



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINARIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTRATÉGIAS PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DE TECIDO
ADIPOSO BOVINO**

CAMILA YAMAGUTI LENOCH

LAGES, 2015

CAMILA YAMAGUTI LENOCH

**ESTRATÉGIAS PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO
ADIPOSO BOVINO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Ubirajara Maciel da Costa

LAGES, SC

2015

L569e Lench, Camila Yamaguti
Estratégias para a criopreservação de células
tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino /
Camila Yamaguti Lench. - Lages, 2015.
87 p.: il.; 21 cm

Orientador: Ubirajara Maciel da Costa

Bibliografia: p. 74-87

Dissertação (mestrado) - Universidade do
Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2015.

1. Células tronco mesenquimais. 2.
Crioprotetores. 3. Viabilidade celular. I. Lench,
Camila Yamaguti. II. Costa, Ubirajara Maciel da.
III. Universidade do Estado de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV.
Titulo

CDD: 575.1 - 20.ed.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do
CAV/ UDESC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado força, paciência e sabedoria durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Faltam palavras para demonstrar toda a minha gratidão e meu amor à minha família, meu pai Robert, minha mãe Célia e meu irmão Rafael. Muito obrigada pelo amor incondicional, por todo carinho desprendido, por serem meu porto seguro e por estarem sempre ao meu lado me dando todo o apoio e ajuda necessários.

Agradeço às minhas bolsistas, estagiárias e, acima de tudo, amigas: Raquel Alves, Jalanna Spilmann, Fernanda Boldo, Jamili Velho e Beatriz Range. Obrigada por toda a ajuda que vocês me deram tanto no meu mestrado quanto na minha vida pessoal.

Aos meus colegas de mestrado Cláudia Duarte e Elvis Ticiani que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

À minha amiga/irmã Larissa Drumm, que mesmo longe fisicamente sempre esteve bem pertinho de mim dentro do meu coração. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos!

Ao Gustavo por todo amor, todo carinho, pelo apoio, pela compreensão, por me fazer uma pessoa melhor e por melhorar muito a minha vida.

Ao meu orientador Ubirajara e à Fabiana Forell pela oportunidade. E aos meus colegas de laboratório Flávia Yamakawa e Igor Nunes.

Muito obrigada a todos vocês!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

LENOCH, CAMILA YAMAGUTI. Estratégias para a criopreservação de células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino. 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de concentração: Sanidade Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

As células tronco mesenquimais representam uma grande promessa para o tratamento de inúmeras doenças tanto congênitas quanto adquiridas. Porém, quando submetidas ao cultivo contínuo em laboratório, os riscos de contaminações e de mutações genéticas aumentam, sendo necessário então mantê-las em temperaturas criogênicas. Para isso, é imprescindível o uso de substâncias crioprotetoras. O DMSO é o crioprotetor de eleição, porém alguns trabalhos afirmam que este pode induzir a diferenciação das células tronco em células neuronais, além de apresentar alta toxicidade em temperatura ambiente. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar crioprotetores alternativos ao DMSO para a criopreservação das células tronco mesenquimais e comparar a eficiência dos mesmos. Para tanto, estas células foram isoladas, a partir de tecido adiposo bovino, através da digestão enzimática com colagenase a 0,075% e colocadas em meio de cultivo DMEM + 10% SFB a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram congeladas na concentração de 10⁶ células/mL em DMEM + 10% SFB com três tratamentos diferentes: (1) 10% Etilenoglicol (EG), (2) 10% Propilenoglicol (PG) e (3) 10% Dimetilsulfóxido (DMSO). Uma parte das células tronco mesenquimais foi mantida em cultivo para ser utilizada como controle nos testes realizados. Após permanecerem por, pelo menos, 48 horas em botijão de

nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria a 37°C, determinada a sobrevivência celular imediata através do método de exclusão de células mortas por coloração com azul de Tripan a 0,4% e realizados a curva de crescimento celular e o teste de *Population Doubling Time* (PDT). Também foi feito o teste de viabilidade celular através do reagente WST-1 e determinada a capacidade de diferenciação destas células em células dos tecidos ósseo e adiposo. Os resultados foram analisados pelo pacote estatístico SAS, por meio do procedimento GLM, adotando-se um nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os tratamentos com EG (72,9%) e PG (71,7%) quanto a sobrevivência celular imediata, entretanto o DMSO (86,4%) apresentou um resultado significativamente superior em relação aos demais. Os três crioprotetores não demonstraram diferença estatística entre si na formação da curva de crescimento celular, porém, todos foram inferiores ao controle não criopreservado. Quanto ao PDT, também não houve diferença significativa entre os três tratamentos (EG: 28 h; PG: 26,7 h; DMSO: 27,2 h), mas todos apresentaram um tempo de duplicação de suas populações estatisticamente maior do que o controle (21,3 h). A viabilidade celular, através do reagente WST-1, das células criopreservadas com EG, PG e DMSO foram, respectivamente, 66,65%, 71,42% e 83,62%. O PG não diferiu estatisticamente dos demais crioprotetores, mas o DMSO apresentou diferença significativa em relação ao EG. E tanto as células submetidas aos três tratamentos como as utilizadas como controle conseguiram se diferenciar em células dos tecidos ósseo e adiposo. Conclui-se, portanto, que a criopreservação influencia na sobrevivência, na taxa de multiplicação e na viabilidade celular, mas mesmo assim pode ser utilizada para armazenar as células tronco mesenquimais, já que os danos causados não inviabilizam as mesmas. E tanto o EG como o PG podem ser utilizados como uma alternativa ao DMSO na criopreservação destas células,

pois durante os experimentos realizados apresentaram resultados tecnicamente viáveis.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais; Crioprotetores; Viabilidade celular

ABSTRACT

LENOCH, CAMILA YAMAGUTI. Strategies for cryopreservation of mesenchymal stem cells from bovine adipose tissue. 2015. 87 f. Dissertation (Master's degree in Animal Science – Area: Animal Health). Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2015.

The mesenchymal stem cells are a great promise for the treatment of many both congenital as acquired diseases. However, when they are subject to continuous cultivation in the laboratory, the risks of contamination and genetic mutations increase, being necessary to keep them at cryogenic temperatures. For this, the use of cryoprotectant substances is indispensable. The DMSO is the preferred cryoprotector, but some studies claim that it can induce the differentiation of stem cells into neuronal cells, as well as having high toxicity at room temperature. Therefore, the aim of this study was to test alternative cryoprotectants to DMSO for cryopreservation of mesenchymal stem cells and compare their efficiency. For this, these cells were isolated from bovine adipose tissue by enzymatic digestion with collagenase 0.075% and placed in DMEM + 10% FBS culture medium at 37°C with 5% of CO₂. Then, the cells were frozen at a concentration of 10⁶ cells/mL in DMEM + 10% FBS with three different treatments: (1) 10% ethylene glycol (EG), (2) 10% propylene glycol (PG) and (3) 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). A part of mesenchymal stem cells were maintained in culture for use as controls in the tests performed. After stay for, at least, 48 hours in a liquid nitrogen cylinder, they were thawed in a water bath at 37°C, determined the immediate cell survival by the exclusion of dead cells by the

staining with Trypan blue 0.4% method and performed the cell growth curve and the population doubling time test (PDT). Was also done the cell viability test using the WST-1 reagent and determined the differentiation capacity of these cells in cells of bone and adipose tissues. The results were analyzed using the SAS statistical package, by GLM procedure, adopting a 5% significance level. There was no statistical difference between treatments with EG (72.9%) and PG (71.7%) about the immediate cell survival, however DMSO (86.4%) had a significantly higher result than the others. The three cryoprotectants showed no statistical difference among them in the formation of the cell growth curve, however, all were lower than the not cryopreserved control. As the PDT test, there was no significant difference among the three treatments (EG: 28 h; PG: 26.7 h; DMSO: 27.2 h), but all of them had a doubling time of their populations statistically higher than the control (21.3 h). The cell viability, through the WST-1 reagent, of the cells cryopreserved with EG, PG and DMSO were respectively 66.65%, 71.42% and 83.62%. PG did not differ statistically from the other cryoprotectants, but the DMSO showed a significant difference from the EG. And both cells subjected to three treatments as those used as controls were able to differentiate into cells of bone and adipose tissues. It follows therefore that cryopreservation influences in the cell survival, cell multiplication rate and cell viability, but still can be used to store the mesenchymal stem cells, because the damage caused don't make them unviable. And both EG and PG may be used as an alternative to DMSO for the cryopreservation of these cells, since they presented technically viable results.

Key-words: Mesenchymal stem cells; Cryoprotectants; Cell viability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO

FIGURA 1. Curva de crescimento celular após a criopreservação.	61
FIGURA 2. Taxas de viabilidade celular após a criopreservação.	62
FIGURA 3. Células diferenciadas em osteoblastos.	63
FIGURA 4. Células diferenciadas em adipócitos.	63

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

TABELA 1. Sobrevivência celular imediata após o descongelamento.	60
TABELA 2. Curva de crescimento celular.	60
TABELA 3. <i>Population Doubling Time</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cMYC	Gene Cmyc
CT	Células Tronco
CTE	Células Tronco Embrionárias
CTA	Células Tronco Adultas
CTH	Células Tronco Hematopoiéticas
CTM	Células Tronco Mesenquimais
Dr	Doutor
DMSO	Dimetilsulfóxido
KLF-4	<i>Kruppel-Like Factor 4</i>
OCT-4	<i>Octamer-Binding Transcription Factor 4</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
SOX-2	<i>(Sex Determining Region Y) Box 2</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

ARTIGO

CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CEDIMA	Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal
CT	Células Tronco
CTM	Células Tronco Mesenquimais
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EG	Etilenoglicol
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)</i>
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UV	Ultravioleta
PDT	<i>Population Doubling Time</i>
PG	Propilenoglicol
SAS	Statistical Analysis System

SFB
WST-1

Soro Fetal Bovino
(2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-
disulfofenil)-2H-tetrazólio, sal
monosódico)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Célsius
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

