

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS MESTRADO ACADÊMICO CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CATIA NASCIMENTO

# ASSOCIAÇÃO DE CRIOPROTETORES PERMEÁVEIS E NÃO PERMEÁVEIS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO EQUINO

FORTALEZA - CEARÁ

#### CATIA NASCIMENTO

# ASSOCIAÇÃO DE CRIOPROTETORES PERMEÁVEIS E NÃO PERMEÁVEIS PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO EQUINO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias. Área de concentração: Reprodução e sanidade de animal.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Catia, Nascimento.
Associação de crioprotetores permeáveis e não permeáveis na criopreservação de células tronco mesenguimais de tecido adiposo equino [recurso eletrónico] / Nascimento Catia. - 2018.
1 CD-ROM: il.; 4 % pol.
CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 71 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Forțaleza, 2018.
Area de concentração: Reprodução e sanidade animal. Orientação: Prof.<sup>4</sup> Ph.D. Ana Paula Ribeiro Rodrigues.
Coorientação: Prof. Ph.D. Carlos Eduardo Ambrósio .
1. Células tronco mesenguimais. 2. DMSO. 3. Trealose. 4. Polimero SuperCool X 1000. 5. Equino. I. Título.

#### CATIA NASCIMENTO

## ASSOCIAÇÃO DE CRIOPROTETORES PERMEÁVEIS E NÃO PERMEÁVEIS PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO EQUINO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias. Área de concentração: Reprodução e sanidade animal.

Aprovada em: 21/11/2018.

BANCA EXAMINADORA rotoolirgus. fa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues (Orientadora) Universidade Estadual do Ceará (UECE) Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio (Co-Orientador) Universidade Estadual de São Paulo (USP) Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva (Co-orientadora) Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) of. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Examinador) Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico а realização deste mestrado primeiramente a Deus, por colocar luz nos meus pensamentos nos momentos que acreditava estar no escuro. Aos meus pais Maria Madalena Pilato Nascimento e Alencar José do Nascimento (in memoriam), por me ensinarem a nunca desistir. Ao meu filho João Pedro Nascimento Farias por toda sua paciência minha ausência com

#### AGRADECIMENTOS

Gratidão em primeiro lugar a Deus, inteligência suprema que me coloca diariamente nas condições adequadas para meu aperfeiçoamento moral e intelectual permitindo a conclusão deste trabalho que me trouxe tanto aprendizado.

Gratidão à minha mãe Maria Madalena Pilato do Nascimento e ao meu pai Alencar José do Nascimento (*in memoriam*) por me apoiarem sempre e incentivarem que eu nunca parasse de estudar.

Ao João Pedro Nascimento Farias, meu filho amado, que preencheu de luz e alegria todos os momentos dos meus estudos me mostrando que tudo estava valendo a pena.

Às minhas irmãs de coração Marta Onofre, Regina Maria Santiago, Mariângela Valente, Roseli Roschman, Eliane Moura e Ana Paula Gambiragi por estarem ao meu lado todo o tempo me dando suporte emocional, para que eu prosseguisse.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues, por ter acreditado e aceitado trabalhar com um assunto novo, pela excelente orientação, e oportunidades oferecidas e, ao Professor Dr. José Ricardo de Figueiredo pela oportunidade e acolhimento no LAMOFOPA.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, por disponibilizar seu laboratório e sua equipe para a realização deste trabalho; sua colaboração foi imprescindível.

À minha co-Orientadora Dra. Márcia Viviane Saraiva, pela admirável paciência, excelente parceria e orientações, durante a execução dos procedimentos técnicos e correção dos documentos.

À minha equipe de trabalho, Vitoria Mattos e Kelly Robalo pela excelente colaboração e ajuda durante o planejamento e execução do experimento no laboratório do Grupo de Desenvolvimento de Terapias Inovadoras FZEA- USP -Pirassununga.

À Dra. Danielle Cristina Calado de Brito pela valiosa ajuda para a conclusão do meu mestrado.

Ao Dr. Francisco Léo Nascimento de Aguiar pela sua inestimável atenção às minhas dificuldades e sua rica contribuição para a finalização desta Dissertação.

Ao Dr. Benner Geraldo Alves pela disponibilidade no apoio e ajuda com as análises estatísticas.

Aos cavalos por ensinarem que a força nunca será a melhor maneira de dominação.

A todos os membros da equipe do LAMOFOPA, gratidão pelos ensinamentos e pela amizade.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pelo acolhimento.

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Medicina Veterinária da FZEA-Pirassununga por disponibilizar seus animais para a realização deste experimento.

A todos em geral que contribuíram direta ou indiretamente com esta conquista, os meus mais sinceros agradecimentos.

#### **RESUMO**

O uso de células tronco mesenquimais (CTMs) tem sido vastamente investigado para o tratamento de doenças musculoesqueléticas em equinos, principalmente, devido às injúrias sofridas durante a atividade física intensa. É conhecido também que para o sucesso do procedimento, é necessária uma grande quantidade de CTMs viáveis, o que pode ser obtido através de um banco de células. Portanto, a criopreservação é um tema de grande interesse na área da terapia celular, pois pode manter a viabilidade de um material biológico por longos períodos de tempo. No entanto, o uso de agentes crioprotetores (CPAs) permeáveis, como o DMSO, nos processos de criopreservação (congelação lenta ou vitrificação) pode causar injúrias, devido sua toxicidade, o que pode ser minimizado, quando usados em baixas concentrações ou associados a ACPs não permeáveis, como os açúcares ou os polímeros sintéticos. Portanto, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a viabilidade, capacidade proliferativa e de diferenciação (linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica) das CTMs equinas oriundas do tecido adiposo após a congelação na presença de diferentes soluções compostas por ACPs, permeável (DMSO) e não permeáveis [(Trealose (T) e SuperCool X-1000 (X-1000)]. A combinação desses ACPs, resultou em sete diferentes soluções de congelação (SC): DMSO; T; X-1000; DMSO+T; DMSO+X-1000; T+X-1000 e DMSO+T+X-1000. Inicialmente, as CTMs equinas frescas (controle) ou congeladas nas diferentes SC foram avaliadas quanto à viabilidade. Posteriormente, a unidade formadora de colônia (CFU - proliferação) e a capacidade de diferenciação celular nas linhagens acima mencionadas foram avaliadas, somente nas células frescas ou que apresentaram viabilidade superior a 40%, após congelação/descongelação. Os dados mostraram que a viabilidade pós congelação das CTMs equinas em todas as SC, reduziu significativamente em relação ao controle (100%). No entanto, a viabilidade das CTMs congeladas na presença apenas do DMSO ( $80.3 \pm 0.6$ ) foi superior (P<0.05) à observada nas demais SC. Para a CFU, não houve diferença (P>0.05) entre as células frescas e as congeladas. Independente do tratamento, as CTMs apresentaram potencial de diferenciação nas três linhagens. Porém, apesar da redução significativa na capacidade de diferenciação osteogênica, não houve diferença (P>0.05) entre as SC testadas e o controle. Por outro lado, células congeladas em DMSO+X-1000 reduziram (P<0.05) seu potencial de diferenciação na linhagem condrogênica em relação ao controle, porém, foi semelhante às demais SC (P>0.05). No tocante à diferenciação adipogênica, não houve diferença entre os tratamentos (P>0.05). Em conclusão, esse estudo confirmou o sucesso da congelação de CTMs na presença do DMSO e evidenciou o potencial de utilização do polímero sintético Super Cool X-1000 na congelação de células tronco, abrindo novas perspectivas para investigação do uso desse polímero e o DMSO em diferentes concentrações e combinações.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. DMSO. Trealose. Polímero SuperCool X-1000. Equino.

#### ABSTRACT

The mesenchymal stem cells (MSCs) have been widely investigated for the treatment of musculoskeletal diseases in horses mainly due to the injuries suffered during the intensive physical activity. Likewise, it is well known that for the success of the procedure is necessary a great quantity of viable MSCs, which can be obtained through a cell banking. Therefore, the cryopreservation is a theme of high interest in the cellular therapy area once it can maintain the viability of biological material for long periods of time. However, the use of permeable cryoprotectant agents (CPAs), such as DMSO can cause injuries due to its toxicity, which can be minimized when used in low concentrations or association with non-permeable cryoprotectants, such as sugars or the synthetic polymers. Therefore, the goal of this study was to evaluate the viability, proliferative capacity and the differentiation of the equine MSCs originated from the adipose tissue after freezing in the presence of different solutions comprised by permeable (DMSO) and non- permeable [(Trehalose (T), and SuperCool X-1000 (X-1000)] CPAs. The combination of these CPAs resulted in seven different freezing solutions (FS): DMSO; T; X-1000; DMSO+T; DMSO+X-1000; T+X-1000, and DMSO+T+X-1000. Firstly, fresh or frozen/thawed equine MSCs in the different FS were evaluated concerning viability. After that, the colony forming unit (CFU - proliferation) and the cellular differentiation capacity in the abovementioned lineages were evaluated only in fresh cells or that showed viability superior to 40% after frozen/thawing. The data demonstrated that the viability after freezing of the equine MSCs reduced significantly (100%) to the control. Nonetheless, the viability of the frozen MSCs in the presence only of DMSO (80.3  $\pm$  0.6) was superior (P<0.05) to the others FS. Regarding CFU, no difference (P>0.05) was observed between fresh and frozen cells. Independently of the treatment, the MSCs demonstrated differentiation potential in the three lineages. Nevertheless, despite the significate reduction in the osteogenic differentiation capacity, no differences (P>0.05) among the tested FS and the control. By the other hand, frozen cells in DMSO+X solution reduced (P<0.05) the differentiation potential for the chondrogenic lineages to the control, but similarly to the other FS (P>0.05). Concerning the adipogenic differentiation, no difference was observed between the treatments (P>0.05). In conclusion, this study confirmed the success of the freezing of MSCs in the presence of DMSO, and emphasized the potential utilization of the synthetic polymer Super Cool X-1000 in the freezing of stem cells, opening new perspectives for the investigation of X-1000 and DMSO in different concentrations and combinations.

Keywords: Mesenchymal stem cells, DMSO, Trehalose, SuperCool X-1000 Polymer, Equine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 -	The representation of the primary culture of eAT-MSCs. (A) Adherent					
	cells in the first 48 hours of culture; (B) The 80-90% of confluence after					
	14 days of culture. The black arrow indicates an adherent cell with a					
	fusiform format and the red arrow indicates a non-adherent cell with a					
	round shaped form. Scale bar = 100					
	μm	44				
Figure 2 -	Immunophenotypic analysis of fresh eAT-MSCs, showed the reactivity,					
	(A, B) with high positive expression of mesenchymal stem cells markers					
	(CD90 and CD44) but almost no expression for hematopoietic markes					
	(CD86, MHC-1 and MHC-					
	II)	45				
Figure 3 -	Mean (± SEM) percentages of cell viability of eAT-MSCs before and					
	after freezing. * Differs from Control. Different lowercase letters					
	indicate significant difference among FS (P <0.05). T = Trehalose and X					
	= SuperCool X-					
	1000	46				
Figure 4 -	Colony-forming unit of the eAT-MSCs. Mean (± SEM) percentages of					
	CFU from the control and post-freezing groups of treatments with					
	viability above 40% (A). Representative images of colony formation in					
	the control group (B), and in different freezing solutions (C, D, and E).					
	Staining: Giemsa; Scale bar = 100 μm. T = Trehalose; X = SuperCool					
	Х-					
	1000					
		47				
Figure 5 -	Representative image of the differentiation potential of eAT-MSCs after					
	culture of post-freezing groups of treatments with viability above 40%.					
	Differentiation chondrogenic (A, B, C, and D), with the presence of					
	proteoglycans. Differentiation osteogenic (F, G, H, and I), with the					
	formation of a rich bone matrix. Differentiation adipogenic (K, L, M,					

and N), with the presence of fat droplets. Mean (± SEM) percentages of 49

differentiation chondrogenic (E) and osteogenic (J). \*Differs from Control. Different lowercase letters indicate significant difference among FS (P <0.05). T = Trehalose; X = SuperCool X-1000.....

