco embrionárias

com fins terapêuticos. São Paulo: **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 2, 2006.

TSUJI, K. Efeitos de diferentes métodos de separação de células na viabilidade e na expressão de antígenos de superfície celular de células-tronco mesenquimais sinoviais. **Transplante Celular**. 26 :1089–1102, 2017.

URÂNIO, M. F. et al. Isolation, proliferation, cytogenetic and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. Italy: **Molecular Reproduction & Development**, v. 78, p. 361-373, 2011.

Urânio, M. F. et al. Characterization and in vitro differentiation potency of early-passage canine amnion and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as related to gestational age. Molecular. Italy: **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, p. 539– 551, 2014.

VASCONCELOS, R. G. et al. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. **Cell Tissue Bank**. 3 (3):461-9, 2011.

VERON, A. D. et al. Isolation and characterization of olfactory ecto-mesenchymal stem cells from eight mammalian genera. **BMC Vet Res**. Jan 17;14(1):17, 2018.

VIDANE, A. S. et al. Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. Macclesfield: **Stem Cells and Cloning: advances and applications**, v. 7, p. 71-78, 2014.

VITA, B. D. et al. Anexos fetais: uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais para a medicina veterinária eqüina. São Paulo: **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.1, p.8-22, 2012.

ZACHAR, L.; BAČENKOVÁ, D.; ROSOCHA, J. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. Macclesfield: **Journal of Inflammation Research**, v. 9, p. 231-240, 2016.

Zubin, E. et al. **Terapia regenerativa para o tratamento de uma grande ferida cutânea em um cão**. Clinical Case Reports, v. 3, p. 598-603, 2015.

ZUK, Patrícia A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, Los Angeles: **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279-4295, 2002.

WANG, Y. et al. **Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications**. New York: Nature Immunology, v. 15, n. 11, p. 1009-1016, 2014.

WEATHERBEE, B.; CUI, T.; ZERNICKA-GOETZ, M. Modeling human embryo development with embryonic and extra-embryonic stem cells. Dev Biol. 2021.

WOODS, E.J. et al. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. **Cryobiology** 59(2):150-7, 2009.

WON, C. H. et al. The Basic Mechanism of Hair Growth Stimulation by Adipose-derived Stem Cells and Their Secretory Factors. Korea: **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 7, p. 535-543, 2017

WRIGHT, A. et al. A Protocol for the Isolation, Culture, and Cryopreservation of Umbilical Cord-Derived Canine Mesenchymal Stromal Cells: Role of Cell Attachment in Long-Term Maintenance. Manhattan: **Stem Cells and Development**, v. 29, n. 11, p. 695-713, 2020.