ARTIGO

°C	Graus Célsius
cm ³	Centímetros cúbicos
x	Veze
mg	Miligramma
mL	Mililitro
%	Porcentagem
g	Gravidade
mm	Milimetro
cm ²	Centímetros quadrados
μL	Microlitro
nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	31
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1 CÉLULA TRONCO.....	33
2.1.1 Células tronco embrionárias (CTE).....	34
2.1.2 Células tronco adultas (CTA).....	35
2.1.2.1 Células tronco hematopoiéticas (CTH).....	37
2.1.2.2 Células tronco mesenquimais (CTM).....	38
2.2 PRINCIPAIS FONTES DE CÉLULAS TRONCO.....	40
2.2.1 Medula óssea.....	40
2.2.2 Tecido adiposo.....	41
2.3 CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR.....	42
2.3.1 Crioprotetores.....	44
2.3.1.1 Crioprotetores extracelulares.....	46
2.3.1.2 Crioprotetores intracelulares.....	46
3 ARTIGO.....	48
3.1 INTRODUÇÃO.....	51
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.2.1 Coleta de tecido adiposo.....	53
3.2.2 Isolamento das CTM.....	54
3.2.3 Cultivo das CTM.....	55
3.2.4 Criopreservação.....	55
3.2.5 Descongelamento.....	56
3.2.6 Determinação da sobrevivência celular imediata.....	56
3.2.7 Determinação da curva de crescimento celular.....	56
3.2.8 Determinação do PDT (<i>Population Doubling Time</i>)..	57
3.2.9 Teste de viabilidade celular através do reagente WST-1 [(2-(iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico)].....	57
3.2.10 Determinação da capacidade de diferenciação em células especializadas.....	58
3.2.10.1 Diferenciação Osteogênica.....	58
3.2.10.2 Diferenciação Adipogênica.....	59

3.3 RESULTADOS.....	59
3.3.1 Determinação da sobrevivência celular imediata.....	60
3.3.2 Determinação da curva de crescimento celular.....	60
3.3.3 Determinação do PDT (<i>Population Doubling Time</i>)....	61
3.3.4 Teste de viabilidade celular através do reagente WST-1.....	61
3.3.5 Determinação da capacidade de diferenciação em células especializadas.....	62
3.3.5.1 Diferenciação Osteogênica.....	62
3.3.5.2 Diferenciação Adipogênica.....	63
3.4 DISCUSSÃO.....	64
3.5 CONCLUSÕES.....	68
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	73
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

As células tronco são células indiferenciadas. Suas principais características são: (1) a sua capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado, o que proporciona uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos, e (2) a sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (LEMISCHKA, 2005). Portanto, estas células presentes em vários tecidos possuem um papel regenerativo quando estes sofrem algum tipo de lesão ou injúria (BLAU; BRAZELTON; WEIMANN, 2001; FORDOR, 2003) e até mesmo para repor as células perdidas na maturação e no envelhecimento, ou seja, as células tronco são responsáveis pela homeostase dos tecidos do organismo, o que faz com que sejam uma grande promessa para uso em protocolos de reparação e regeneração tecidual (BARRY; MURPHY, 2004). Sendo, atualmente, a fonte mais abundante de possíveis estratégias terapêuticas para várias doenças tanto congênitas quanto adquiridas (ARMSTRONG *et al.*, 2012).

Quando as células são submetidas ao cultivo contínuo em laboratório, os riscos de contaminações e de mutações genéticas aumentam, além de implicar também em despesas econômicas e desprendimento de tempo (GRAHAM, 1996). O resfriamento das células a temperaturas pouco superiores a 0° C reduz o seu metabolismo, mas não o interrompe completamente, de forma que as células continuam sofrendo o processo de deterioração progressiva, apenas em menor velocidade (MERYMAN, 1971). Por isso, é necessário o uso de técnicas que permitam estabilizar e manter as características e a viabilidade destas células em temperaturas criogênicas (GRAHAM, 1996).

Para minimizar os danos causados pela criopreservação, é necessário o uso de crioprotetores, que são substâncias químicas que agem interna ou externamente protegendo a célula

da formação de gelo intracelular (CÓRDOVA-CABALLERO *et al.*, 2002). Os crioprotetores são divididos em duas classes principais: os intracelulares, que penetram na célula e previnem a formação de cristais de gelo e, conseqüentemente, a ruptura da membrana celular; e os, extracelulares que não conseguem penetrar na membrana celular e agem reduzindo os efeitos hiperosmóticos presentes no processo de congelamento (DAVIS *et al.*, 1990).

O DMSO é um crioprotetor intracelular e é o mais utilizado para a criopreservação de células tronco, pois promove uma alta taxa de sobrevivência celular após o descongelamento (NEUHUBER *et al.*, 2004; SYME *et al.*, 2004). Alguns grupos de pesquisa, entretanto, também afirmam que o DMSO pode induzir estas células a se diferenciarem em células neuronais (WOODBURY *et al.*, 2000; NEUHUBER *et al.*, 2004; SYME *et al.*, 2004). Segundo JANZ *et al.* (2012), infelizmente não há muitos crioprotetores disponíveis atualmente, pois as outras substâncias como o glicerol, a sacarose ou a trealose, apesar de não apresentarem citotoxicidade, ainda precisam ser melhor estudadas quanto ao uso em células tronco.

Portanto, o objetivo deste estudo é testar crioprotetores alternativos ao DMSO para a criopreservação das células tronco mesenquimais e comparar a eficiência dos mesmos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÉLULA TRONCO

No século XIX, em meio a importantes discussões sobre o desenvolvimento embrionário, foi estabelecido o termo célula tronco (CT). Atualmente são definidas como células com capacidade de autorrenovação e de diferenciação teoricamente ilimitadas. Estas células se originam logo no início do desenvolvimento embrionário e permanecem no organismo por toda a vida adulta (SALEM; THIEMERMANN, 2010).

As CT são capazes de se diferenciar tanto em células do seu tecido de origem quanto em células de outros tecidos, permanecendo funcional *in vivo* (WEISSMAN, 2000). Estas células podem ter origem embrionária, sendo denominadas então células tronco embrionárias (CTE) (PEREIRA, 2008) ou podem estar presentes em tecidos adultos, sendo denominadas células tronco adultas (CTA). As CTA podem ser divididas em dois grandes grupos: células tronco hematopoiéticas (CTH), que estão presentes na medula óssea, e células tronco mesenquimais (CTM), que podem ser encontradas em diversos locais, como: medula óssea, sangue periférico, sangue do cordão umbilical e placentário, polpa dental, folículo capilar e gordura (MAZZETTI *et al.*, 2010).

As CT também podem ser classificadas conforme o grau de plasticidade, que é o potencial de diferenciação em tecidos variados, em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes (ZATZ, 2004).

As CT totipotentes podem dar origem tanto a um organismo totalmente funcional quanto a qualquer tipo celular do corpo, incluindo todo o sistema nervoso central e periférico (GAGE, 2000), e possuem a capacidade de formar até mesmo as células dos folhetos extra-embrionários, que originarão a placenta e os demais anexos responsáveis pelo suporte ao

embrião (ROBEY, 2000). Correspondem às primeiras células formadas a partir da fertilização do ovócito II e se mantêm no embrião até o estágio de quatro a oito células, desaparecendo em seguida (LOVELL, MATHUR, 2004; SALEM; THIEMERMANN, 2010).

Já as CT pluripotentes são “menos indiferenciadas” e surgem da evolução da mórula ao blastocisto, compondo a sua massa celular interna. Podem originar os três tecidos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma), ou seja, qualquer tipo de tecido (LOVELL, MATHUR, 2004; SALEM; THIEMERMANN, 2010), mas não um organismo completo, pois não podem gerar a placenta e outros tecidos embrionários de apoio ao feto (ROBEY, 2000). Também estão presentes em indivíduos adultos, mas em menor quantidade (GAGE, 2000).

As CT multipotentes estão presentes no indivíduo adulto e são um pouco mais diferenciadas, portanto, possuem a capacidade de originar apenas um número limitado de tecidos. São denominadas de acordo com o órgão do qual derivam e realizam a regeneração tecidual local (GAGE, 2000; SALEM; THIEMERMANN, 2010).

E as CT unipotentes são derivadas das CT multipotentes, distinguindo-se destas por exibirem uma capacidade de diferenciação restrita a uma dada linhagem celular ou até mesmo a um único tipo celular. Como, por exemplo, as CT da epiderme interfolicular (LOVELL, MATHUR, 2004) e a CT espermatogonial (BAKSH *et al.*, 2004; YARAK; OKAMOTO, 2010).

2.1.1 Células tronco embrionárias (CTE)

Após a fertilização, o ovócito formará um organismo complexo, composto por mais de 200 tipos de células diferentes. As primeiras células do zigoto podem se diferenciar em todas as linhagens celulares, incluindo anexos embrionários. Nesta fase,

as células são classificadas como totipotentes, ou seja, possuem a capacidade de gerar um organismo completo mantidas pelo zigoto e seus descendentes até o estágio de mórula. Após estas divisões iniciais, ocorrem os processos de diferenciações primárias, formando o blastocisto, que possui uma forma de esfera oca, na qual as células mais externas são denominadas de trofoblastos e originarão os tecidos extra-embrionários e a massa celular interna de células que formará o embrião propriamente dito. Estas células da massa celular interna são pluripotentes, pois não apresentam um potencial de diferenciação tão completo quanto às células anteriores, já que são capazes de originar todas as estruturas do embrião, mas não os anexos embrionários (ALBERTS *et al.*, 2010).

As CTE são definidas por sua origem e são derivadas, principalmente, do estágio de blastocisto do embrião (KIRSCHSTEIN; SKIRBOLL, 2001a). O blastocisto tem a capacidade de originar todos os órgãos do organismo (KIRSCHSTEIN; SKIRBOLL, 2001b), o que confere as CTE uma grande plasticidade, sendo classificadas como totipotentes ou pluripotentes, dependendo do período do desenvolvimento do embrião em que são coletadas (ZATZ, 2004). E, devido à grande capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação destas células, surgiu o interesse em utilizá-las para regenerar tecidos. Entretanto, para que isso fosse possível, precisariam ser desenvolvidos protocolos de isolamento das mesmas, o que ocorreu inicialmente a partir de blastocistos de ratos e possibilitou o desenvolvimento de técnicas para o seu cultivo em laboratório (EVANS; KAUFMAN, 1981).

2.1.2 Células tronco adultas (CTA)

As CTA estão presentes em todos os tecidos do organismo e apresentam grande potencial de proliferação e diferenciação em diversos tipos celulares, não apenas de origem

mesodermal, mas também de origens ectodermal e endodermal (ZUK *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2005; MOON *et al.*, 2008). Porém, possuem um potencial de diferenciação menor que as CTE e são classificadas como multipotentes (ZUK *et al.*, 2002).

As CTA têm sido isoladas e caracterizadas a partir de diferentes tecidos do corpo, como medula óssea, cordão umbilical, encéfalo, epitélio, polpa dentária e tecido adiposo (BARRY; MURPHY, 2004). Estão predominantemente nas fases G0 e G1 do ciclo celular, em estado quiescente ou de baixa proliferação (GRITTI *et al.*, 2002), e, através de inúmeras interações com o microambiente do nicho onde se situam, podem iniciar suas divisões e diferenciações em células mais especializadas. Mais especificamente, as CTA e as células suporte ou estromais interagem reciprocamente formando diversas conexões intercelulares, como junções aderentes e do tipo *gap* para manter a integridade do tecido e controlar o equilíbrio entre os estados quiescente e proliferativo (ARAI; HIRAO; OHMURA, 2004; FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004). Por serem responsáveis por manter a homeostase dos tecidos ao repor as células que foram perdidas na maturação, no envelhecimento ou por algum dano, as CTA representam uma grande promessa para uso em protocolos de reparação e regeneração tecidual (BARRY; MURPHY, 2004).