### LISTA DE TABELAS

Table 1 -	Composition of the seven different freezing solutions to cryopreserve	
	eAT-MSCs	40
Table 2 -	Semi-quantitative scoring system used in the evaluation eAT-MSCs after	
	adipogenic	
	differentiation	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFGPs	Anti Freezing Glycoprotein's (Glicoproteínas Anticongelante
	- GPAC)
AD	Adipose Tissue (Tecido Adiposo)
CD	Cluster of Differentiation (Grupo de Diferenciação)
CFU	Colony Forming Unit (Unidade Formadora de Colônia -
	UFC)
CPAs	Cryoprotectants Agents (Agentes Crioprotetores - ACPs)
CTs	Células Tronco
CTAs	Células Tronco Adultas
CTEs	Células Tronco Embrionárias
CTMs	Células Tronco Mesenquimais
DMSO	Dimethyl sulfoxide (Dimetilsulfóxido)
eCTMs	Células Tronco Mesenquimais Equinas
FACS	Flow Citometry Analysis
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de Fluoresceína)
IgG	Imunoglobulina G
HES	Hidroxietileno
$LN_2$	Liquid Nitrogen (Nitrogênio Líquido)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo de
	Hiscompatibilidade Maior)
МО	Medula Óssea
OIE	Organization International Epizootias
PBS	Phosphate Buffer Saline (Solução Salina Fosfatada)
PEG	Polietilenoglicol
PVA	Polivinil Álcool
SC	Solução de Congelação
Т	Trealose (Trehalose)
Х	SuperCool X-1000
α-MEM	Minimum Essential Medium Alpha modified

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrado
Kg	Quilograma
Min	Minutos
Mg	Miligramas
MOsm	Miliosmol
Ml	Mililitros
mm	Milímetros
μl	Microlitros
μm	Micrometros
Rpm	Rotações por Minuto
UI	Unidades Internacionais
%	Porcentagem
+	Mais
±	Mais ou Menos
=	Igual
>	Maior que
<	Menor que

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	CÉLULAS TRONCO	18
2.1.1	Células tronco mesenquimais	19
2.2	CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO	22
2.2.1	Papel dos agentes crioprotetores	23
2.3	CONGELAÇÃO DE CTMs	25
3	JUSTIFICATIVA	27
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA	29
5	OBJETIVOS	30
5.1	GERAL	30
5.2	ESPECÍFICOS	30
6	ARTIGO: Cryopreservation of mesenchymal stem cells from equine	
	adipose tissue: use of synthetic polymer as a perspective for reducing of	
	DMSO concentration	31
7	CONCLUSÕES	62
8	PERSPECTIVAS	63
	REFERÊNCIAS	64

#### 1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século XXI, a medicina regenerativa, e em particular as terapias com células tronco (CT), vêm se destacando pela inerente habilidade das CT se multiplicarem e se diferenciarem em qualquer tipo celular funcional, tornando possível a recuperação de tecidos lesionados (SCHWARZ et al., 2011; YOUNG et al., 2015). As CT podem ser obtidas a partir de vários tipos de tecido, como, medula óssea (ALVES et al., 2009), cordão umbilical (MOHANTY et al., 2016), sangue periférico (KOERNER et al., 2006) e tecido adiposo (DE MATTOS CARVALHO et al., 2011; MAMBELLI et al., 2009). Dentre as fontes de CT, as células tronco mesenquimais (CTMs) provenientes de tecido adiposo, vêm recebendo crescente interesse por apresentarem resultados excelentes no tocante às taxas de proliferação, bem como um melhor potencial de diferenciação quando comparadas às outras fontes, tanto em humanos quanto em animais (STEWART et al., 2011).

Em equinos, a terapia com CT é uma ferramenta promissora no tratamento das doenças músculo esqueléticas, que estão diretamente relacionadas ao esforço físico excessivo e repetitivo, resultando em alta morbidade nos cavalos atletas e limitado número de animais que retornam às atividades esportivas após o acometimento (MAMBELLI et al., 2009; DE SCHAUWER et al., 2014). Estudos demonstraram a eficiência da administração de CT nas lesões tendíneas de equinos, com redução do infiltrado inflamatório e melhor organização das fibras colágenas (DE MATTOS CARVALHO et al., 2013). Porém a administração das CT nessas lesões depende de um grande número de células no local de aplicação (DURGAM et al., 2017), o que pode ser obtido a partir do armazenamento em um banco de células.

Todavia, os protocolos de criopreservação das CT utilizam agentes crioprotetores (ACPs) permeáveis capazes de garantir a máxima eficiência das CT quando da sua utilização terapêutica. Dentre os ACPs, merece destaque o dimetilsulfóxido (DMSO), amplamente utilizado para criopreservação de CT (MAIA et al., 2017; SOLOCINSKI et al., 2017). Entretanto, o DMSO pode apresentar efeito tóxico, reduzindo a viabilidade e a capacidade regenerativa das células, ou ainda, pode causar reações adversas no paciente que recebe as CT após a descongelação. Desta forma, admitimos a necessidade de identificar ACP(s) com toxicidade nula ou mínima que possa(m) ser utilizado(s) sozinho(s) ou associado(s) ao DMSO, de modo a reduzir a toxicidade deste último. É conhecido que, açúcares como a trealose (MOTTA et al., 2010; RAO et al., 2015), e até mesmo polímeros sintéticos como o SuperCool X – 1000 (BADRZADEH *et* al., 2010; HASHIMOTO *et al.*, 2010; TING *et al.*,

2012; MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2014), têm sido utilizados como ACPs não permeáveis, com o intuito de reduzir as injúrias causadas pelo processo de criopreservação.

Considerando a importância da criopreservação de CT para a medicina regenerativa na espécie equina, a revisão de literatura a seguir abordará os seguintes tópicos: células tronco; células tronco mesenquimais – CTMs (origem e uso em equinos), criopreservação de CTMs (principais estratégias); agentes crioprotetores, com destaque para o DMSO, trealose, bem como, novas perspectivas para o uso do SuperCool X-1000.

#### 2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 CÉLULAS TRONCO

O conceito de CT foi originado no final do século XIX, baseado na teoria de como alguns tecidos (pele, sangue, entre outros) seriam capazes de se auto renovarem durante a vida de um organismo (BIANCO et al., 2008). Experimentos pioneiros na década de 60 realizados por Till et al. (1964), demonstraram a presença de colônias de células hematopoiéticas no baço de camundongos, e constataram que eram originadas de um único tipo celular, no caso, as CT.

As CT são células indiferenciadas que apresentam capacidade de auto renovação, gerando células-filhas idênticas às células mãe e, quando submetidas às condições fisiológicas ou experimentais, podem se diferenciar em diversos tipos celulares com funções especializadas, (BYDLOWSKI et al., 2009).

Os primeiros estudos eram focados em CT obtidas de medula óssea. Mais tarde, nas décadas de 70 e 80, em estudos conduzidos por Friedenstein et al. (1974), foi encontrado um outro tipo celular com características poligonais e capacidade de formar colônias, demonstrando que na medula óssea existiam células diferentes das já conhecidas células hematopoiéticas (para revisão, ver Márquez-Curtis, 2015). O estudo de Caplan e colaboradores (1991), demonstrou a presença de células tronco mesenquimais a partir de medula óssea, periósteo e tecido conjuntivo muscular, estimulando novas pesquisas em diferentes fontes como tecido adiposo (ZUK et al., 2001), tendões (BI et al., 2007), cordão umbilical (PETSA et al., 2009), dentre outros. Portanto, de acordo com sua origem, as CT podem ser classificadas como: 1) células tronco embrionárias, se obtidas ainda na fase do desenvolvimento embrionário (blastocisto), e 2) células tronco adultas somáticas ou progenitoras, se obtidas a partir do organismo completamente formado, mesmo que ainda seja na fase fetal (VITA et al., 2012). As CT também podem ser classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação em: 1) totipotentes; 2) pluripotentes; 3) multipotentes e 4) unipotentes ou oligopotentes. As células totipotentes estão presentes nos dias iniciais do desenvolvimento embrionário e podem se diferenciar em todos os tipos de células e tecidos funcionais do organismo, incluindo os anexos fetais. Já as pluripotentes são encontradas a partir do estádio embrionário de blastocisto, e também se diferenciam em diversos tipos celulares, exceto em anexos fetais. Dentre as multipotentes, encontramos as células tronco mesenquimais, podem ser obtidas a partir de tecido adulto já formado. Inicialmente essas células tronco mesenquimais eram reconhecidas por se diferenciarem nos tipos celulares de origem mesodermal, porém, atualmente é notório seu potencial em se diferenciar nas linhagens celulares de outros folhetos embrionários, além de apresentarem a capacidade de retornarem a ser pluripotentes após indução (iPS). As uni ou oligopotentes são células já com certo grau de diferenciação e sua multipotencialidade é destinada a uma linhagem celular específica, como por exemplo, as células tronco hematopoiéticas (CTHs) (SHIPANI et al., 2009; FAITA et al., 2016).

Dentre os diferentes tipos de CT, as CTMs se destacam devido à sua alta disponibilidade em organismos já formados, além do seu potencial de diferenciação se estender além da origem mesodermal (ZHANG et al., 2012). Desta forma, este tipo celular tem sido foco de estudo da maioria dos investigadores na área, independente da fonte utilizada. Portanto, as CTMs também foram escolhidas como tema do presente estudo, sendo por isso, descrita com maiores detalhes, a seguir.

#### 2.1.1 Células tronco mesenquimais

O termo células tronco mesenquimais foi idealizado por Caplan e colaboradores (1991), por demonstrar que as células tronco da medula óssea, eram capazes de se diferenciar em células da origem mesodermal embrionária, como osteoblastos e condrócitos. Essas células apresentavam características distintas das células hematopoiéticas desta mesma fonte, com rápida aderência à placa do cultivo, morfologia fibroblastóide, plasticidade, auto renovação e diferenciação em distintas linhagens celulares (FAITA et al., 2016).

De acordo com a revisão de Stewart e colaboradores (2011) as CTMs estão distribuídas por todo o organismo, mantidas num estado indiferenciado, funcionando como um apoio intrínseco ao sistema regulatório de regeneração tecidual, migrando quando solicitadas, para recuperar tecidos danificados. Desta forma, para a obtenção das CTMs dos diversos sítios disponíveis, diferentes origens foram utilizadas, como sangue periférico (SPASS et al., 2013), tecido ovariano (HANNA et al., 2014) e cordão umbilical (FUJII et al., 2017). Porém, durante muitos anos, a principal fonte de CTMs foi a medula óssea, no entanto, a obtenção desse tecido é um procedimento invasivo e doloroso, além de apresentar um baixo rendimento (0,001-0,01%) de células obtidas (MARQUEZ-CURTIS et al., 2015). Por outro lado, as CTMs derivadas de tecido adiposo (CTM-TA) são consideradas uma alternativa extremamente atraente, em grande parte, devido à facilidade de coleta de tecido, alto

rendimento celular inicial e alta capacidade proliferativa *in vitro* (VIDAL et al., 2007; MAMBELLI et al., 2009).