As primeiras CTA descobertas e, conseqüentemente, melhor caracterizadas são as células tronco hematopoiéticas provenientes da medula óssea (HIRAO; ARAI; SUDA, 2004), as quais são capazes de originar os constituintes mielóides (monócitos e macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos/plaquetas e células dendríticas) e linfóides (linfócitos T, linfócitos B e *serial killers*) do sangue, e são utilizadas com sucesso em transplantes autólogos para pacientes que tiveram câncer e estão se recuperando do tratamento quimioterápico. Posteriormente, foi isolado um outro tipo de CTA também presente na medula óssea, porém com

características diferentes das células tronco hematopoiéticas, eram as células tronco mesenquimais, que receberam essa denominação porque derivam do folheto embrionário intermediário, a mesoderme (JAIN, 1986).

2.1.2.1 Células tronco hematopoiéticas (CTH)

As CTH têm origem mesenquimal e estão presentes no saco vitelínico embrionário durante a vida intrauterina. Posteriormente, migram para o fígado, baço, linfonodos e timo fetal por via hematogênica. A partir da metade do período de vida intrauterina, a hematopoese passa a ocorrer na medula óssea, que se torna o principal sítio hematopoiético do final da gestação até a vida adulta (JAIN, 1986). As CTH são responsáveis pela manutenção e proteção do sistema imune de todos os tipos celulares do corpo, sendo elas as principais responsáveis também pela constante renovação e produção de bilhões de células sanguíneas diariamente (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1968). A principal fonte de CTH é a medula óssea, mas também estão presentes no sangue periférico, no sangue proveniente do cordão umbilical e no sistema hematopoiético fetal (NEGRIN, 2000; LAUGHLIN, 2001).

A maioria das CTH está na fase de repouso (G₀) do ciclo celular e há pouca atividade no compartimento destas células, que é onde ocorre a auto-renovação das mesmas e a manutenção da hematopoese pela proliferação clônica (GASPER, 2000). As CTH são as únicas células do sistema hematopoiético que exibem potencial proliferativo extensivo e capacidade de se diferenciar em todas as células do sistema linfo-hematopoiético continuamente até a morte do organismo (GASPER, 2000; HERZOG *et al.*, 2003).

Morfologicamente, as CTH assemelham-se a pequenos linfócitos. Possuem alta razão núcleo-citoplasma, nucléolo proeminente e citoplasma basofílico destituído de grânulos

(GASPER, 2000). Recentes trabalhos utilizando CTH de humanos revelaram que estas células também possuem a capacidade de diferenciação em células não hematopoiéticas de vários tecidos; como, por exemplo, células do fígado (ALISON *et al.*, 2000), do sistema nervoso central (MEZEY *et al.*, 2000; JIN *et al.*, 2002), dos rins (KALE *et al.*, 2003), do pâncreas (IANUS *et al.*, 2003), dos pulmões (THEISE *et al.*, 2002), da pele (BADIAVAS *et al.*, 2003), do trato gastrointestinal (OKAMOTO *et al.*, 2002), do coração (ORLIC *et al.*, 2001) e do músculo esquelético (FERRARI *et al.*, 1998).

Atualmente estas células são utilizadas para o tratamento de diversas doenças oncohematológicas, como leucemias e doenças linfoproliferativas (FLEMING; HUBEL, 2006), e hematológicas, como Wiskott-Aldrich (PARKMAN *et al.*, 1978), anemia de Falconi (BARRETT *et al.*, 1977), anemia aplástica severa (STORB *et al.*, 1976), dentre outras, através de transplantes tanto autógenos quanto alogenos (LOCATELLI, 1998).

2.1.2.2 Células tronco mesenquimais (CTM)

As CTM foram descritas primeiramente por Friedenstein e sua equipe em 1974, que as isolaram da medula óssea de ratos e descreveram a obtenção de uma fração celular pouco abundante, não fagocítica, não hematopoética, fibroblastóide, com propriedade de adesão ao plástico (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974) e de formação de colônias (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001; JAVASON *et al.*, 2001). Além da medula óssea, as CTM podem ser isoladas de vários outros tecidos, como polpa dentária (YOON *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2008), tecido ósseo (LOHMANN, 2001; WILSON, 2012), placenta, sangue do cordão umbilical, geleia de Wharton, líquido amniótico, âmnio, tuba uterina, sangue venoso periférico, tecido adiposo, fígado, timo, baço, paratireoide, pâncreas, pulmão, periósteo, derme e músculo

estriado esquelético (KRAMPERA *et al.*, 2007; JAZEDJE *et al.*, 2009; SHIH *et al.*, 2009; MOSNA; SENSEBÉ; KRAMPERA, 2010; LIZIER *et al.*, 2012; STRIOGA *et al.*, 2012)

As CTM são tipicamente aderentes ao substrato plástico, com uma morfologia fibroblastóide, e que, *in vitro* e *in vivo*, podem se diferenciar em tecido ósseo, cartilagem, tecido adiposo (DOMINICI *et al.*, 2006), músculos cardíaco e esquelético, células neuronais, células epiteliais, tecido conectivo, células renais e tendões (PITTENGER *et al.*, 1999). Tais características de plasticidade sugerem que as CTM são as responsáveis pelo *turnover* e, não só pela formação, mas também pela manutenção e regeneração de todos os tecidos do organismo durante toda a sua vida (CAPLAN, 2009; WEISSMAN, 2000), portanto, elas representam um tipo celular com aplicações promissoras na medicina regenerativa (WAGNER *et al.*, 2005).

As CTM tornaram-se foco de inúmeras pesquisas no mundo inteiro por fornecerem perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular (MONTEIRO; ARGÔLO NETO; DEL CARLO, 2009). Atualmente, as CTM são a fonte de possíveis estratégias terapêuticas mais abundantes, tanto para doenças congênitas quanto para doenças adquiridas (ARMSTRONG *et al.*, 2012). E, conforme MONTEIRO; ARGÔLO NETO; DEL CARLO (2009), já estão sendo feitos inúmeros estudos para descrever a utilização tanto autógena das CTM quanto alógena na reparação de diversos tecidos. Sendo que a grande aplicação na Medicina Veterinária se deve também à geração de modelos experimentais aplicáveis em humanos.

Para aplicações terapêuticas, pode-se utilizar desde a fração celular mononuclear da medula óssea, a qual contém pequenas quantidades de CTM, até culturas expandidas em laboratório obtidas de diversos tecidos. As culturas de CTM também podem ser aplicadas *in situ* (no local da lesão), isoladas ou combinadas com substitutos do tecido que será reparado e

biomateriais ou através da infusão intravenosa, podendo as células estarem diferenciadas ou não (MONTEIRO *et al.*, 2008).

2.2 PRINCIPAIS FONTES DE CÉLULAS TRONCO

Apesar das muitas fontes de CTM já descritas, dois tecidos são majoritários nos relatos sobre estas células: a medula óssea e o tecido adiposo (SALEM, THIEMERMANN, 2010; TOLAR *et al.*, 2010; STRIOGA *et al.*, 2012). E, segundo ZUK *et al.* (2001), uma fonte de CT ideal deve ser fácil de se conseguir (implicando no mínimo desconforto possível ao paciente) e render uma quantidade inicial de células significativa.

2.2.1 Medula óssea

A medula óssea é um tecido gelatinoso que preenche a cavidade interna de vários ossos e fabrica os elementos figurados do sangue periférico, como hemácias, leucócitos e plaquetas. Sendo que em um indivíduo adulto é um compartimento essencial para hematopoese, pois compõem um microambiente onde diferentes sistemas celulares interagem. Este compartimento denominado de estroma é composto por três tipos celulares: hematopoiético, epitelial e estromal (PROKCOP, 1997). O estroma é composto pelo sistema estromal celular (fibroblastos, células endoteliais, células reticulares, adipócitos e osteoblastos), pela matriz extracelular e por outros tipos celulares, como os macrófagos. E as CT presentes na medula óssea possuem a função de autorrenovação e originam as células que irão se diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo e em tecidos estromais (PHINNEY, 2002).

A medula óssea, tanto de animais quanto de humanos, contém tanto as células tronco hematopoiética quanto as células tronco mesenquimais (ARMSTRONG *et al.*, 2012; MAZZETTI

et al., 2010). Amostras destas células são coletadas comumente através de punção na crista ilíaca, tíbia, fêmur, coluna vertebral, lombar e torácica, de doadores saudáveis e, em seguida, seu isolamento é feito utilizando protocolos específicos (KAISER *et al.*, 2007). Porém, os procedimentos tradicionais de aquisição de CTM a partir da medula óssea podem ser dolorosos, muitas vezes requerem anestesia geral ou epidural, e acabam rendendo um baixo número de células no processamento, que implica em um período de expansão celular maior para se obter um número de células clinicamente significativo; o que leva a, além de um maior consumo de tempo, gastos, riscos de contaminação e perdas (ZUK *et al.*, 2001).

2.2.2 Tecido adiposo

O tecido adiposo tem origem no mesoderma embrionário e possui um estroma formado por células endoteliais, células de músculo liso e adipócitos, que podem ser facilmente digeridos enzimaticamente para liberar as CT (FRASER *et al.*, 2006). O tecido adiposo pode ser classificado em gordura branca e gordura marrom. Ambas estão relacionadas com a regulação da homeostase energética, que é o balanço determinado pela ingestão de macronutrientes, pelo gasto energético e pela termogênese dos alimentos. Este tecido libera diversas moléculas bioativas denominadas adipocitocinas, o que faz com que possua importantes funções endócrinas (TRAYHURN; WOOD, 2004). A gordura marrom funciona como um órgão de dissipação de energia, já a gordura branca é o principal armazenamento de energia do organismo (HIMMS-HAGEM, 1990) e contém, além dos adipócitos, uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos e macrófagos), fibroblastos e células tronco (OSBORNE, 2000; FRUHBECK, 2001).

É clinicamente relevante o número de CTM que podem ser obtidas do tecido adiposo, uma vez que elas possuem maior taxa de proliferação celular do que as CTM adquiridas a partir da medula óssea (ZHU *et al.*, 2008). MAZZETTI *et al.* (2010) também concluiu que o tecido adiposo é uma excelente alternativa para obtenção de CTM com boa viabilidade, pois as células obtidas a partir dele conseguem proliferar rapidamente e possuem a capacidade de formar colônias, o que sugere então que elas podem ter a capacidade de formar tecidos e órgãos.