Estima-se que o tecido adiposo disponibilize até 500 vezes mais CTMs do que a medula óssea. Embora os detalhes específicos ainda não tenham sido determinados é provável que o nicho de CTMs oriundas do de tecido adiposo seja perivascular, como em outros tecidos (GIMBLE et al., 2007). Zuk et al. (2001) foram os primeiros a obter CTMs do lipoaspirado humano sugerindo que esta poderia ser uma fonte alternativa à medula óssea. Desde então, inúmeras pesquisas desenvolveram CTMs a partir de lipoaspirado humano (KATZ et al., 2005), tecido adiposo canino (MARTINELLO et al., 2010) e murino (FUJIMURA et al., 2005).

Além disso, distintas abordagens para a sua caracterização também foram estabelecidas, originando, assim, muita controvérsia a respeito do seu reconhecimento como células tronco mesenquimais (KERN et al., 2006). Portanto, com o intuito de introduzir uma padronização e estabelecer um critério mínimo que defina as CTMs, independentemente da fonte, Dominici et al. (2006) propuseram um padrão de classificação de CTMs, as quais, após o isolamento e cultivo devem apresentar, as seguintes características:*1*) Aderência ao plástico sob condições padronizadas de cultivo; *2*) Alta taxa de multiplicação celular; *3*) Expressão dos marcadores de superfície celular (CD29, CD44, CD90 e CD105) e a não expressão dos marcadores da linhagem hematopoiética, (CD14, CD11b, CD19, CD34, CD 45, CD79 ou CD19, CD 86, MHC I e MHC II); *4*) Multipotencialidade, isto é, capacidade de se diferenciar nas linhagens celulares osteogênica, adipogênica e condrogênica.

Embora a aderência ao plástico seja uma propriedade inespecífica, atua como coadjuvante na classificação das CTMs através da exclusão de outros tipos celulares que podem estar presentes durante o isolamento das mesmas, como por exemplo, as células da linhagem hematopoiética (STEWART et al., 2011). A alta capacidade proliferativa também é outra característica de destaque conferida às CTMs, pois, persiste ao longo de várias passagens *in vitro*, cuja característica não é observada em outra categoria de células.

A expressão dos marcadores de superfície celular pode ser avaliada por imunohistoquímica ou citometria de fluxo (FACS; SMITH et al., 2014). Estas técnicas são bem estabelecidas para CTMs humanas, porém, na medicina veterinária, ainda existe uma dificuldade para a estimativa da expressão desses marcadores, devido ao baixo número de anticorpos monoclonais espécie específicos disponíveis e, devido alguns desses anticorpos não apresentam reação cruzada entre as espécies (DE MATTOS CARVALHO et al., 2013; SMITH et al., 2014), dificultando, portanto, a marcação desses anticorpos.

A capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares é outra característica marcante das CTMs, sendo utilizada para sua definição principalmente, o potencial de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (BURK et al., 2013). Essa aptidão pode ser encontrada nas CTMs equinas (eCTMs) obtidas de diversas fontes como, medula óssea (ARNHOLD et al., 2007), tecido adiposo (VIDAL et al., 2007), sangue periférico (KOERNER et al., 2006), sangue do cordão umbilical (GIOVANNINI et al., 2008), dentre outras. A identificação deste potencial é realizada através do cultivo celular em meios específicos para a diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica, sendo as células fixadas após o período de cultivo e coradas para o seu reconhecimento, de acordo com os métodos e/ou técnicas para a respectiva indicação (YOUNG et al., 2015).

O fenótipo osteogênico pode ser identificado através da análise da matriz mineralizada identificada pela coloração de Von Kossa ou a coloração com vermelho de alizarina, ou ainda, através da avaliação da atividade da fosfatase alcalina (STEWART et al., 2011; YOUNG et al., 2015). A diferenciação condrogênica requer um sistema de cultivo diferenciado, o qual faz uso de pellets celulares, que precisam ser preservados, formando assim *clusters* (aglomerados) de células cartilaginosas, denominadas condrócitos. Conforme descrito por Young et al., (2015), o fenótipo condrogênico pode ser analisado de várias formas: pela secreção e a deposição de proteína de colágeno tipo II (teste de Elisa), avaliação das glicosaminoglicanas sulfatadas (alcian blue ou azul de toluidina) ou agrecano (Western blot). Para a diferenciação adipogênica, as células são cultivadas e avaliadas pela presença de vacúolos intracelulares de lipídeos, os quais podem ser corados pelo OIL RED O e ainda, por regulação do fator de transcrição específico de adipócitos, o PPARy (STEWART et al., 2011).

A partir do momento que a caracterização das CTMs se tornou um procedimento padrão no isolamento e cultivo das CTs, os pesquisadores voltaram suas atenções às comparações entre os diferentes tipos de tecidos dos quais as células pudessem ser obtidas e, que mantivessem as mesmas características morfofuncionais. As tentativas têm sido com o intuito de criar um panorama capaz de identificar as eCTMs, no decorrer de todo o período de cultivo, já que a expressão desses marcadores pode ser alterada de acordo com as passagens (GIMBLE et al., 2007; BURK et al., 2013). Segundo alguns autores, o marcador CD44 (cluster designation), embora presente nas CTMs, não é específico, mas sua presença tem sido utilizada para confirmação desta população celular (SMITH et al., 2014). A presença do marcador CD90 caracteriza positivamente as eCTMs, independentemente da fonte utilizada (RANERA et al., 2011). Por outro lado, é esperado que a expressão dos marcadores MHC I seja baixa e dos marcadores CD86 e MHC II seja ausente (CARRADE et al., 2012). O grande número de pesquisas clínicas envolvendo as eCTMs, serviu como um divisor de águas para o desenvolvimento da medicina veterinária de ponta no tratamento de lesões ortopédicas em equinos, os quais exercem papel importante como modelo para as aplicações clínicas em humanos (BURK et al., 2013).

As eCTMs passaram então a ser isoladas e preparadas em laboratório e posteriormente transferidas para o uso clínico em terapias regenerativas (FRISBIE et al., 2010). Inicialmente as células eram expandidas a partir do tecido adiposo do próprio paciente, produzindo assim células autólogas. Posteriormente, trabalhos foram realizados a partir de um cavalo doador, produzindo células alógenas (CARRADE et al., 2012). Porém, ambos os procedimentos resultam em um longo período de tempo desde o processamento até a sua aplicação, dificultando o uso da terapia com CT em pacientes lesionados. Desta forma, estudos envolvendo a criopreservação e armazenamento para disponibilidade imediata dessas células para o uso terapêutico têm sido absolutamente necessários (MERCATI et al., 2014).

#### 2.2 CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO

O processo de criopreservação tem como um dos princípios, reduzir o metabolismo celular através da redução da temperatura, permitindo que células e/ou tecidos possam ser conservados por períodos indeterminados, quando armazenados em nitrogênio líquido (-196°C) ou temperatura criogênica (GAO e CRITSER, 2000). O processo de criopreservação, envolve as seguintes etapas: 1) exposição ao(s) agente(s) crioprotetor(es) permeáveis e não permeáveis, presentes na solução de congelação; 2) redução da temperatura de forma gradual (congelação lenta) ou súbita (vitrificação); 3) armazenamento ou crioestocagem, permitindo a preservação do material em temperatura ultrabaixa por períodos indefinidos; 4) descongelação ou aquecimento, etapa na qual ocorre o resgate do material criopreservado e retomada do metabolismo celular; e 5) diluição ou remoção do agente crioprotetor (ACP). A remoção do ACP é uma etapa crucial para a viabilidade de qualquer material biológico, à temperatura fisiológica ou mesmo ambiente, ocorre a intensificação dos seus efeitos tóxicos, devido à produção de metabólitos secundários indesejáveis, (FAHY, 2010).

Para a criopreservação de CTMs a congelação lenta é o método mais amplamente utilizado, que permite reduzir o estresse térmico durante a etapa de resfriamento (KIM et al., 2015; YOUNG et al., 2015; GINANI et al., 2012) e devido à baixa concentração de ACP, utilizada (DUAN et al., 2017). Entretanto, a concentração de ACPs penetrantes ainda continua sendo uma preocupação nos protocolos de congelação CTs, pois a toxicidade desses agentes interfere na viabilidade celular (RODRIGUES et al., 2008). Apesar disso, a utilização de ACPs penetrantes em um protocolo de congelação é absolutamente necessária.

#### 2.2.1 Papel dos agentes crioprotetores

Os ACPs são aditivos utilizados na solução de criopreservação (congelação ou vitrificação) para proteger as células contra as crioinjúrias. Dependendo da classe do agente, os ACPs, protegem as células através de diferentes maneiras, ou seja, reduzindo a formação de gelo extra e intracelular, evitando a excessiva concentração de solutos, bem como, minimizando a desidratação celular a um grau tolerável (ELLIOTT et al., 2017).

Os ACPs podem ser classificadas como permeáveis (intracelulares) ou não permeáveis (extracelulares) em função da sua capacidade de atravessar a membrana celular (DUAN et al., 2017). Os ACPs permeáveis, tais como o dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol (1,2 propanodiol), metanol, etanol, propanol e formamida, são solventes orgânicos de baixo peso molecular (32,04g/mol a 92,09g/mol). Embora o uso de ACP seja fundamental em um protocolo de criopreservação, especialmente os permeáveis, apresentam toxicidade celular, a qual varia com o tipo, concentração, tempo e temperatura de exposição do material biológico (DUAN et al., 2017).

Dentre os ACPs intracelulares, o DMSO é o mais utilizado para criopreservação de CTMs. O DMSO é um composto polar higroscópico, desenvolvido originalmente como solvente químico, e que teve sua propriedade crioprotetora descrita primeiramente em 1959 por Lovelock e Bishop (LOVELOCK e BISHOP, 1959). Esse crioprotetor age reduzindo o dano celular causado pelos efeitos da concentração de sais no meio de congelação, e possui uma estrutura que lhe permite fazer ligações (ponte de hidrogênio) com moléculas de água. O resultado dessa afinidade com a água é a redução da formação de cristais de gelo ou redução do tamanho desses cristais e, finalmente, redução da concentração de solutos nos meios extra e intracelulares (POLLOCK et al., 2015), os quais podem causar injúrias devido ao choque osmótico (MERYMAN, 2007). Porém, como mencionado anteriormente, o DMSO apresenta toxicidade celular, devendo, portanto, ser utilizado da maneira mais apropriada possível, para evitar danos celulares

Os ACPs não permeáveis conferem apenas proteção extracelular, devido ao seu alto peso molecular e à ausência de moléculas que possam servir de carreadoras intracelulares (MOTTA et al., 2014). Esses agentes interagem com a bicamada lipoproteica da membrana celular, estabilizando-a e evitando seu rompimento durante a congelação (ELLIOTT et al., 2017). Dentre as substâncias consideradas ACPs não permeáveis incluem a polivinilpirrolidona, os álcoois de açúcar, (manitol e sorbitol), o polímero de amido de hidroxietileno (HES) e os açúcares como a, trealose, sacarose, lactose e glucose (MARQUEZ-CURTIS et al., 2015).

Dentre os açúcares, a trealose merece destaque por ser um dissacarídeo não redutor, comumente encontrado em leveduras como a Saccharomyces cereviseae, que tem a propriedade de conferir resistência ao estresse da desidratação (MOTTA et al., 2014). Além das leveduras outros organismos como crustáceos, nematódeos e peixes apresentam uma grande capacidade de sobreviver e manter suas características fisiológicas, a baixas e elevadas temperaturas, evitando a desidratação extrema, devido à síntese e acúmulo da trealose (NTAI et al., 2018). Esse acúcar age interagindo com os fosfolipídeos e proteínas da membrana, mantendo a estabilidade durante os processos de congelação/descongelação (BUCHANAN et al., 2004). Além disso, trealose tem a capacidade de formar uma matriz vítrea, se ligando às pontes de hidrogênio, reduzindo assim, novas ligações água-água, e favorecendo a ligação água-açúcar. Esse processo contribui para a inibição da formação de gelo e ainda reduz o tamanho dos já formados (SOLOCINSKI et al., 2017). Porém devido seu alto peso molecular (342,29 g/mol), a trealose não ultrapassa a membrana celular, sendo necessário então sua associação à ACPs permeáveis como o DMSO, para garantir a efetividade da criopreservação, como nos protocolos de congelação de CTMs de medula óssea (LIU et al., 2011), CTMs de tecido adiposo equino (Renzi et al., 2012) e CTMs de murinos (GURRUCHAGA et al., 2015).

Além dos açúcares, os organismos vivos usam outros recursos para sobreviverem a temperaturas abaixo de zero na natureza, como nos oceanos polares (FULLER et al., 2004). DeVries et al. (1970) já pesquisavam sobre a vida de peixes que vivem nessas regiões, e identificaram a existência de glicoproteínas "anticongelantes" (GPACs) capazes de interferir na histerese térmica, isto é, agirem no ponto de nucleação do gelo em crescimento. Desta forma, essas proteínas, inibem a ligação de outras moléculas na superfície do gelo, impedindo assim a formação de espículas, o que pode causar grandes danos celulares durante o processo de congelação (PELTIER et al., 2010). Não é surpresa, no entanto, que a partir desse conhecimento pesquisadores sugeriram a utilização dessas proteínas como um aditivo nas soluções de criopreservação (CARPENTER et al., 1992). Contudo, o uso dessas glicoproteínas não é tão acessível, já que a aquisição das mesmas, depende de uma grande quantidade de fontes primárias para sua extração (FULLER et al., 2004; PELTIER et al., 2010). Com finalidade de superar esse desafio, alguns estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de GPACs sintéticas (DELLER et al., 2013), como é o caso dos polímeros sintéticos (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2014). Um estudo realizado por Wowk et al. (2000) na tentativa de identificar uma substância com baixo peso molecular e alta solubilidade em meio aquoso, mostrou que o copolímero do álcool polivinílico (PVA), ou seja, o SuperCool X-1000, poderia ser uma boa alternativa. Em camundongos, BADRZADEH et al. (2010), utilizando o SuperCool X-1000 na concentração de 1%, obtiveram 72% de sobrevivência embrionária, após a congelação/descongelação. Em primatas não humanos, 87% dos folículos secundários apresentaram-se normais após a congelação na presença do SuperCool X-1000 utilizando uma concentração de 0,2%, associado a 25% de etilenoglicol (TING et al., 2013). Recentemente, em no nosso laboratório, Vizcarra (2017) demonstrou que o desenvolvimento folicular após 7 dias de cultivo in vitro foi similar entre folículos frescos e vitrificados na presença de 0,2% do polímero SuperCool X-1000, associado a 10% de etilenoglicol e a 10% DMSO. Embora, ainda não tenha sido utilizado para a congelação de CT, acreditamos que esse polímero possa ser uma alternativa viável para a criopreservação desse tipo celular.

#### 2.3 CONGELAÇÃO DE CTMs

A intensa pesquisa direcionada para elucidar as características das CTMs, os mecanismos pelos quais desempenham sua ação terapêutica, além do grande número de aplicações *in vivo* como promissora ferramenta para regeneração tecidual, suscita por parte da comunidade médico-veterinária um suprimento constante de CTMs viáveis e funcionais (MARQUEZ-CURTIZ et al., 2015). Seguindo o modelo das suas precursoras, ou seja, as células hematopoiéticas, as CTMs têm sido armazenadas por tempo indeterminado e descongeladas para uso posterior (SILVA et al., 2017).

Em um estudo realizado por Ginani et al. (2012), CTMs de tecido adiposo de camundongos foram criopreservadas na presença de 10% de DMSO. As células foram descongeladas após 30 dias e, após 72 horas de cultivo in vitro, 100% das CTMs estavam viáveis.

Em humanos, Ray et al. (2016), congelaram CTMs na presença de polivinilpirrolidona (PVP) e obtiveram 56% de viabilidade celular, não demonstrando diferença significativa com as CTMs congeladas na presença de 10% de DMSO, cuja solução foi utilizada como controle. Em outro estudo também em humanos, associando DMSO e trealose, 92% das células foram negativas para apoptose, avaliadas pelo iodeto de propídio e anexina (DE ROSA et al., 2009).

Utilizando diferentes concentrações do DMSO (2, 5, 7 e 10%) Renzi et al. (2012), avaliaram a viabilidade de CTMs oriundas da medula óssea e tecido adiposo de bovinos, ovinos, roedores e equinos. De um modo geral, a viabilidade das CTMs foi estimada em 90% na solução contendo 10% de DMSO. Porém, um fato interessante é que, em equinos, as CTMs oriundas do tecido adiposo, congeladas na presença de 10% de DMSO, apresentaram maior viabilidade (84%) que as oriundas da medula óssea (33%). Essa mesma concentração de DMSO foi empregada para a congelação de CTMs de cordão umbilical de equinos, com 60% de viabilidade celular após a descongelação (MAIA et al., 2017).

É importante destacar, que o principal objetivo da criopreservação é a implantação de bancos de células para posterior aplicação clínica. Assim, pesquisadores têm apresentado resultados positivos na aplicação das CTMs pós criopreservação, como no uso de leões tendíneas graves (MUTTINI et al., 2012) e, recentemente, Mariñas-Pardo et al. (2018), administraram CTMs em equinos com osteoartrites, previamente congeladas, em 10% de DMSO. Como resultado, os animais cessaram a claudicação após a segunda aplicação das CTMs, não apresentando nenhum efeito colateral. Seu efeito terapêutico tem ido além das lesões do sistema locomotor, no trabalho de Zucca e colaboradores (2016), células mesenquimais do fluido amniótico foram utilizadas para reduzir a inflamação pulmonar em equinos.

Como pode ser observado na descrição dos trabalhos acima, o DMSO é o ACP mais amplamente utilizado para a criopreservação de CTMs, servindo até mesmo como controle para protocolos inovadores. Contudo, apesar de conferir uma boa proteção durante a criopreservação, sua toxicidade em altas concentrações pode levar a uma redução significativa do número de células viáveis na descongelação, prejudicando assim a eficiência terapêutica das CTMs. Além disso, caso não seja removido adequadamente para aplicação, pode causar náuseas, dores de cabeça e mal-estar nos indivíduos que receberem o transplante celular (DE ROSA et al., 2009).

#### **3 JUSTIFICATIVA**

Conforme evidenciado, o cavalo atleta, ou seja, o animal que participa de competições envolvendo atividades físicas, sofre naturalmente de injúrias no sistema locomotor (FRISBIE; SMITH, 2010), trazendo prejuízos e constantes preocupações para o proprietário e médico veterinário, respectivamente. Felizmente, estudos têm mostrado que a terapia com as CT tem sido utilizada com sucesso como uma alternativa bastante eficaz no tratamento dessas lesões, a qual tem sido realizado utilizando CTMs-TA expandidas em cultivo *in vitro* (CARVALHO et al., 2013).

No entanto, para maximizar a aplicação das terapias celulares utilizando CTMs, é necessário a disponibilidade de uma adequada quantidade de células, as quais podem ser adquiridas em bancos de células-tronco criopreservadas. É conhecido que durante o procedimento de congelação/descongelação, as CT mantenham boa viabilidade, alta atividade metabólica, capacidade de expansão e, por conseguinte, eficácia no tratamento das lesões. Por outro lado, sabe-se que esses procedimentos podem causar injúrias celulares, as quais podem ser causadas por vários fatores, dentre eles, a toxicidade dos ACPs permeáveis, como o DMSO por exemplo, presentes na solução de congelação.

Apesar de tóxicos, a adição de ACPs permeáveis é indispensável na solução de congelação, pois reduzem o ponto de congelação da solução, minimizando outro importante fator responsável pelas crioinjúrias, que é a formação de cristais de gelo intracelulares. Neste sentido, vários estudos no campo da criobiologia têm buscado alternativas para o uso de ACPs, seja pela substituição de alguns agentes permeáveis pelos não permeáveis (PESSÔA et al., 2016); seja pela associação de ACPs permeáveis e não permeáveis (MAIA et al, 2017).

Dentre os ACPs não permeáveis destaca-se a trealose, que é um dissacarídeo de alto peso molecular, atóxico e que atua especialmente na estabilização das membranas celulares, protegendo a face externa da membrana da célula (ZHANG et al., 2017). Da mesma forma, os polímeros sintéticos investigados recentemente têm sido utilizados como excelentes ACPs não permeáveis (TING et al., 2013), inibindo a formação de cristais de gelo. Dentro desse grupo de polímeros, podemos destacar o polivinil álcool (SuperCool X-1000) ou simplesmente X-1000, o qual tem sido utilizado com sucesso para a vitrificação de tecido ovariano de primatas não humanos (TIAN et al., 2015). Recentemente, em nosso laboratório, o X-1000 foi utilizado na solução de vitrificação de tecido ovariano de cabras (VIZCARRA, 2017) e vacas (HAMED, 2018), garantindo uma alta percentagem de folículos pré-antrais caprinos (41%) e bovinos (80%) morfologicamente normais, respectivamente.

Embora, sejam necessários para garantir o sucesso da criopreservação celular, antes da aplicação clínica, as CT previamente congeladas devem ser submetidas a remoção dos ACPs, com a finalidade de não causar efeitos tóxicos adicionais às células nessa fase do processo, ou mesmo às células e tecidos do paciente. Ressalte se que esse procedimento é realizado à temperatura de 37°C, através de várias lavagens das células. Dessa forma, durante a remoção do ACP, muitas células são perdidas, o que pode influenciar negativamente a eficácia do tratamento. Portanto nós acreditamos que o protocolo de criopreservação de CT necessita ser aperfeiçoado, sobretudo no que concerne a composição da solução de congelação. Desta forma, avaliamos diferentes soluções de congelação compostas pela associação ou não, de ACP intracelular (DMSO) e extracelular (Trealose e SuperCool X-1000).

## 4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

A utilização de ACPs permeáveis (DMSO) e não permeáveis (Trealose e SuperCool X-1000), associados ou não entre si mantém a viabilidade, bem como as características padrões das CTMs após os procedimentos de congelação e descongelação.

#### **5 OBJETIVOS**

#### 5.1 GERAL

Congelar células tronco mesenquimais oriundas do tecido adiposo equino usando diferentes soluções de congelação compostas por ACPs, permeáveis (DMSO) e não permeáveis (Trealose e SuperCool X-1000).

#### **5.2 ESPECÍFICOS**

- a) Identificar as características das CTMs frescas, oriundas de tecido adiposo equino, quanto à sua a morfologia e presença dos marcadores de superfície, positivos (CD90, CD44) e negativos (CD86, MHC I e MHC II);
- b) Avaliar a viabilidade e capacidade de proliferação das CTMs antes (frescas) e, após congelação lenta, na presença do DMSO, da trealose e do X-1000 sozinhos ou associados entre si;
- c) Verificar o potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica das CTMs equinas antes e após a congelação.