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR

A conservação de células, tecidos ou qualquer amostra biológica, em temperatura negativa utilizando um crioprotetor, com o objetivo de manter a amostra íntegra para ser utilizada em situações posteriores, é denominada de criopreservação. Atualmente a criopreservação de células da medula óssea é um procedimento comum que tem sido empregada com sucesso em transplantes autólogos. Através da criopreservação, são possíveis o armazenamento e o transporte de CT criopreservadas sem danificá-las para o local onde poderão ser utilizadas clinicamente, reduzindo o tempo e elevando a qualidade na realização do procedimento (HUBEL, 1997; FLEMING; HUBEL, 2006).

Para tentar minimizar os efeitos prejudiciais causados pelo processo de congelamento às células, é necessário o uso de uma substância que reverta a formação de cristais de gelo e o problema osmótico, esta substância é denominada de agente crioprotetor (BAUDOT, 2002).

Os primeiros trabalhos com criopreservação foram com sangue completo que era congelado com hidroxietilamido ou pentamido e conservado em nitrogênio, entretanto os fracos resultados de sobrevida celular no pós-congelamento levaram ao abandono dessa técnica. Em 1950, Dr. Smith realizou a

criopreservação de hemácias usando como crioprotetor o glicerol a -80°C usando gelo seco e álcool (VALERI; RAGNO, 2005).

Para maximizar a viabilidade celular durante e após o processo de congelamento são adicionados, junto com solução extracelular, substâncias químicas que agem interna ou externamente protegendo a célula da formação do gelo intracelular. A forma como o crioprotetor age é muito complexa, pois o seu efeito protetor geralmente está ligado à sua habilidade de se unir às moléculas de água ou diretamente na célula alvo para evitar a formação de gelo intracelular (CÓRDOVA-CABALLERO *et al.*, 2002). Segundo PEGG (2006), a utilização de crioprotetores e protocolos com controle de temperatura visa diminuir as perdas celulares inerentes ao processo de congelamento.

As células geralmente resistem à redução da temperatura, porém não suportam a formação de cristais de gelo (WOLFE; BRYANT, 2001). O gelo se forma em diversos momentos do processo de resfriamento. Durante um congelamento lento, o gelo é formado primeiramente no espaço extracelular e depois no interior da célula. Logo, a água tende a sair do compartimento celular, provocando um grande desequilíbrio osmótico, o que leva à desidratação da célula. O aumento na concentração de soluto tanto dentro quanto fora da célula interfere na sobrevivência celular, pois pode gerar lise. Em um congelamento rápido, os efeitos na concentração do soluto são minimizados, já que a formação de gelo ocorre homogeneamente, apesar de haver uma maior concentração de cristais de gelo intracelulares. E, geralmente, as células submetidas à formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas ou lisadas por causa da perda da integridade da membrana, ou seja, ocorre uma lesão mecânica (WOLFE, 2001; BAUDOT *et al.*, 2002).

A curva de resfriamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Geralmente, uma taxa de resfriamento de 1°C por minuto é a mais indicada. A perda de água e a desidratação celular são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de formar grandes cristais de gelo dentro das células, o que ocasionaria danos às estruturas internas e à membrana plasmática. Entretanto, a desidratação severa promove a desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, levando a um colapso de membrana (DALIMATA; GRAHAM, 1997).

2.3.1 Crioprotetores

Os crioprotetores servem para proteger as células durante o congelamento e o descongelamento. São substâncias que evitam a formação de gelo intracelular, reduzem o estresse osmótico através da reposição de água necessária para a manutenção do volume celular, interagem com íons e macromoléculas, reduzem o ponto de congelamento da água e servem como tampão, ajustando as alterações de pH.

A estrutura molecular dos crioprotetores é um parâmetro importante para determinar a eficiência dos mesmos, já que a sua afinidade pela água se deve à presença de grupamentos amina e hidroxila em suas composições, os quais favorecem a formação de pontes de hidrogênio com as moléculas de água (BAUDOT, 2002). Segundo Holt (2000), estas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial às células. A sua ação também interfere nas mudanças físico-químicas que as células sofrem durante o congelamento. E, embora a concentração do crioprotetor seja elevada no meio, sua difusão é de 30 a 60 vezes menor do que a da água, o que faz com que estas moléculas atravessem a membrana plasmática, no caso dos crioprotetores intracelulares,

até atingir o equilíbrio numa velocidade também menor que a da água. Ocasionalmente, portanto, o enrugamento da célula devido à rápida saída de água para diluir a elevada concentração externa, ou seja, o crioprotetor necessita de um período de tempo para penetrar e equilibrar as concentrações intra e extracelulares. E, devido a essas condições, a água retorna ao interior da célula até atingir o equilíbrio osmótico, que resulta na retomada do seu tamanho original.

A definição de protocolos comprovados para o desenvolvimento das tecnologias de preservação das CT é um dos obstáculos ainda a serem superados. Alguns trabalhos têm observado diferenças na viabilidade celular após o descongelamento conforme a substância crioprotetora utilizada. Oichi *et al.* (2008) avaliaram sete diferentes protocolos para criopreservação de células-tronco derivadas de tecido adiposo de camundongos e verificaram as menores porcentagens de viabilidade celular quando foi utilizado DMSO a 10% ou meio de criopreservação com glicerol. Estes autores sugeriram a utilização de substâncias crioprotetoras não tóxicas às células como a trealose (um dissacarídeo de glicose) em vez de DMSO, que apresenta maior toxicidade. Entretanto, Renzi *et al.* (2012) avaliaram a viabilidade após o descongelamento de células estromais obtidas da medula óssea de cavalos, ovelhas e ratos e de tecido adiposo de cavalos, testando quinze soluções de criopreservação com diferentes concentrações de DMSO e de outros crioprotetores, e encontraram os melhores resultados de viabilidade celular com o uso da solução contendo 10% de DMSO. O estudo foi motivado porque estes pesquisadores têm observado, em suas atividades de rotina, uma grande sensibilidade das células estromais da medula óssea de equinos ao processo de congelamento e descongelamento, com grande diminuição do número de células viáveis e da capacidade de replicação.

2.3.1.1 Crioprotetores extracelulares

Os crioprotetores extracelulares são moléculas de alto peso molecular e, portanto, não conseguem atravessar a membrana plasmática (VAJTA; NAGY, 2006; PEREIRA; MARQUES, 2008). Atuam aumentando a osmolaridade do meio extracelular, o que faz com que ocorra a passagem de água do interior da célula para o meio externo, impedindo assim a formação de cristais de gelo em seu interior durante a criopreservação (AMANN; PICKETT, 1987). Outra função destas substâncias é a sua interação com membrana celular, pois exercem uma ação estabilizadora durante as mudanças de um estado relativamente líquido para um estado sólido e, talvez até mais importante, na volta para o estado líquido durante o descongelamento. Ou seja, o crioprotetor parece diminuir a fragilidade das membranas, impedindo que estas se rompam (SEIDEL, 1986).

Essas substâncias exigem protocolos de congelamento e de aquecimento rápidos (McGANN, 1978) e podem ser encontradas na gema de ovo, no leite, em alguns açúcares e na albumina sérica bovina (MOUSSA *et al.*, 2002). São exemplos de crioprotetores extracelulares a lactose, a glicose, a sacarose, a trealose e a polivinilpirrolidona (PVP), a rafinose, o manitol e o sorbitol (NIEMANN, 1991).

2.3.1.2 Crioprotetores intracelulares

Os crioprotetores intracelulares são substâncias que diminuem as lesões de origem química ou mecânica causadas nas células pela criopreservação (KAROW, 2001). As características físico-químicas ideais que um crioprotetor intracelular deve possuir são: baixo peso molecular, o que faz com que eles consigam penetrar nas células durante o congelamento lento (McGANN, 1978), alta solubilidade em

meio aquoso e, principalmente, baixa toxicidade celular (NASH, 1966).

Possuem estruturas que lhes permitem realizar ligações de hidrogênio com as moléculas de água (DALIMATA; GRAHAM, 1997) e, através destas propriedades coligativas, reduzem o ponto crioscópico intracelular, fazendo com que uma maior quantidade de água permaneça no estado líquido quando submetida às baixas temperaturas, o que previne a formação de cristais de gelo no espaço intracelular (WATSON, 2000) e diminui a concentração de soluto nos meios intra e extracelulares (DALIMATA; GRAHAM, 1997). Estas ligações de hidrogênio também promovem uma estabilização da estrutura quaternária das proteínas da membrana, preservando as células da desidratação (KAROW, 2001).

São exemplos de crioprotetores intracelulares o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etilenoglicol, o propilenoglicol e o etanol (BALL; VO, 2001). O DMSO é o crioprotetor de eleição para a criopreservação celular, porém, pode causar danos às células quando submetidas a um elevado tempo de exposição em temperatura ambiente devido a sua alta permeabilidade e alta toxicidade (FRESHNEY, 2000). E alguns grupos de pesquisa também afirmam que o DMSO pode induzir as CTM a se diferenciarem em células neuronais (WOODBURY *et al.*, 2000). Já o etilenoglicol e o propilenoglicol apresentam baixa toxicidade quando utilizados na criopreservação de CTM (KATKOV *et al.*, 2011).

3 ARTIGO

RESUMO

Estratégias para a criopreservação de células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino

As células tronco mesenquimais representam uma grande promessa para o tratamento de inúmeras doenças tanto congênitas quanto adquiridas. Porém, quando submetidas ao cultivo contínuo em laboratório, os riscos de contaminações e de mutações genéticas aumentam, sendo necessário então mantê-las em temperaturas criogênicas. Para isso, é imprescindível o uso de substâncias crioprotetoras. O DMSO é o crioprotetor de eleição, porém alguns trabalhos afirmam que este pode induzir a diferenciação das células tronco em células neuronais, além de apresentar alta toxicidade em temperatura ambiente. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar crioprotetores alternativos ao DMSO para a criopreservação das células tronco mesenquimais e comparar a eficiência dos mesmos. Para tanto, estas células foram isoladas, a partir de tecido adiposo bovino, através da digestão enzimática com colagenase a 0,075% e colocadas em meio de cultivo DMEM + 10% SFB a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram congeladas na concentração de 10⁶ células/mL em DMEM + 10% SFB com três tratamentos diferentes: (1) 10% Etilenoglicol (EG), (2) 10% Propilenoglicol (PG) e (3) 10% Dimetilsulfóxido (DMSO). Uma parte das células tronco mesenquimais foi mantida em cultivo para ser utilizada como controle nos testes realizados. Após permanecerem por, pelo menos, 48 horas em botijão de nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria a 37°C, determinada a sobrevivência celular imediata através do método de exclusão de células mortas por coloração com azul de Tripán a 0,4% e realizados a curva de crescimento celular e o

teste de *Population Doubling Time* (PDT). Também foi feito o teste de viabilidade celular através do reagente WST-1 e determinada a capacidade de diferenciação destas células em células dos tecidos ósseo e adiposo. Os resultados foram analisados pelo pacote estatístico SAS, por meio do procedimento GLM, adotando-se um nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os tratamentos com EG (72,9%) e PG (71,7%) quanto a sobrevivência celular imediata, entretanto o DMSO (86,4%) apresentou um resultado significativamente superior em relação aos demais. Os três crioprotetores não demonstraram diferença estatística entre si na formação da curva de crescimento celular, porém, todos foram inferiores ao controle não criopreservado. Quanto ao PDT, também não houve diferença significativa entre os três tratamentos (EG: 28 h; PG: 26,7 h; DMSO: 27,2 h), mas todos apresentaram um tempo de duplicação de suas populações estatisticamente maior do que o controle (21,3 h). A viabilidade celular, através do reagente WST-1, das células criopreservadas com EG, PG e DMSO foram, respectivamente, 66,65%, 71,42% e 83,62%. O PG não diferiu estatisticamente dos demais crioprotetores, mas o DMSO apresentou diferença significativa em relação ao EG. E tanto as células submetidas aos três tratamentos como as utilizadas como controle conseguiram se diferenciar em células dos tecidos ósseo e adiposo. Conclui-se, portanto, que a criopreservação influencia na sobrevivência, na taxa de multiplicação e na viabilidade celular, mas mesmo assim pode ser utilizada para armazenar as células tronco mesenquimais, já que os danos causados não inviabilizam as mesmas. E tanto o EG como o PG podem ser utilizados como uma alternativa ao DMSO na criopreservação destas células, pois durante os experimentos realizados apresentaram resultados tecnicamente viáveis.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais; Crioprotetores; Viabilidade celular