#### 6 ARTIGO

# Cryopreservation of mesenchymal stem cells from equine adipose tissue: use of synthetic polymer as a perspective for reducing of DMSO concentration

Criopreservação de células tronco mesenquimais de tecido adiposo equino: uso de polímero sintético como uma perspectiva para redução da concentração de DMSO

Artigo submetido ao periódico: Research in Veterinary Science Em: 09/11/2018 Qualis: A2 Cryopreservation of mesenchymal stem cells from equine adipose tissue: use of synthetic polymer as a perspective for reducing of DMSO concentration

Nascimento, C.<sup>1</sup>; Saraiva, M.V.A.<sup>2</sup>; Pereira, V.M.<sup>3</sup>; Brito, D.C.C.<sup>1</sup>; Aguiar F.L.N.<sup>1</sup>; Roballo, K.C.S.<sup>3</sup>; Alves, B.G.<sup>4</sup>; Figueiredo, J.R<sup>1</sup>; Ambrósio, C.E.<sup>3</sup>; Rodrigues, A.P.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Manipulation of Oocytes and Ovarian Pre-Antral Follicles (LAMOFOPA), Faculty of Veterinary Medicine, Ceará State University, CE, Brazil.

<sup>2</sup> Federal Rural University of Semi-arid Region (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil.

<sup>3</sup> Faculty of Animal Sciences and Food Engineering, University of São Paulo, SP, Brazil;

<sup>4</sup> Laboratory of Reproduction Biology, Uberlandia Federal University, MG, Brazil.

\*Corresponding author: Ana Paula R. RODRIGUES, Ph.D. Faculty of Veterinary Medicine, Ceará State University, Fortaleza, CE, Brazil/ Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi 60740-903/ Phone +55 85 3101 9852/ Fax: +55 85 3101 9840

E-mail address: aprrodriguespapers@gmail.com

#### Abstract

The regenerative therapies with stem cells (SC) has been increased by the cryopreservation, permitting cell storage for extended periods. However, the permeating cryoprotectant agents (CPAs) such as dimethylsulfoxide (DMSO) can cause severe adverse effects. Therefore, this study evaluated equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (eAT-MSCs) in fresh (Control) or after slow freezing (SF) in different freezing solutions (FS). The FS comprise DMSO and non-permeating CPAs [Trehalose (T) and the SuperCool X-1000 (X)] in association or not, totalizing seven different FS: (DMSO; T; X; DMSO+T; DMSO+X; T+X, and DMSO+T+X). Before and after cryopreservation were evaluated, viability, colony forming unit (CFU), and cellular differentiation capacity. After freezing-thawing, the viability of the eAT-MSCs reduced (P < 0.05) in all treatments compared to the control. However, the viability of frozen eAT-MSCs in DMSO ( $80.3 \pm 0.6$ ) was superior (P<0.05) to the other FS. Regarding CFU, no difference (P>0.05) was observed between fresh and frozen cells. After freezing-thawing, the eAT-MSCs showed osteogenic, chondrogenic, and adipogenic lineages differentiation potential. Nonetheless, despite the significative reduction in the osteogenic differentiation capacity between fresh and frozen cells, no differences (P > 0.05) were observed among FS. Furthermore, the number of chondrogenic differentiation cells frozen in DMSO+X solution reduced (P<0.05) comparing to the control, without differ (P>0.05) to the other FS. The adipogenic differentiation did not differ (P>0.05) among treatments. In conclusion, although these findings confirm the success of DMSO to cryopreserve eAT-MSCs, the Super Cool X-1000 could be a promise to reduce the DMSO concentration in a FS.
## Introduction

The skeletal muscle diseases have produced a significant loss for the equine industry, emerging as the main orthopedic problems at this species. For example, a high rate (to 75%) of the caregiver in the affected animals (Pessôa et al., 2016). This problem is mainly caused due to the low capacity of regeneration of the cartilage and tendinous tissue in horses (Khodadi et al., 2012). In this scenario, among the promising therapeutic tools used for the treatment of the muscle-skeletal diseases, is notably the use of stem cells (SC), mainly the mesenchymal (MSCs), which consists in multipotent cells that can be obtained from several tissues of adult animals and develop an essential role in the tissue regeneration, and immunomodulation. Recently, previous studies demonstrated in vivo the beneficial utilization of MSCs in several diseases, such as cervical osteoarthritis in humans (Jo et al., 2014), and the tendinous lesion in equines (Durgam et al., 2017).

Give the importance and necessity of the utilization of animal models, the equine is considered as an attractive option for the research of the orthopedic affections, once the horse demonstrates proportional similarities in size, weight to carry, and types of articulations with the human being (Ranera et al., 2011). Additionally, the cellular therapy in equines (Hackett et al., 2012) has been great application's potential in the veterinarian clinical practice, due to the fast development of studies towards MSCs (Sharma et al., 2014). Hence, the American food and drug agency concluded that the horse is the most appropriated animal model to test the clinical effects of MSCs, mainly considering articular lesions (Ranera et al., 2011, Mitchell et al., 2015).

In this context, the equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (eAT-MSCs) have been the core source of cell acquisition in horses, owing to several factors, such as: availability, minimal invasive harvesting procedure, massive quantity of obtained cells, besides the capacity and efficiency of these cells to differentiate in several lineages (Frisbie et

al., 2010). However, so that MSCs have a disseminated utilization is critical to the creation of cryopreserved cell banking, which will be cryostored in a vast amount, available to the therapeutical application. The implantation of SC banking is feasible when considered some critical aspects such as viability, proliferative capacity, and cellular differentiation capacity, which should be maintained after the procedures of freezing/thawing. Therefore, these factors have been the focus of scientific interest of several investigators (Renzi et al., 2012, Ginani et al., 2012, Mambelli et al., 2009), when it comes to cryopreservation protocols of stem cells.

For the cryopreservation of the biological material, is imperative the utilization of cryoprotectant agents (CPAs), which can be classified into two types: penetrating and nonpenetrating. This CPAs help to minimize the cryoinjuries induced during the different phases of the cryopreservation process (Castro et al., 2011). Among the penetrating CPAs available, the DMSO is the most used mainly for the cryopreservation of stem cells (Souza et al., 2014). However, depending on the concentration and temperature, as the physiological, the DMSO offers severe risks to the cells due to its toxicity (Elliott et al., 2017). Previous studies have shown that 10% of DMSO is the most used concentration for the freezing of MSCs (Gurruchaga et al., 2015, Chabot et al., 2017). Hence, to avoid cell damages and other complications after thawing, it is necessary the removal of the DMSO, through many washes, followed by centrifugation of SC, which leads to a considerable reduction in the number of available cells for the application (Mitchell et al., 2015). In this regard, with the goal to minimize the toxicity, as well as the loss of MSCs, the strategies as the association of DMSO with non-penetrating CPAs, or even the substitution of penetrating by non-penetrating CPAs have been investigated (Shu et al., 2010).

Among the non-penetrating CPAs, the disaccharides, for instance, the trehalose has been used with success for the freezing of MSCs of the umbilical cord (Motta et al., 2014), and human peripheral blood (Chen et al., 2016, Martinetti et al., 2017). The trehalose is a nontoxic molecule able to avoid the osmotic shock, protecting the cellular membrane of protein denaturation and destabilization induced during freezing (Solocinski et al., 2017). Additionally, another promising alternative is the synthetic polymers, for instance the alcohol polivinilic copolymer or SuperCool X-1000, produced towards analogous substances of antifreeze glycoprotein's (Deller et al., 2014; Wowk et al., 2000), which protect fishes of the low-temperature regions (-2° C) or extremophilic microorganisms (Caruso et al., 2017). These polymers decreased the freezing point, and support in the reduction of the ice crystals formation (Deller et al., 2014). Therefore, aiming to reduce the toxicity caused by DMSO, as well as the loss of MSCs during the penetration CPAs remove process, this study has the goal to evaluate the efficiency of in vitro freeze eAT-MSCs in different freezing solutions comprised by the association or not of penetrating (DMSO), and non-penetrating CPAs (Trehalose and SuperCool X-1000).

#### **Materials and Methods**

The present study was approved and performed under the guidance of the Animal use ethics committee of the Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo - FZEA/USP (#6083170317).

#### **Reagents and antibodies**

All the reagents and media used during the experiments were acquired from Gibco (Gibco®, Invitrogen, USA) unless otherwise stated. The pH of the medium was equilibrated for 7.4, and the osmolality was adjusted for 280 mOsm/kg. For the immunophenotyping, it was used the following primary antibodies: mouse monoclonal CD90 (SC – 6071, Santa Cruz, Dallas, USA), mouse monoclonal CD44 (MCA1082GA, AbDSerotek, Raleigh, NC, USA),

mouse MHC (Major Histocompatibility Complex) class I monomorphic (MCA1086GA, AbDSerotek, Raleigh, NC, USA), mouse monoclonal CD86 (NB100-77815, BD Pharmigen, São Paulo, Brazil) e mouse MHC Class II Monomorphic (MCA1085GA, AbDSerotek, Raleigh, NC, USA). For the secondary antibodies, it was used the Alexa Fluor® 488 rabbit anti-goat IgG (11078, Serotek, Raleigh, NC, USA) and the polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/FITC (F-0479, Dako, Bath, UK).

#### Animals

Four healthy mixed-breeding mares with age varying between 5 to 13 years were submitted to harvesting of the adipose tissue for further isolation of the eAT-MSCs. The animals were previously evaluated for the presence of physiological alterations, and submitted to hematologic evaluation for the confirmation of healthiness, and for the exclusion of the compulsory notification pathologies following World Organization for Animal Health – OIE, (i.e., equine infectious anemia virus or glanders.

#### Adipose tissue harvest

The protocol of harvesting of adipose tissue was performed as described by Vidal and coauthors (2007). Briefly, the animals were firstly sedated with detomidine hydrochloride (2.2 mg/kg of the body weight administrated intravenously, and then, an area of 10 cm<sup>2</sup> in the base of the tail under the dorsal gluteus muscle was trichotomized and prepared aseptically by an application of a local anesthetic (2% lidocaine without vasoconstrictor), in which 2 grams of adipose tissue were harvested. Therefore, the samples of adipose tissue were washed in a phosphate buffer saline (PBS) solution added with 1% of penicillin, 1% of streptomycin, and 1% of amphotericin B (wash solution). After that, the sample was transported to the laboratory at 4 °C, and then, submitted to an additional four washes using the same solution.

#### Isolation and in vitro culture of mesenchymal stem cells

After wash, the samples of adipose tissue were fragmented with stainless steel, transferred for tubes containing a solution of PBS added with 75 UI/ml of collagenase type I (Gibco®, Invitrogen, USA), 1% of penicillin, 1% streptomycin, 1% amphotericin B for enzymatic digestion, and were incubated at 38.3 °C, in an atmosphere of 5% CO2 for 1.5 hours, and homogenized at each 10 min. Soon after, the samples of each animal were centrifuged at 1700 rpm for 5 min, and the supernatant was discharged and the pellet was resuspended and cultured in vitro in 3 mL of culture medium composed by minimum essential medium alpha medium ( $\alpha$ -MEM) (Gibco®, Invitrogen, USA), 1% of glutamine (Gibco®, Invitrogen, USA), 1% of non-essential amino acids (Gibco®, Invitrogen, USA), 1 % of penicillin, 1% streptomycin (Gibco®, Invitrogen, USA), and 1% of amphotericin B (Gibco®, Invitrogen, USA) namely  $\alpha$ -MEM+. The resulting cellular samples were plated in cell culture flasks (25 mm), and incubated in a 38.3 °C for 14 days, corresponding to the primary culture, or P0.