ABSTRACT

Strategies for cryopreservation of mesenchymal stem cells from bovine adipose tissue

The mesenchymal stem cells are a great promise for the treatment of many both congenital as acquired diseases. However, when they are subject to continuous cultivation in the laboratory, the risks of contamination and genetic mutations increase, being necessary to keep them at cryogenic temperatures. For this, the use of cryoprotectant substances is indispensable. The DMSO is the preferred cryoprotector, but some studies claim that it can induce the differentiation of stem cells into neuronal cells, as well as having high toxicity at room temperature. Therefore, the aim of this study was to test alternative cryoprotectants to DMSO for cryopreservation of mesenchymal stem cells and compare their efficiency. For this, these cells were isolated from bovine adipose tissue by enzymatic digestion with collagenase 0.075% and placed in DMEM + 10% FBS culture medium at 37°C with 5% of CO₂. Then, the cells were frozen at a concentration of 10⁶ cells/mL in DMEM + 10% FBS with three different treatments: (1) 10% ethylene glycol (EG), (2) 10% propylene glycol (PG) and (3) 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). A part of mesenchymal stem cells were maintained in culture for use as controls in the tests performed. After stay for, at least, 48 hours in a liquid nitrogen cylinder, they were thawed in a water bath at 37°C, determined the immediate cell survival by the exclusion of dead cells by the staining with Trypan blue 0.4% method and performed the cell growth curve and the population doubling time test (PDT). Was also done the cell viability test using the WST-1 reagent and

determined the differentiation capacity of these cells in cells of bone and adipose tissues. The results were analyzed using the SAS statistical package, by GLM procedure, adopting a 5% significance level. There was no statistical difference between treatments with EG (72.9%) and PG (71.7%) about the immediate cell survival, however DMSO (86.4%) had a significantly higher result than the others. The three cryoprotectants showed no statistical difference among them in the formation of the cell growth curve, however, all were lower than the not cryopreserved control. As the PDT test, there was no significant difference among the three treatments (EG: 28 h; PG: 26.7 h; DMSO: 27.2 h), but all of them had a doubling time of their populations statistically higher than the control (21.3 h). The cell viability, through the WST-1 reagent, of the cells cryopreserved with EG, PG and DMSO were respectively 66.65%, 71.42% and 83.62%. PG did not differ statistically from the other cryoprotectants, but the DMSO showed a significant difference from the EG. And both cells subjected to three treatments as those used as controls were able to differentiate into cells of bone and adipose tissues. It follows therefore that cryopreservation influences in the cell survival, cell multiplication rate and cell viability, but still can be used to store the mesenchymal stem cells, because the damage caused don't make them unviable. And both EG and PG may be used as an alternative to DMSO for the cryopreservation of these cells, since they presented technically viable results.

Key-words: Mesenchymal stem cells; Cryoprotectants; Cell viability.

3.1 INTRODUÇÃO

As células tronco mesenquimais (CTM) são, atualmente, a fonte mais abundante de possíveis estratégias terapêuticas para

várias doenças congênitas ou adquiridas (ARMSTRONG *et al.*, 2012). Os resultados já obtidos têm gerado grandes expectativas entre a comunidade científica e a população leiga (DEL CARLO *et al.*, 2009). Segundo MONTEIRO *et al.* (2009), estudos já estão sendo realizados para descrever a utilização tanto autógena quanto alógena das CTM para a reparação de diversos tecidos. E a grande aplicação na Medicina Veterinária se deve também à geração de modelos experimentais aplicáveis em humanos. Em adequado cultivo, as CTM podem ser expandidas por mais de 40 gerações e manter a sua capacidade multipotente; as taxas de mitose, entretanto, ficarão reduzidas e seu uso clínico é desaconselhável nesses casos devido à alta probabilidade de ocorrer acúmulo de mutações (DEANS; MOSELEY, 2000).

Para preservar uma cultura de células por um longo prazo é necessária a criopreservação das mesmas, sendo que é muito importante que as CTM mantenham as suas propriedades inalteradas após esse processo. Para isso, as CTM devem passar por um congelamento lento e ser estocadas em nitrogênio líquido a -196°C . Um resfriamento lento evita a formação de gelo intracelular, o qual pode causar rupturas na membrana da célula. Esse tipo de resfriamento, entretanto, pode resultar em desidratação celular através da formação de gelo extracelular e, para evitar esse fato, junto à taxa de resfriamento ideal deve ser adicionado um crioprotetor; o qual deve possuir baixo peso molecular, não ser tóxico e ter um custo relativamente baixo (MOON *et al.*, 2008; OZKAVUKCU; ERDEMLI, 2002).

Conforme DAVIS *et al.* (1990), os crioprotetores são divididos em duas classes principais: agentes de ação intracelular e de ação extracelular. Os agentes intracelulares penetram na célula e previnem a formação de cristais de gelo e, conseqüentemente, a ruptura da membrana celular, são exemplos deles: DMSO (dimetilsulfóxido), glicerol e etilenoglicol. Já os crioprotetores extracelulares não conseguem penetrar na membrana celular e agem reduzindo os efeitos

hiperosmóticos presentes no processo de congelamento, dentre eles estão: sacarose, trealose, dextrose e polivinilpirrolidona.

O DMSO, que é o crioprotetor mais utilizado, promove uma alta taxa de sobrevivência celular após o descongelamento, mas alguns estudos já provaram que ele também pode influenciar na diferenciação de CTM em linhagens neuronais e também apresenta citotoxicidade em temperatura ambiente (NEUHUBER *et al.*, 2004; SYME *et al.*, 2004). Segundo JANZ *et al.* (2012), infelizmente não há muitos crioprotetores disponíveis atualmente, pois as outras substâncias como o glicerol, a sacarose ou a trealose, apesar de não apresentarem citotoxicidade, ainda precisam ser melhor estudadas quanto ao uso em CTM.

O objetivo do estudo é testar crioprotetores alternativos ao DMSO para a criopreservação das CTM e comparar a eficiência dos mesmos.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de tecido adiposo

A coleta foi realizada de forma cirúrgica em um bovino hígido da raça Holandesa de propriedade do CAV (Centro de Ciências Agroveterinárias) – UDESC (Universidade do Estado de Santa Catarina), no qual foi feita uma incisão na base da cauda e retirados aproximadamente 5 cm³ de tecido adiposo. O tecido coletado foi submetido a duas lavagens, a primeira com DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) 10x (1,5 mg/mL) antibiótico e a segunda com DPBS 5x (0,75 mg/mL) antibiótico, o tecido então foi transferido para um tubo cônico com 30 mL de DPBS 1x (0,15 mg/mL) antibiótico, sendo que os antibióticos utilizados para esse procedimento foram penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA). Em seguida, o tubo foi colocado em uma caixa isotérmica com gelo

e levado imediatamente ao laboratório CEDIMA (Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal) para ser processado.

3.2.2 Isolamento das CTM

O tecido adiposo foi inicialmente lavado com DPBS com o auxílio de uma seringa e uma agulha fina e colocado de molho em 25 mL de DPBS com 1x (0,15 mg/mL) antibiótico e 10x (1 μ L/mL) Anfotericina B (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) por 30 minutos. Em seguida, foi depositado em uma placa de petri, onde foi realizado o *slicing* com uma lâmina de bisturi. Após, 25 mL do tecido escarificado e umedecido com DPBS foi posto em tubo cônico contendo 25 mL da solução de colagenase 0,075% (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) aquecida a 37°C. O tubo foi levado para uma estufa a 37°C por 1 hora e 30 minutos e agitado vigorosamente a cada 15 minutos.

Após ser retirado da estufa, o tubo foi centrifugado a 526 g durante 10 minutos. Todo o sobrenadante foi retirado e foram acrescentados 2 mL da solução de lise (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA), o conteúdo foi homogeneizado e transferido para outro tubo cônico, o qual ficou em repouso por 2 minutos antes de serem adicionados 20 mL de DPBS para inativar a enzima de lise. O tubo foi centrifugado a 526 g por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado. Em seguida, foram adicionados 10 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) + 10% SFB (Soro Fetal Bovino) (Lonza Group Ltd., Visp, Suíça) e o tubo foi novamente centrifugado a 526 g durante 10 minutos.

O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi ressuspenso em 5 mL de DMEM + 10% SFB e transferido para uma placa de cultivo celular.

3.2.3 Cultivo das CTM

As CTM foram cultivadas em meio DMEM + 10% SFB. Inicialmente em uma placa de 60 mm de diâmetro e, após atingirem a confluência de 70%, elas foram transferidas para garrafas de cultivo de 75 cm². O monitoramento das CTM foi realizado diariamente em microscopia óptica para observação da morfologia, confluência e avaliação quanto à contaminação.

Ao atingir 70% de confluência, eram feitas as passagens. Para isso, as células eram liberadas do recipiente de cultivo com o uso de tripsina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) e divididas em outras garrafas de cultivo de 75 cm² contendo DMEM + 10% SFB.

3.2.4 Criopreservação

As CTM foram criopreservadas entre a 5^a e a 7^a passagem, na concentração de 1×10^6 células/mL em criotubos contendo um volume final de 1 mL. Foram utilizadas três soluções crioprotetoras que correspondem aos três tratamentos:

- Tratamento 1: 10% DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) em DMEM + 10% SFB
- Tratamento 2: 10% PG (propilenoglicol) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) em DMEM + 10% SFB
- Tratamento 3: 10% EG (etilenoglicol) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) em DMEM + 10% SFB

Após serem envazados, os criotubos foram transferidos para o dispositivo comercial *Mr. Frosty* (*Nalgene Nunc Cooler*), previamente refrigerado a 4°C, para ser realizada a curva de resfriamento de 4°C a -80°C, diminuindo 1°C/minuto conforme orientação do fabricante. O *Mr. Frosty* foi, então, colocado em um ultrafreezer a -80°C, onde permaneceu por 12 horas. Em

seguida, os criotubos foram transferidos para um botijão de nitrogênio líquido a -196°C , no qual permaneceram por pelo menos 48 horas antes de serem descongelados.