During the primary culture, the partial replacement of the medium (1 mL) was performed at every 2-3 days in the first week and a full replacement of the medium (3 mL) from the second week. In each medium replacement, the cells were checked by its morphology, capacity of adherence in culture flasks, and capacity of multiplication. Since the confluence of 90% was obtained, the cells were trypsinized and re-plated (a procedure called first passage or P1. For the trypsinization, the medium  $\alpha$ -MEM+ was removed, and three mL of TrypleTM Express Enzyme (ThermoFisher Scientific, USA) was added to the flasks, incubated for 5 min, and then it was evaluated to an optical microscope to confirm the cell unattachment. Then, two mL of  $\alpha$ -MEM+ were added into the flask for inactivation of trypsin and follow up cell plating. The process of cell expansion was performed until the second passage or P2.

#### Immunophenotypic characterization

To confirm and characterize immunophenotypically the eAT-MSCs, some aliquots of 5x105 cells in P2, fresh or non-frozen were suspended in 200 µl of PBS, added with 0.1% of bovine serum albumin (BSA), and submitted to an unspecific block solution (PBS and 1% of BSA) for 1 h in a room temperature. After blockage, the cells were incubated for 1 hour in a dark chamber at room temperature for evaluation of superficial markers, which were positive for mesenchymal stem cells' goat anti-CD90 (1:100), and mouse anti-CD44 (1:100)], and the negative superficial markers for hematopoietic stem cells [primary antibodies, mouse anti-CD86 (1:100), mouse anti-MHC class I (1:100), and mouse anti-MHC class II (1:100)]. Additionally, at the same temperature mentioned above, the incubation of secondary antibodies was performed with each of the primary antibodies [anti-goat Alexia 488 (1:300), and anti-mouse Dako FITC (1:300)] for 1 hour. Finally, the cells were fixed in paraformaldehyde at 2% for 10 min and then submitted to a cytometry flow analysis (FACS ARIA, BD). As a negative control, aliquots of both superficial cell markers (positive and negative) were submitted only to a solution with PBS and secondary antibodies (Pessôa et al., 2016).

# Experimental design

The eAT-MSCs at P2 of each animal was divided into eight aliquots of 1x106 cells/mL Then, an aliquot of fresh or non-frozen cells was used as a control group and immediately submitted to endpoint evaluations such as viability, colony forming unit (CFU), and cellular differentiation. The other aliquots (n = 7) were destined to slow freezing with

different freezing solutions (FS), comprised by  $\alpha$ -MEM+ added of penetrating (DMSO) or non-penetrating CPAs (Trehalose and SuperCool X-1000), with or without association, as represented at Table 1.

Freezing solutions composition	Simplified nomenclature	
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup> + 10% DMSO	DMSO	-
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup> + 60 mM Trehalose	Т	
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup> + 1% SuperCool X-1000	Х	
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup> + 10% DMSO + 60 mM Trehalose	DMSO+T	
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup> + 10% DMSO + 1% SuperCool X–1000	DMSO+X	
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup> + 60 mM Trehalose + 1% SuperCool X–1000	T+X	
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup> + 10% DMSO + 60 mM Trehalose + 1% SuperCool X-1000	DMSO+T+X	
		-

Table 1. Composition of the seven different freezing solutions to cryopreserve eAT-MSCs.

#### mesenchymal stem cells

The slow freezing protocol used was adapted from Mambelli and co-authors (2009). The aliquots of eAT-MSCs were collected in cryotubes of 2 mL and exposed to different FS in room temperature for 20 min. After the exposure, the cryotubes containing eAT-MSCs were put in a Mrs. Frosty (Ref. 5100-0001 - Nalgene®, Brazil), and maintained in an ultra-freezer for 24 hours, which permitted a gradual reduction of the temperature of 1°C/min until reach -80 °C. After that, the cryotubes were transferred to a liquid nitrogen tank (LN2) and stored for five days.

For thawing, the cryotubes of each FS were removed from LN2, maintained at room temperature for 1 min, and then, plunged in a water bath for 3 min at 37 °C. For CPAs removal, the cells were transferred for a falcon tube of 15 mL, containing one mL of  $\alpha$ -MEM+, and then, centrifuged at 1600 rpm for 5 min. The supernatant was discharged, and one mL of  $\alpha$ -MEM+ was added to a pellet and homogenized. Thus, the aliquots were evaluated immediately for cellular viability. Only the cells originated from freezing treatments having viability rates of 40% were submitted to evaluation of CFU and cellular differentiation.

### Cell Viability

The cellular viability of the eAT-MSCs was evaluated using the vital dye Trypan blue (Sigma-Aldrich, MO, USA). Therefore, ten  $\mu$ l of the dye was added to a fraction of 10  $\mu$ l of the suspension containing fresh cells or from each freezing treatment. Afterward, ten  $\mu$ l of the cell suspension were led to a Neubauer chamber for counting the number of living cells. This methodology was performed as previously described by Renzi et al. (2012), which the cells were considered viable or non-viable hen labeled or not by the Trypan blue dye, respectively.

#### Colony forming unit (CFU)

To evaluate the capacity of the colony formation of the eAT-MSCs before and after freezing, aliquots of 2 mL containing  $1 \times 10^4$  cells/mL in P2 were cultured in triplicate in 6 well plates for 13 days, with a full refresh of the medium performed at every three days. After the culture, the medium was removed, and the cells were washed twice in PBS for 5 min for each wash and fixed in paraformaldehyde at 4% during 30 min. After, the cells were submitted to three consecutive washes in PBS aiming to remove the fixative and stained with

Giemsa 0.1% for 15 min at room temperature After staining, the counting of the number of colonies with more than 50 cells was performed (Vidal et al., 2007).

## Differentiation analysis

Fresh (control) and frozen e-AT-MSCs that demonstrated cell viability superior to 40% were submitted to in vitro culture for evaluation of the differentiation potential of the lineages adipogenic, osteogenic, and chondrogenic, using commercial differentiation kits (Gibco®-Life Technologies, USA), which were specific for each lineage, in accordance with the manufacture protocol. For higher security, it was used a negative control that was comprised of cell culture only with the presence of  $\alpha$ -MEM+.

For evaluation of the differentiation of osteogenic and adipogenic cells, 1 x 105 cells/mL eAT-MSCs were cultured in 12 well plates containing one mL of  $\alpha$ -MEM+ until reach the confluence of 60%, for then, the addition of the specific media differentiation. In the case of adipogenic differentiation, it was used the StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco-Life Technologies, USA), added of 1% of penicillin, 1% streptomycin, in which the cells remained in culture for more 14 days. After this period, the cells were washed in PBS, fixed in paraformaldehyde 4%, stained with Oil Red O for 5 min, and evaluated for optical microscopy for the presence of intracytoplasmic lepidic vesicles. The determination of the potential adipose intensity of differentiation was performed by a scoring system in the Oil Red O staining, as described in Table 2 (Burk, 2013, Fulber, 2016).

For the osteogenic differentiation, the cells were cultured in StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco-Life Technologies, USA), with 1% of penicillin, 1% streptomycin, for 21 days. After this period, the cells were washed and fixed, as described previously, and stained with Alizarin Red for 15 min for the evaluation of the formation of calcium matrix. To quantification, the differentiation area and stained by the Alizarin Red labeling was calculated using the Image J program (Loci, University of Wisconsin, Madison), as previously described by Fulber 2016.

In contrast with the earlier analysis, the chondrogenic differentiation was performed in a cell pellet, which was obtained after centrifugation of 1 x 105 cells/mL eAT-MSCs, and cultured in tubes of 15 mL with 0.5 mL of  $\alpha$ -MEM+ for four days. From that moment, the addition of the medium StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco-Life Technologies, USA), with 1% of penicillin, 1% streptomycin, and then, the cells were cultured for more 21 days. After the culture period, the medium was discharged, and the performed chondrogenic pellet was fixed for 30 min in paraformaldehyde 4%, dehydrated in ethanol, clarified in xylene, and included in paraffin. Serial sections (5 µm) of the pellet were cut and stained with Alcian Blue for identification of proteoglycans. The quantification of the intensity of the chondrogenic differentiation was performed by the determination of an index between the total area of the image and the differentiated area (µm<sup>2</sup>), as described by Burk 2013, as demonstrated by the following formula:

Index = differentiated area/ total area of the image.

### Statistical analysis

The data were analyzed by the software Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, USA). Firstly, it was applied the Shapiro-Wilk to determine the normal distribution of the data. The osteogenic and chondrogenic differentiation that did not have a normal distribution were ranked and submitted to ANOVA or Student' t-test. The viability and the number of CFU were compared among the treatments by ANOVA followed by posthoc Student-Newman-Keuls test. The data were demonstrated as the mean  $\pm$  standard error of the mean, and the results were considered significant when P < 0.05.

#### Results

# Morphological analyses of eAT-MSCs

The primary culture obtained after processing of adipose tissue was comprised by a heterogeneous cellular population, which demonstrated adherent cells to the plastic surface of culture flasks, with a fusiform aspect, whereas the non-adherent cells presented a round shaped format (Figure 1). After 48 hours of plating, it was observed a predominance of adherent cells with fusiform or fibroblastoid morphology; characteristic described as a pattern for mesenchymal stem cells (Vidal, 2006).



**Figure 1.** The representation of the primary culture of eAT-MSCs. (A) Adherent cells in the first 48 hours of culture; (B) The 80-90% of confluence after 14 days of culture. The black arrow indicates an adherent cell with a fusiform format and the red arrow indicates a non-adherent cell with a round shaped form. Scale bar =  $100 \mu m$ .

# Immunophenotypic assay

The profile analysis of the superficial markers by flow cytometry of the fresh cells in P2 demonstrated the expression of the consistent immunophenotypic characteristic of MSCs (Figure 2). The results indicated that the cells expressed high levels of cellular markers, i.e.,

CD90 and CD44, which are present in MSCs. In contrast, the cells did not express the common cell markers of SCs from hematopoietic sources, such as the CD86, MHC I, and MHC II.



**Figure 2.** Immunophenotypic analysis of fresh eAT-MSCs, showed the reactivity, (A, B) with high positive expression of mesenchymal stem cells markers (CD90 and CD44) but almost no expression for hematopoietic markes (CD86, MHC-1 and MHC-II)

# Viability of eAT-MSCs post - cryopreservation

The viability of frozen eAT-MSCs in all the treatments demonstrated a significant reduction when compared to fresh cells (Figure 3). However, the percentage of viable frozen eAT-MSCs in the presence only of DMSO was significantly superior ( $80.3 \pm 0.6$ ) to the observed in the other treatments. Frozen cells only in the presence of X-1000 ( $0.7 \pm 0.4$ ) or Trehalose ( $15.0 \pm 1.7$ ) demonstrated the lowest rates of viability post freezing (P < 0.05). Nevertheless, when the DMSO was associated with X-1000 (DMSO + X), the rate of cell viability was superior to 40% ( $47.0 \pm 3.5$ ), demonstrating then a beneficial effect of X-1000 when associated with DMSO. Moreover, the cell viability was similar (P > 0.05) between the combinations of DMSO + X-1000 and DMSO + Trehalose + X-1000 ( $42.8 \pm 1.5$ ). On the

contrary, it was verified that the association of DMSO + Trehalose  $(23.9 \pm 1.2)$  or X-1000 + Trehalose  $(24.5 \pm 2.2)$  did not favor the post-freezing cellular viability.