Uma parte das CTM foi mantida em cultivo para ser utilizada como grupo controle nos testes realizados.

3.2.5 Descongelamento

Os criotubos contendo as CTM foram retirados do botijão de nitrogênio líquido e aquecidos em banho-maria a 37°C . Em seguida, seu conteúdo foi transferido para um tubo cônico de 15 mL, o qual continha 2 mL de DMEM + 10% SFB a 37°C . O tubo, então, foi centrifugado a 526 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de DMEM +10% SFB.

3.2.6 Determinação da sobrevivência celular imediata

Imediatamente após o descongelamento, foi feita a contagem celular pelo método de exclusão de células mortas por coloração com azul de Tripán a 0,4% (FRESHNEY, 2000) para verificar a quantidade de CTM que sobreviveram à criopreservação. Através dos dados obtidos, foi possível calcular a porcentagem de sobrevivência celular imediata.

3.2.7 Determinação da curva de crescimento celular

A curva de crescimento celular foi feita em triplicata e desenvolvida em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), sendo depositadas 10.000 células em cada poço contendo 1 mL de meio de cultivo. A primeira coluna foi contada 24 horas após o início do cultivo, a segunda coluna após 48 horas e a terceira coluna após 72 horas. Para as contagens, as células foram tripsinizadas e transferidas para *ependorfs* contendo 1 mL de

meio de cultivo, os quais foram centrifugados a 419 g por 5 minutos. Após, o sobrenadante foi retirado e foram acrescentados 100 μ L de DMEM + 10% SFB. As células foram contadas pelo método de exclusão de células mortas por coloração com azul de Tripán a 0,4% (FRESHNEY, 2000).

3.2.8 Determinação do PDT (*Population Doubling Time*)

O teste de PDT foi realizado conforme Freshney (2000), utilizando placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), na qual foi adicionado 1 mL de meio de cultivo em cada poço. Na primeira linha foram adicionadas 10.000 células por poço, na segunda linha 30.000 células por poço e na quarta linha 100.000 células por poço. A primeira coluna foi contada 24 horas após o início do cultivo, a segunda coluna após 48 horas e a terceira coluna após 72 horas. Para a contagem das células, as mesmas foram tripsinizadas e foi utilizado o método de exclusão de células mortas por azul de Tripán a 0,4%. Para estimar os tempos de divisão celular, os dados obtidos foram processados utilizando o programa disponível no site www.doubling-time.com.

3.2.9 Teste de viabilidade celular através do reagente WST-1 [(2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico)]

O teste do reagente WST-1 serve para determinar a viabilidade celular através da atividade mitocondrial das células. Este teste foi realizado em triplicata em uma placa de 96 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Suíça), na qual foram depositadas 10.000 células por poço contendo 100 μ L de meio de cultivo e incubadas em uma estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período, 85 μ L do meio de cada poço foi removido e foram adicionados 10 μ L por poço da solução de MTT [3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), a placa foi novamente incubada a 37°C durante 4 horas. Em seguida, a solução de cada poço foi removida e foram acrescentados 50 µL de DMSO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) por poço. A placa foi incubada a 37°C por 10 minutos e colocada em um agitador de placas por 5 minutos. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro em absorbância de 490 nm.

3.2.10 Determinação da capacidade de diferenciação em células especializadas

As CTM foram submetidas às diferenciações osteogênica e adipogênica e, para isso, foram utilizadas placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça). A diferenciação de cada tratamento foi realizada em triplicata.

3.2.10.1 Diferenciação Osteogênica:

Foram depositadas 30.000 células em cada poço contendo 1 mL de meio de cultivo próprio para induzir a diferenciação osteogênica (Lonza Group Ltd., Visp, Suíça). Esse meio foi trocado a cada 72 horas durante 21 dias. Após esse período as células foram submetidas a coloração com Von Kossa.

Para corá-las, o meio de cultura de cada poço foi removido e as células aderidas foram lavadas duas vezes com DPBS. Em seguida, foram fixadas com paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) por 1 hora e lavadas novamente com DPBS. Após, foi adicionado nitrato de prata a 5% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) durante 30 minutos na presença de luz UV. O nitrato de prata foi removido e as células foram observadas em microscopia óptica.

3.2.10.2 Diferenciação Adipogênica:

Foram depositadas 30.000 células em cada poço contendo 1 mL de meio de cultivo de indução (Lonza Group Ltd., Visp, Suíça) para a diferenciação adipogênica. Após 72 horas, esse meio foi retirado e foi adicionado 1 mL de meio de cultivo de manutenção (Lonza Group Ltd., Visp, Suíça). A troca de meio de cultivo foi feita a cada 72 horas, intercalando os dois meios durante 21 dias e, após esse período, as células permaneceram no meio de cultivo de manutenção por mais 7 dias. Em seguida, foram submetidas a coloração com Oil Red O.

Para corá-las, o meio de cultura de cada poço foi removido e as células aderidas foram lavadas duas vezes com DPBS. Após, foram fixadas com formaldeído a 10% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) por 30 minutos. Em seguida, foram feitas duas lavagens com água destilada e adicionado álcool isopropílico a 60% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, EUA) durante 5 minutos. O álcool isopropílico foi removido e a solução de Oil Red O (60% Oil Red O em água destilada) foi adicionada e mantida por 10 minutos. Após, foi feita mais uma lavagem com água destilada e as células foram observadas em microscopia óptica.

3.3 RESULTADOS

A análise estatística foi realizada pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2009), por meio do procedimento GLM, adotando-se um nível de significância de 5%.

3.3.1 Determinação da sobrevivência celular imediata

A taxa de sobrevivência celular foi significativamente maior com o tratamento que utilizou o DMSO como crioprotetor em relação aos tratamentos com EG e PG, os quais não apresentaram diferença estatística entre si (Tabela 1).

TABELA 1. Sobrevivência celular imediata após o descongelamento.

Tratamentos	% de sobrevivência
EG	72,9±2,6 ^b
PG	71,7±1,5 ^b
DMSO	86,4±0,7 ^a

Fonte: Produção da própria autora.

3.3.2 Determinação da curva de crescimento celular

Não houve diferença estatística entre os tratamentos (EG x PG x DMSO), entretanto, todos foram inferiores ao controle não criopreservado (Tabela 2 e Figura 1).

TABELA 2. Curva de crescimento celular.

Tratamentos	Quantidade de Células por Poço			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Controle	10.000 ^a	19.833 ^b	40.000 ^a	96.333 ^a
EG	10.000 ^a	14.166 ^a	33.166 ^b	54.500 ^b
PG	10.000 ^a	13.166 ^a	35.500 ^b	58.000 ^b
DMSO	10.000 ^a	14.000 ^a	32.333 ^b	56.333 ^b

Fonte: Produção da própria autora.

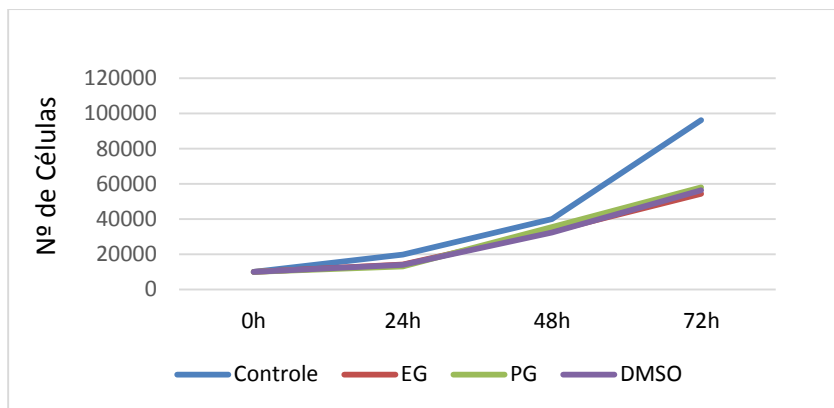


FIGURA 1. Curva de crescimento celular após a criopreservação.
Fonte: Produção da própria autora.

3.3.3 Determinação do PDT (*Population Doubling Time*)

Não houve diferença estatística entre os tratamentos com EG, PG e DMSO (Tabela 3), porém, houve diferença significativa quando comparados ao grupo controle.

TABELA 3. *Population Doubling Time*.

Tratamentos	Tempos (horas)
Controle	21,3±0,2 ^b
EG	28,0±1,7 ^a
PG	26,7±1,9 ^a
DMSO	27,2±1,4 ^a

Fonte: Produção da própria autora.

3.3.4 Teste de viabilidade celular através do reagente WST-1

Conforme o teste de viabilidade celular que utilizou o reagente WST-1, a viabilidade das células criopreservadas com EG, PG e DMSO foram, respectivamente, 66,65%,

71,42% e 83,62%. O PG não diferiu estatisticamente dos demais crioprotetores. O DMSO, entretanto, apresentou diferença significativa em relação ao EG, demonstrando um maior potencial de células viáveis (Figura 2).

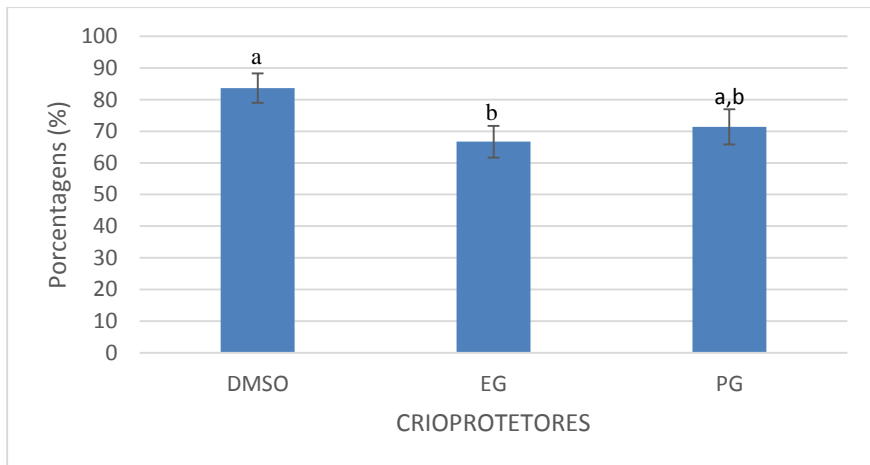


FIGURA 2. Taxas de viabilidade celular após a criopreservação.

Fonte: Produção da própria autora.