**Figure 3.** Mean ( $\pm$  SEM) percentages of cell viability of eAT-MSCs before and after freezing. \* Differs from Control. Different lowercase letters indicate significant difference among FS (P <0.05). T = Trehalose and X = SuperCool X-1000.

# CFU assay

After freezing, the eAT-MSCs from the freeing solutions that demonstrated cellular viability superior of 40% (DMSO, DMSO+X-1000 e DMSO+Trehalose+X-1000) were capable of multiple and form colonies similarly to the observed in the control group and did not differ (P > 0.05) among the groups (Figure 4).



Figure 4. Colony-forming unit of the eAT-MSCs. Mean ( $\pm$  SEM) percentages of CFU from the control and post-freezing groups of treatments with viability above 40% (A). Representative images of colony formation in the control group (B), and in different freezing solutions (C, D, and E). Staining: Giemsa; Scale bar = 100 µm. T = Trehalose; X = SuperCool X-1000.

#### Differentiation analysis post-cryopreservation

Fresh and frozen eAT-MSCs had morphological alterations by the chondrogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. The chondrogenic differentiation was confirmed by the presence of proteoglycans, stained by Alcian Blue in the histological sections of the cellular pellets (Figure 5; A, B, C, D). The data demonstrate that in the presence of only DMSO or the association of DMSO + Trehalose + X-1000, the eAT-MSCs had a chondrogenic differentiation potential similar (P > 0.05) to the control. On the other hand, the differentiation potential of the frozen cells in DMSO + X-1000 was inferior (P < 0.05) to control. However, no significant difference was observed between the different freezing treatments (P > 0.05).

Concerning the osteogenic differentiation, the confirmation was detected by the deposition of Calcium phosphate in the extracellular matrix stained by the Alizarin Red (Fig. 5; F, G, H, I). It was observed a reduction (P < 0.05) in the osteogenic potential intensity in the frozen eAT-MSCs in all treatments when compared to the control. However, among the different tested FS, no differences (P > 0.05) were observed (Figure 5 J).



**Figure 5.** Representative image of the differentiation potential of eAT-MSCs after culture of post-freezing groups of treatments with viability above 40%. Differentiation chondrogenic (A, B, C, and D), with the presence of proteoglycans. Differentiation osteogenic (F, G, H, and I), with the formation of a rich bone matrix. Differentiation adipogenic (K, L, M, and N), with the presence of fat droplets. Mean ( $\pm$  SEM) percentages of differentiation chondrogenic (E) and osteogenic (J). \*Differs from Control. Different lowercase letters indicate significant difference among FS (P <0.05). T = Trehalose; X = SuperCool X-1000.

The alteration of cell morphology confirmed the adipogenic lineage from fusiform to polygonal and by the presence of intracytoplasmic lepidic vesicles stained by Oil Red O (Fig. 5; K, L, M, and N). The frozen cells in all the treatments did not differ in the differentiation capability of the adipocytes about the control (Table 2).

Values (%) and references aspects				
Score	% of differentiated cells	Size and arrangement of		
		lipids droplets		
0	0-5	No droplets		
1	> 5 - 50	Isolated and small		
2	> 50 - 80	Medium sized		
3	> 80 - 100	Predominantly large		
Values (%) and references found				
Treatments	Average score	Size and arrangement of		
		lipids droplets		
Control	2	Medium sized		
DMSO	2	Medium sized		
DMSO+X	1,5	Isolated and small		
DMSO+T+X	2,5	Medium sized		

Table 2. Semi-quantitative scoring system used in the evaluation eAT-MSCs after adipogenic differentiation.

T – Trehalose and X – X-1000

# Discussion

In the present study, we investigate the effect of the cryopreserved eAT-MSCs in the presence of different freezing solutions, which were comprised by penetrating and non-penetrating CPAs, with or without association, on the viability, maintenance of the colony formation capacity, and the in vitro differentiation potential.

Initially, the isolated cells from the equine adipose tissue grew in a single layer, and assumed a fibroblastoid morphology, following the first criteria required to categorize the MSCs culture (Dominici et al., 2006; Bourin et al., 2013). Thereafter, during the culture, the cells demonstrated high capacity of adhesion in a plastic, an excellent capacity of multiplication, and at the end of the passages (P2), this cells expressed cell superficial markers, which matched with the classification of MSCs (positives: CD90 and CD44, and negatives for hematopoietic stem cells: CD86, MHC I and MHC II). Additionally, the cells showed an outstanding differentiation potential on the three induced lineages: osteogenic, adipogenic, and chondrogenic.

After freezing, all the treatments significantly reduced the viability of the eAT-MSCs when compared with the control, probably due to the osmotic stress, to the toxicity of the CPAs, or to the injuries related with the internal procedure of cryopreservation (Meryman et al., 2007; Ribeiro et al., 2012). Although the DMSO has been known by its toxicity, more than 80% of the freeze eAT-MSCs in an FS containing only the cryoprotector remained viable after thawing. These findings are under previous reports in equines, which showed that the utilization of DMSO in the FS of AT-MSCs had an elevation in the cell viability rate ( $84 \pm 3.9\%$ ) post-thawing (Renzi et al., 2012). The DMSO has a more widely used penetrating cryoprotectant of MSCs from the different tissues, such as equine umbilical cord (Maia et al., 2017), human bone medulla (Kaplan et al., 2017), and adipose tissue of sheep and mouse (Renzi et al., 2012). This cryoprotectant shows a low molecular weight (78.13 g/mol), that is why it can quickly pass through the plasmatic membrane, blinds to water molecules in solution, and then, blocks the hydric efflux of the cytoplasm during the freezing process. Consequently, the DMSO reduces the massive cellular dehydration, and maintains the stability of the saline concentrations and the pH, decreasing the formation as well as the size

of the ice crystals in the extracellular and intracellular media (Sauer-heilborn et al., 2004; Windrum et al., 2005).

On the other hand of the use of DMSO, the utilization of isolated Trehalose or X-100 was not capable of promoting a satisfactory cryoprotective effect of eAT-MSCs during the freezing, once both CPAs reduced the viability post-thawing ( $15.0 \pm 1.7\%$  and  $0.7 \pm 0.4\%$ ) drastically, respectively. This result could be because when used alone, the non-penetrating CPAs were not capable of avoiding the intracellular ice crystal formation (Elliott et al., 2017). However, the association of DMSO+X-1000 ( $47.0 \pm 3.5\%$ ) or DMSO +Trehalose+X-1000 ( $42.8 \pm 1.5\%$ ), guaranteed the viability of the half of cells, confirming the importance of the combination between penetrating and non-penetrating CPAs (Rodrigues et al., 2008; Motta et al., 2014; Solocinski et al., 2017). The action of both types of CPAs was complimentary; while the DMSO controls the reduction of the formation of intracellular ice crystals, the non-penetrating CPAs help in the maintenance of the stability of cellular membrane and reduces the osmotic shock (De Rosa et al., 2009; Renzi et al., 2012).

Differently of the penetrating CPAs that interfere in the cryopreservation by interacting with water, particularly the X-1000, acts in the nucleation point of ice in growth, inhibiting the blinding of other molecules of water in the flat surface, and avoiding then the formation of spicules in the ice crystals, which could cause great cell damages during the process. In this perspective, studies showed that the polymer X-1000 associated to the other CPAs, such as ethylene glycol and sucrose, or even the DMSO, resulting in a high viability after the vitrification of mouse embryos (72%: Badrzadeh et al., 2010a), and preantral follicles of monkeys (80%: Ting et al., 2012), respectively. Additionally, a recent study demonstrated that the vitrification of enclosed preantral follicles on caprine ovarian tissue in the presence of X-1000 polymer maintained the follicular morphology after seven days of in vitro culture, similarly to the observed for new or non-vitrified follicles (Viscarra, 2017).

By the other side, despite the association of penetrating and non-penetrating CPAs has been recommended, in the present study the association of DMSO+Trehalose resulted in a low percentage of viable cells (23.9%  $\pm$  1.2), which can be attributed an inadequate of the concentrations of DMSO (10%), in association of trehalose (60 mM). Recent findings demonstrated elevated rates of cellular viability post-thawing when the DMSO was associated with the trehalose in concentrations of 100 mM and 300 mM (85% and 75%), respectively in human hepatic carcinoma cells (Solocinski et al., 2017), and 500 mM (75%) in eAT-MSCs (Renzi et al., 2012). Based on these findings, we believed that other combinations of the nonpenetrating CPAs (X-1000 and Trehalose) in concentrations more elevated than the tested in the present study, which will permit a reduction in the concentration of DMSO, aiming to avoid the potentially deleterious effects in the use of high concentrations of penetrating CPAs.

Considering the low cellular viability obtained post freezing in the presence of trehalose ( $15.0 \pm 1.7\%$ ), X-1000 ( $0.7 \pm 0.4\%$ ), DMSO+Trehalose ( $23.9 \pm 1.2$ ), or Trehalose+X-1000 ( $24.5 \pm 2.2$ ), only the freezing cells in the FS, which resulted in a viability equal or superior to 40% were destined for the evaluation of the colony formation capacity and differentiation. The results demonstrated that the FS containing DMSO, DMSO+X-1000, or DMSO+Trehalose+X-1000, did not show differences in the potential to form colonies with the control. These findings were in agreement to a study performed with MSCs in an umbilical cord in equine, which showed that the freezing exerted few or no effect on the capacity of these cells in adhering and form colonies (Maia et al., 2017).

Generally, the present study showed that frozen cells in the different FS maintained the differentiation capacity for the adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages, as demonstrated the qualitative evaluation and indicating that this function was well preserved. However, the quantitative evaluation reveals that the osteogenic differentiation potential was inferior to the control group despite did not have differences among the FS (DMSO, DMSO+X-1000, and DMSO+Trehalose+X-1000). For the chondrogenic differentiation, only the DMSO+X-1000 showed a reduction in the differentiation potential to the control, but similar to the other treatments. Even with the exact mechanism of the pluripotency or multipotency has not been adequately explained (Naaldijk et al., 2012), it is known that the cell and tissue exposition to cryogenic temperatures alters many metabolic pathways. Overall, these modifications were characterized by the reduction in the activity of sodium and potassium pump, as well the alterations in the plasmatic membrane lepidic phase, and consequently interfering in the physiological function of enzymes and the precipitation of substances (Silva et al., 2017). We believe that these alterations could be the cause of the reduction in the differentiation potential of the eAT-MSCs after the different procedures of freezing investigated by our study.