3.3.5 Determinação da capacidade de diferenciação em células especializadas

As células submetidas às diferenciações osteogênica e adipogênica após o congelamento conseguiram se diferenciar, assim como as células não criopreservadas utilizadas como controles.

3.3.5.1 Diferenciação Osteogênica

As células dos três tratamentos (EG, PG e DMSO), assim como as células utilizadas como controle, conseguiram se diferenciar em células do tecido ósseo (Figura 3).

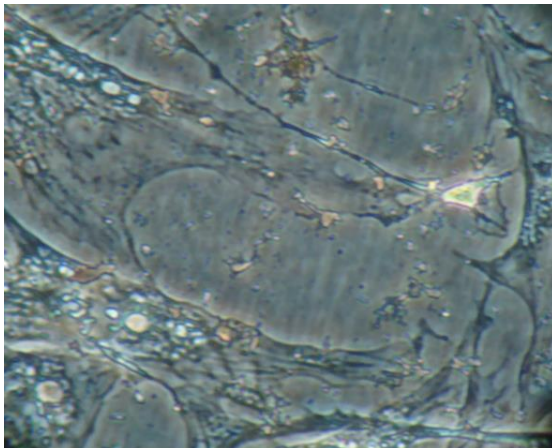


FIGURA 3. Células diferenciadas em osteoblastos.
Fonte: Arquivo pessoal.

3.3.5.2 Diferenciação Adipogênica

Tanto as células utilizadas como controle quanto as células dos três tratamentos conseguem se diferenciar em células do tecido adiposo (Figura 4).

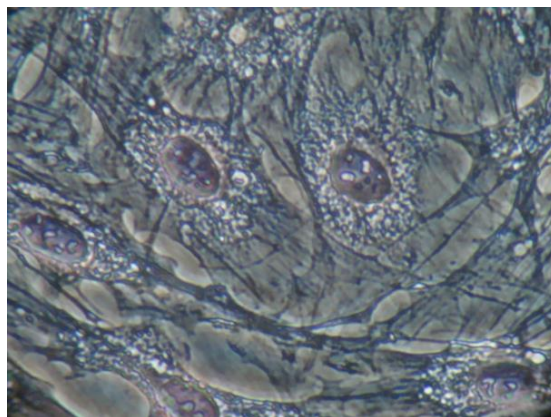


FIGURA 4. Células diferenciadas em adipócitos.
Fonte: Arquivo pessoal.

3.4 DISCUSSÃO

As CTM possuem um grande potencial terapêutico para o tratamento de inúmeras patologias. Portanto, é de suma importância a sua caracterização e, principalmente, a manutenção destas características após serem submetidas ao processo de criopreservação. Deste modo, a necessidade do desenvolvimento de protocolos utilizando crioprotetores comprovados e validados para a viabilização do uso terapêutico das CT é unanimidade entre os pesquisadores.

Os trabalhos que utilizaram CTM, tanto isoladas a partir de diferentes tecidos humanos quanto os com modelos animais, têm revelado a existência de significativa diferença entre essas células. Entre as diferenças relatadas, destacam-se aquelas envolvendo parâmetros imunofenotípicos, capacidade proliferativa e/ou potencial de diferenciação *in vitro* e também a eficiência em aplicações terapêuticas (GRONTHOS *et al.*, 2001; PANEPUCCI *et al.*, 2004; FESTY *et al.*, 2005; IZADPANAH *et al.*, 2006; KERN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; NOËL *et al.*, 2008; MOSNA *et al.*, 2010).

Neste estudo, as CTM, após permanecerem por, pelo menos, 48 horas congeladas em nitrogênio líquido, apresentaram taxas de sobrevivência celular de 72,9% em EG, 71,7% em PG e 86,4% em DMSO. Não houve diferença estatística entre os crioprotetores EG e PG, entretanto, a taxa de sobrevivência do tratamento com DMSO foi significativamente superior. Katkov *et al.* (2011) também utilizaram os crioprotetores EG, PG, DMSO e Glicerol a 10% no congelamento de CT humanas e testaram a sobrevivência celular, sendo que não houve diferença estatística entre o EG e o DMSO, mas o PG apresentou uma sobrevivência significativamente inferior aos demais tratamentos. Ribeiro *et al.* (2012) coletaram CTM de equino da medula óssea e do tecido adiposo e as criopreservaram com 10% de DMSO. Após o

descongelamento, a média das taxas de sobrevivência celular foram de 86% e 64% para a medula óssea e para o tecido adiposo, respectivamente. A diferença entre os dados obtidos em cada trabalho indica que diferentes tecidos e diferentes espécies doadoras podem influenciar na viabilidade das CT após o congelamento. E, neste trabalho, o crioprotetor que apresentou uma quantidade maior de células vivas após a criopreservação foi o DMSO, mostrando-se mais eficaz quando se trata da taxa de sobrevivência.

Todos os tratamentos apresentaram uma curva de crescimento inferior ao grupo controle, o que já era esperado pois estas células não foram criopreservadas, porém, não houve diferença significativa entre os três tratamentos (EG, PG e DMSO). Ginani *et al.* (2012), entretanto, ao criopreservarem CTM oriundas de tecido adiposo de camundongos com DMSO a 10%, não encontraram diferença estatística entre o grupo criopreservado e o grupo controle (não criopreservado). Provavelmente, como os autores utilizaram uma espécie animal com um metabolismo extremamente acelerado e animais jovens de 3 meses de idade, as células, mesmo sofrendo os possíveis danos do congelamento, conseguiram se recuperar mais rapidamente e retomarem a sua taxa de multiplicação elevada, semelhante a taxa do grupo controle. Apesar de as curvas de crescimento serem inferiores ao grupo controle, no experimento realizado neste estudo, todas foram ascendentes, o que indica que a criopreservação diminuiu a velocidade da divisão celular, mas não a tornou inviável.

Quando calculado o PDT de cada um dos três tratamentos, não houve diferença estatística entre eles (EG: 28 horas, PG: 26,7 horas e DMSO: 27,2 horas), mas apresentaram um intervalo de tempo para duplicar o tamanho de sua população significativamente superior ao grupo controle (21,3 horas). Janz *et al.* (2012) utilizaram CT oriundas de fluido amniótico humano e encontraram um PDT de 30,0 horas. Essa diferença pode ter

ocorrido por serem espécies (bovinos e humanos) e fontes (tecido adiposo e fluido amniótico) diferentes. Assim como outros trabalhos presentes na literatura também indicam que a espécie, a idade do doador e o tecido coletado influenciam diretamente na taxa de multiplicação celular. Neste trabalho, porém, a escolha do crioprotetor não interferiu no PDT, sendo que os três tratamentos mantiveram a capacidade de as células se multiplicarem após o congelamento.

Quanto às viabilidades celulares apresentadas após a criopreservação, o DMSO apresentou uma diferença estatística superior ao EG, mas não houve diferença significativa entre o PG e os demais crioprotetores. Sendo que, apesar de haver diferença entre eles, todos mantiveram as células viáveis. Ginani *et al.* (2012) criopreservaram CTM de tecido adiposo de camundongos utilizando o DMSO a 10% como crioprotetor e não encontraram diferença estatística entre o grupo criopreservado e o grupo não criopreservado, o que provavelmente deve-se ao fato de os autores terem utilizado animais jovens (3 meses de idade) como fonte de CT, como já citado anteriormente.

Tanto as células não congeladas utilizadas como controle, quanto as células submetidas aos três tratamentos conseguiram se diferenciar em células do tecido ósseo e células do tecido adiposo. De forma semelhante, Patricio *et al.* (2013) também conseguiram induzir as diferenciações osteogênica e adipogênica em CTM obtidas a partir de tecido adiposo canino. E Dvorakova *et al.* (2008) induziram com sucesso as diferenciações osteogênica e adipogênica em CTM oriundas da medula óssea de pacientes humanos. O que indica que a criopreservação não interfere na capacidade de plasticidade das células, ou seja, mesmo depois de congeladas, elas mantêm a capacidade de originarem outros tipos celulares, podendo ser utilizadas em usos terapêuticos futuros.

Os resultados obtidos neste estudo estão em consonância com outros autores, demonstrando assim a viabilidade do uso dos protocolos testados para serem utilizados na rotina laboratorial, sendo que o emprego de qualquer um dos três crioprotetores avaliados neste trabalho apresentará resultados eficazes para a criopreservação de CTM.

3.5 CONCLUSÕES

Os três tratamentos avaliados neste estudo demonstraram viabilidade técnica para seu uso como crioprotetores das CTM, pois as mesmas conseguiram manter suas características após o congelamento.

Tanto o EG como o PG podem ser utilizados como uma alternativa ao DMSO na criopreservação das CTM, pois durante os experimentos realizados apresentaram resultados eficazes e semelhantes a este.

A criopreservação influencia na sobrevivência, na taxa de multiplicação e na viabilidade celular das CTM, mas não as inviabiliza, podendo ser utilizada para armazenar as mesmas.

A criopreservação não influencia na capacidade de diferenciação das CTM em células dos tecidos ósseo e adiposo nas condições utilizadas em nosso laboratório, ou seja, as células mantêm a sua plasticidade mesmo após o processo de congelamento.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, L. *et al.* Editorial: Our 10 top developments in stem cell biology over the last 30 years. **Stem Cells**, v. 30, n. 1, p. 2-9, 2012.
- DAVIS, J. M. *et al.* Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. **Blood Journal**, Baltimore, v. 75, n. 3, p. 781-786, 1990.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Experimental hematology**, Baltimore, v. 28, n. 8, p. 875-884, 2000.
- DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, N. M. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 4, p. 446-450, 2009.
- DVORAKOVA, J. *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. **Cell Biology International**, v. 32, p. 1116-1125, 2008.
- FESTY, F. *et al.* Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 124, n. 2, p. 113-121, 2005.
- 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.

GRONTHOS, S. *et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 189, n. 1, p. 54-63, 2001.

IZADPANAHA, R. *et al.* Biological properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 1285-1297, 2006.

JANZ, F. L. *et al.* Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. **Journal of biomedicine and biotechnology**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

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.

KERN, S. *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1294-1301, 2006.

KIM, S. O. *et al.* Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation enhances closing pressure and leak point pressure in a female urinary incontinence rat model. **Urologie Internationalis**, v. 86, n. 1, p. 110-116, 2011.

MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 1-8, 2010.

MOON, J. H. *et al.* Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. **Oxford Journals**, v. 23, n. 8, p. 1760-1770, 2008.

MOSNA, F. *et al.* Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 10, p. 1449-1470, 2010.

NEUHUBER, B. *et al.* Reevaluation of *in vitro* differentiation protocols for bone marrow stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, p. 192-204, 2004.

NOËL, D. *et al.* Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 7, p. 1575-1584, 2008.

PANEPUCCI, R. A. *et al.* Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1263-1278, 2004.

PATRICIO, L. F. L. *et al.* Isolamento e caracterização de células mesenquimais do tecido adiposo de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 946-954, 2013.

RIBEIRO, G. *et al.* Viabilidade celular da fração mononuclear da medula óssea e fração vascular estromal do tecido adiposo de equinos após o processo de congelamento e descongelamento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 118-124, 2012.

SAS Institute Inc. SAS/STAT: User's guide. Version 9.2.ed. Cary, NC, 2009. 240p.

4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Diante das divergências de informações encontradas nos diferentes estudos presentes na literatura e da importância do uso das células tronco para a clínica tanto humana quanto veterinária, conclui-se que mais estudos são necessários assim como a realização de trabalhos que avaliem um número grande de amostras e de diferentes protocolos de criopreservação de células tronco a fim de padronizar uma técnica que apresente e garanta sempre altos níveis de sobrevivência e de viabilidade celular e preserve as características originais das mesmas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2010.

ALISON, M. R. *et al.* Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. **Nature**, v. 406, n. 6793, p. 257, 2000.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

ARAI, F.; HIRAO, A.; OHMURA, M. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cells quiescence in the bone marrow niche. **Cell**, v. 118, p. 149-161, 2004.

ARMSTRONG, L. *et al.* Editorial: Our 10 top developments in stem cell biology over the last 30 years. **Stem Cells**, v. 30, n. 1, p. 2-9, 2012.

BADIAVAS, E. V. *et al.* Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. **Journal of Cellular Physiology**, v. 196, p. 245–250, 2003.

BAKSH, R. *et al.* In silico characterization of the INO80 subfamily of SWI2/SNF2 chromatin remodeling proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 197-204, 2004.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, 2001.

BARRETT, A. J. *et al.* Successful bone marrow transplant for Fanconi's anaemia. **British Medical Journal**, v. 1, n. 6058, p. 420-422, 1977.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 4, p. 568-584, 2004.

BAUDOT, A. Thermal study of simple aminoalcohol solution. **Cryobiology**, v. 44, p. 150-160, 2002.

BLAU, H. M.; BRAZELTON, T. R; WEIMANN, J. M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? **Cell**, v. 105, n. 7, 2001.

CAMPAGNOLI, C. *et al.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first- trimester fetal blood, liver and bone marrow. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2396-2402, 2001.

CÓRDOVA-CABALLERO, M. S. *et al.* Transplantes de células progenitoras hematopoyéticas. **Gaceta Médica de México**, v. 138, n. 1, 2002.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, p. 831-841, 1997.

DAVIS, J. M. *et al.* Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. **Blood Journal**, Baltimore, v. 75, n. 3, p. 781-786, 1990.

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

EVANS, M. J; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981.

FERRARI, G. *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, v. 279, n. 5356, p. 1528-1530, 1998.

FLEMING, K. K.; HUBEL, A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cell. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 34, p. 309-315, 2006.

FODOR, W. L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 102, 2003.

FRASER, J. K. *et al.* Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 150-154, 2006.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques.** 4 ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, 2000.

FRIEDENSTEIN, A. J. *et al.* Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230-247, 1968.

FRIEDENSTEIN, A. J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. **Experimental Hematology**, v. 2, n. 2, p. 83-92, 1974.

FRUHBECK, G. *et al.* The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 280, p. 827-847, 2001.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. **Cell**, v. 116, p. 769-778, 2004.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science Washington DC**, v. 287, n. 5457, p. 1433-1438, 2000.

GASPER, P.W. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Philadelphia, PA: Williams & Wilkins, 2000.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.

GRITTI, A. *et al.* Adult Neural stem cells plasticity and developmental potential. **The Journal of Physiology**, v. 96, p. 81-89, 2002.

HERZOG, E. L. *et al.* Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v. 102, n. 10, p. 3483-3493, 2003.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 11, p. 2890-2898, 1990.

HIRAO, A; ARAI, F.; SUDA, T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. **Cell Cycle**, v. 3, p. 1481-1483, 2004.

HOLT, V. W. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 1, n. 3, p. 3-22, 2000.

HUANG, J. I. *et al.* Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, p. 1383-1389, 2005.

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

IANUS, A. *et al.* *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 843–850, 2003.

JAIN, N. C. **Schalm's Hematology**. 4 ed. Philadelphia, PA: Lea and Fabiger, 1986.

JANZ, F. L. *et al.* Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants fo human amniotic fluid stem cells cryopreservation. **Journal of biomedicine and biotechnology**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

JAVASON, E. H. *et al.* Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expend more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 219-225, 2001.

JAZEDJE, T. *et al.* Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 46, 2009.

JIN, K. *et al.* Stem cell factor stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 311-319, 2002.

KAISER, S. *et al.* BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. **Cytotherapy**, v. 9, p. 1-12, 2007.

KALE, S. *et al.* Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 1, p. 42-49, 2003.

KAROW, A. M. Cryobiology 2001 for mammalian embryologists. **Cryobiology**, p. 1-38, 2001.

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. 1-9, 2011.

KIRSCHSTEIN, R.; SKIRBOLL. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. The Embryonic Stem Cell. **Report prepared by National Institutes of Health**. 2001b.

KIRSCHSTEIN, R.; SKIRBOLL. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. The Stem Cell. **Report prepared by National Institutes of Health**. 2001a.

KRAMPERA, M. *et al.* Immune regulation by mesenchymal stem cells derived from adult spleen and thymus. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 5, p. 797-810, 2007.

LAUGHLIN, M. J. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. **New England Journal of Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2001.

LEMISCHKA, I. R. Stem cell biology: a view toward the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1044, p. 132-138, 2005.

LIN, Y. *et al.* Bone regeneration by BMP-2 enhanced adipose stem cells loading on alginate gel. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, n. 2, p. 203-210, 2008.

LIZIER, N. F. *et al.* Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39885, 2012.

LOCATELLI, F. The role of repeat transplantation of haemopoietic stem cells and adoptive immunotherapy in treatment of leukaemia relapsing following allogeneic transplantation. **British Journal of Haematology**, v. 102, n. 3, p. 633-638, 1998.

LOHMANN, C. H. *et al.* Tissue response and osteoinduction of human bone grafts *in vivo*. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 121, n. 10, p. 583-590, 2001.

LOVELL, M. J.; MATHUR, A. The role of stem cells for treatment of cardiovascular disease. **Cell Proliferation**, v. 37, n. 1, p. 67-87, 2004.

MAZZETTI, M. P. V. *et al.* Qualitative and quantitative analysis of rabbit's fat mesenchymal stem cells. **Acta cirúrgica brasileira**, v. 25, n. 1, p. 24-27, 2010.

McGANN, L. E. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 15, p. 382-390, 1978.

MERYMAN, H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. **Cryobiology**, v. 8, p. 489-500, 1971.

MEZEY, E. *et al.* Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. **Science**, v. 290, p. 1779-1782, 2000.

MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células tronco mesenquimais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2009.

MONTEIRO, B. S. *et al.* Terapia celular em reparação óssea – aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2008.

MOON, Y. J. *et al.* Hepatic differentiation of cord blood-derived multipotent progenitor cells (MPCs) *in vitro*. **Cell Biology International**, v. 32, p. 1293-1301, 2008.

MOSNA, F.; SENSEBÉ, L.; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 10, p. 1449-1470, 2010.

MOUSSA, M. *et al.* Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull sêmen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells again damage due to freezing and thawing. **Cryobiology**, p. 179-220, 1996.

NEGRIN, R. S. Favorable treatment outcome in non-Hodgkin's lymphoma patients with "poor" mobilization of peripheral blood progenitor cells. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 6, n. 5, p. 506-512, 2000.

NEUHUBER, B. *et al.* Reevaluation of *in vitro* differentiation protocols for bone marrow stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. **Journal of Neuroscience Reserch**, v. 77, p. 192-204, 2004

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v. 35, p. 109-124, 1991.

OISHI, K. *et al.* Cryopreservation of mouse adipose tissue-derived stem/progenitor cells. **Cell Transplant**, v. 17, p. 35-41, 2008.

OKAMOTO, K. *et al.* The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 14, p. 3659-3671, 2002.

ORLIC, D. *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, n. 6829, p. 701-705, 2001.

OSBORNE, T. F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPS): key regulations of nutritional homeostasis and insulin action. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 32379-32382, 2000.

PARKMAN, R. *et al.* Complete correction of the Wiskott-Aldrich syndrome by allogeneic bone-marrow transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 17, p. 921-927, 1978.

PEGG, D. E. The preservation of tissues for transplantation. **Cell Tissue Bank**, v. 7, p. 349-358, 2006.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, v. 9, p. 267-277, 2008.

PHINNEY, D. G. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry Supplement**, v. 38, p. 7-12, 2002.

PITTENGER, M.F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PROKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.

RENZI, S. *et al.* Mesenchymal stromal cell cryopreservation. **Biopreservation Biobanking**, v. 10, n. 3, p. 276-281, 2012.

ROBEY, P. G. Stem cells near the century mark. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 11, p. 1489-1491, 2000.

SALEM, H. K.; THIEMERMANN, C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem Cells**, v. 31, n. 8, p. 595-596, 2010.

SEIDEL, G. E. Jr. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: Techniques for freezing mammalian embryos: Short Course Proceedings, 6, 1986, Fort Collins. **Proceedings**. Fort Collins: USA, 1986.

SHIH, Y. R. *et al.* Isolation and characterization of stem cells from the human parathyroid gland. **Cell Proliferation**, v. 42, n. 4, p. 461-470, 2009.

STORB, R. *et al.* Aplastic anemia treated by allogeneic bone marrow transplantation: a report on 49 new cases from Seattle. **Blood**, v. 48, n. 6, p. 817-841, 1976.

STRIOGA, M. *et al.* Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived

mesenchymal stem and stromal cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 14, p. 2724-2752, 2012.

SYME, R. *et al.* The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 10, n. 2, p. 135-141, 2004.

THEISE, N. D. *et al.* Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 1333-1338, 2002.

TOLAR, J. *et al.* Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. **Stem Cells**, v. 28, n. 8, p. 1446-1455, 2010.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproduction Biomedical Online**, v. 12, p. 779-796, 2006.

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

WAGNER, W. *et al.* Comparative characteristics of mesenchymal stem cell from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 1402-1416, 2005.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-1, p. 481-492, 2000.

WEISSMAN, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. **Stem Cell Research and Ethics**, v. 287, n. 5457, p. 1442-1446, 2000.

WILSON, S. M. Adipose-derived mesenchymal stem cells enhance healing of mandibular defects in the ramus of swine. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 70, n. 3, p. e193-e203, 2012.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Celular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.

WOODBURY, D. *et al.* Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 15, n. 4, p. 364-370, 2000.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.

YOON, E. *et al.* *In vivo* osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 3, p. 619-627, 2007.

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos Avançados**, v. 18, n. 51, p. 247-56, 2004.

ZHU, Y. *et al.* Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, n. 6, p. 664-675, 2008.

ZUK, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cell. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, 2002.

ZUK, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.