Regarding the adipogenic differentiation, the frozen eAT-MSCs in all the treatments maintained the differentiation potential similar to the control. This finding showed a contrast to the observed in the osteogenic and chondrogenic differentiation, which did not affect the differentiation capacity of eAT-MSCs to adipocytes after slow freezing. This fact can be triggered by the existence of a higher predisposition of SC originated from the adipose tissue to effectively differentiated in adipocytes. The previous study (Fülber et al. 2016) reported that the ancestral microenvironment directs the "destination" cell upon differentiation when observed an elevated potential to chondrogenic differentiation when the SC used were originated from synovial tissue and not from the other sources. In parallel, the same cells had a low potential to the adipogenic differentiation. Similarly, Mochizuki et al. (2006) compared the differentiation capacity of SCs originated from the adipose tissue and the synovial membrane and also observed a better chondrogenic differentiation capacity of SC from the synovial origin. In conclusion, these findings confirmed the success of the slow freezing of eAT-MSCs in the presence of DMSO, demonstrated a high rate of cellular viability after the thawing. Moreover, the eAT-MSCs showed that the association of DMSO with the synthetic polymer X-1000 was extremely satisfactory concerning proliferation, colony formation capacity and cellular differentiation. Therefore, considering 1) the toxic effects caused to the cells by DMSO in the physiological and room temperature; 2) the loss of cells during the wash by the removal of DMSO before of the administration, and 3) the acceptable results of the association of DMSO with X-1000, we believe further investigations could be performed aiming to reduce the DMSO concentration, associated to the high concentrations of X-1000. Under this perspective, the possible reduction of the concentration of DMSO in the frozen protocols of SCs would eliminate the wash loss in the post-freezing cells, and consequently, minimizing the loss and the toxic effects observed during the previously cryopreserved SC transplantation.

# Acknowledgements

A. P. R. R is the recipient of a grant (number of the process: (308071/2016-6) from National Council of Technological and Scientific Development (CNPq). D. C. B is a recipient of a grant from FUNCAP (Brazil).

References

- Badrzadeh H, Najmabadi S, Paymani R, Macaso T, Azadbadi Z, Ahmady A (2010) Super cool X-1000 and SuperCool Z-1000, two ice blockers, and their effect on vitrification/warming of mouse embryos. Eur J Obstet Gyn R B. 151:70–71
- Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz A J, March KL, Redl H, Rubin J P, Yoshimura K, Gimble JM (2013) Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Cytotherapy, 15:641-642
- Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszyk C, Brehm W (2013) Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. Vet J 195:98–106
- Caruso C, Rizzo C, Mangano S, Poli A, Donato PD, Finore I, Nicolaus B, Marco G, MichaudL, Giudicea AL (2017) Production and biotechnological potentialities of extracellularpolymeric substances from sponge-associated Antarctic bactéria. Appl Environ Microbiol
- Castro SV, Carvalho AAC, Silva CMG, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR, (2011) Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. Acta Sci Vet 39:1–18
- Chabot D, Tremblay T, Paré I, Bazin R, Loubaki L (2017) Transient warming events occurring after freezing impairs umbilical cord–derived mesenchymal stromal cells functionality. Cytotherapy 19: 978-989
- Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, Cao J, Xie N, Velletri T, Zhang X, Xu C, Zhang L, Yang H, Hou J, Wang Y, Shi Y (2016) Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? Cell Death and Differ 23:1128-1139

- Deller RC, Vatish M, Mitchell DA, Gibson MI (2014) Synthetic polymers enable nonvitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing. Nat Commun 5:1–7
- De Rosa A, De Francesco F, Tirino V, Ferraro GA, Desiderio V, Paino F, Pirozzi G, D'Andrea F, Papaccio G (2009) A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: na attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. Tissue Eng Part C 15:659-667
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8:315–317
- Durgam S, Stewart M (2017) Evidence supporting intralesional stem cell therapy to improve equine flexor tendon healing. The Veterinary Evidence Handbook for writing Knowledge Summaries 1:1-16
- Elliott GD, Wang S, Fuller BJ (2017) Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. Cryobiology 1-18
- Feitosa MLT, Sarmento CAP, Bocabello RZ, Beltrão-Braga PCB, Pignatari GC, Giglio RF, Miglino MA, Orlandin J R, Ambrósio CE (2017) Transplantation of human immature dental pulp stem cell in dogs with chronic spinal cord injury. Acta Cir Bras 7:540-549
- Fülber J, Maria DA, Silva LCLC, Massoco CO, Agreste F, Baccarin RYA (2016) Comparative study of equine mesenchymal stem cells from healthy and injured synovial tissues: an in vitro assessment. Stem Cell Res Ther 7:35
- Frisbie DD, Smith RKW (2010) Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. Equine Vet J 42:86–89

- Ginani F, Soares DM, Barboza CAG (2012) Influência de um protocolo de criopreservação no rendimento in vitro de células-tronco derivadas do tecido adiposo. Rev Bras Cir Plást 27:359-363
- Gonçalves NN, Ambrósio CE, Piedrahita JA (2014) Stem cells and regenerative medicine in domestic and companion animals: a multispecies perspective. Reprod Domest Anim 4:2-10
- Gurruchaga H, Ciriza J, Burgo LS, Rodriguez-Madoz JR, Santos E, Prosper F, Hernández RM, Orive G, Pedraz JL (2015) Cryopreservation of microencapsulated murine mesenchymal stem cells genetically engineered to secrete erythropoietin. Int J Pharm 485:15-24
- Hackett CH, Greve L, Novakofski KD, Fortier LA (2011) Embryonic stem cells and iPS cells: sources and characteristics. Vet Clin North Am Equine Pract 27:233–242
- Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, Kim JE, Shim H, Shin JS, Shin IS, Ra JC, Oh S, Yoon KS (2014) Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial. Stem Cells 32:1254-1266
- Kaplan A, Sackett K, Sumstad D, Kadidlo D, McKenna DH (2017) Impact of starting material (fresh versus cryopreserved marrow) on mesenchymal stem cell culture. Transfusion
- Khodadadi K, Sumer H, Pashaias M, Lim S, Williamson M, Paul J. Verma PJ (2012) Induction of Pluripotency in Adult Equine Fibroblasts without c-MYC. Stem Cells Int 2012:9
- Koga H, Muneta T, Ju YJ, Nagase T, Nimura A, Mochizuki T, Ichinose S, Mark KVD, Sekiya I (2007) Synovial Stem Cells Are Regionally Specified According to Local

Microenvironments After Implantation for Cartilage Regeneration. Stem Cells 25:689-696

- Leandro Maia L, Dias MC, 1, Moraes CN, Freitas-Dell'aqua CP, Mota LSLS, Santiloni V, Alvarenga FCL (2017) Conditioned medium: a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells. Cell Biol Int
- Mambelli LI, Santos EJC, Frazão PJR, Chaparro MB, Kerkis A, Zoppa ALV, Kerkis I, (2009) Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. Tissue Eng Part C 15:87–94
- Martinetti D, Colarossi C, Buccheri S, Gabriella Denti G, Lorenzo Memeo L, Luisa Vicari L (2017) Effect of trehalose on cryopreservation of pure peripheral blood stem cells. Biomed Rep 6:314-318
- Meryman HT (2007) Cryopreservation of living cells: principles and practice. Transfusion 47:935-945
- Mitchell A, Rivas KA, Smith R, Watts AE (2015) Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95 % autologous serum and 5 % DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95 % and DMSO at 10 or 5 %. Stem Cell Res Ther 6:231
- Motta JPR, Gomes BE, Bouzas LF, Paraguassú-Braga FH, Porto LC, (2010) Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. Cryobiology 60:301–307
- Motta JPR, Paraguassú-Braga FH, Bouzas LF, Porto LC (2014) Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. Cryobiology 68:343–348

- Naaldijk Y, Staude M, Fedorova V, Stolzing A (2012) Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. BMC Biotechnol 12:49
- Pêssoa LVF (2016) Estudo do potencial de pluripotência de células tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical submetidas á reprogramação induzida geneticamente (células iPS). Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres)
  FMVZ USP Pirassununga
- Ranera B, Lyahyaia J, Romero A, Vázqueza FJ, Remacha AR, Bernalc ML, Zaragoza P, Rodellara C, Martín-Burriela I (2011) Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. Vet Immunol Immunopathol 144:147-154
- Renzi S, Lombardo T, Dotti S, Dessi SS, De Blasio P, Ferrari M (2012) Mesenchymal stromal cell cryopreservation. Biopreserv Biobank 10:276-281
- Ribeiro G, Massoco CO, Neto JCL (2012) Viabilidade celular da fração mononuclear da medula óssea e fração vascular estromal do tecido adiposo de equinos após o processo de congelamento e descongelamento. Pesq Vet Bras 32:118-124
- Rodrigues, JP, Paraguassú-Braga FH, Carvalho L, Abdelhay E, Bouzas LF, Porto LC (2008) Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. Cryobiology 56:144-151
- Sauer-Heilborn A, Kadidlo D, McCullough J (2004) Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. Transfusion 44:007-916
- Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D (2014) Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. Transfusion 54:1418-1437
- Silva AAR, Rodrigues CG, Silva MB (2017) Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular. Rev Bio 17:13-18

- Solocinski J, Osgood Q, Wang M, Connolly A, Menze MA, Chakraborty N (2017) Effect of trehalose as an additive to dimethyl sulfoxide solutions on ice formation, cellular viability, and metabolism. Cryobiology 75:134-143
- Sousa WB, Timóteo MA, Lopes ICR, Silva VJD (2014) Criopreservação de células tronco e suas aplicações. RBCTI 1:45-56
- Shu Z, Heimfeld S, Gao D. (2014) Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Adverse Reactions after Transplantation and Cryoprotectant Removal Prior to Infusion. Bone Marrow Transplant 4:469-476
- Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB, (2012) Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. Hum Rep 28:1267–1279
- Trela JM, Spriet M, Padgett KA, Galuppo LD, Vaughan B, Vidal MA (2014) Scintigraphic comparison of intra-arterial injection and distal intravenous regional limb perfusion for administration of mesenchymal stem cells to the equine foot. Equine Vet J 46:479-483
- Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM (2007) Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Vet Surg 36:613–622
- Vidane AS, Zomer HD, Oliveira BM, Guimarães CF, Fernandes CB, Perecin F, Silva LA, Miglino MA, Meirelles FV, Ambrósio CE (2013) Reproductive stem cell differentiation: extracellular matrix, tissue microenvironment, and growth factors direct the mesenchymal stem cell lineage commitment. Reprod Sci 1137-1143
- Vidane AS, Pinheiro AO, Casals JB, Passarelli D, Hage M, Bueno RS, Martins DS, Ambrósio CE (2017) Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent cells ameliorates

and delays the progression of chronic kidney disease in cats. Reprod Domest Anim 2:316-326

- Vizcarra AMD (2017) Uso de polímeros sintéticos melhora a qualidade de folículos préantrais caprinos vitrificados e cultivados no tecido ovariano. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) PPGCV UECE Fortaleza
- Wowk B, Leitl E, Rasch CM, Karimi NM, Harris SB, Fahy GM (2000) Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agents. Cryobiology 40:228–236
- Windrum P, Morris TCM., Drake MB, Niederwieser D, Ruutu T (2005) Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. Bone Marrow Transplantation 36:601-603

Zomer HD, Vidane AS, Gonçalves NN, Ambrósio CE (2015) Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. Stem Cells Cloning 8:125-134.

# 7 CONCLUSÕES

Esse estudo demonstrou o sucesso da congelação lenta de eCTMs na presença do DMSO, pela alta taxa de viabilidade celular após a descongelação. Além disso, demonstrou também que, a associação do DMSO ao polímero X-1000 foi satisfatória em relação aos parâmetros de proliferação, capacidade de formação de colônias e diferenciação celular.

# **8 PERSPECTIVAS**

Acreditamos que estudos adicionais possam ser realizados utilizando novas combinações entre os ACPs avaliados, com o objetivo de reduzir a concentração de DMSO, associado a concentrações mais altas do X-1000. Sob esta perspectiva, a possível redução da concentração de DMSO nos protocolos de congelação de CT quando em associação ao X-1000 poderá eliminar a necessidade de lavagem das células pós congelação e, consequentemente, minimizar as perdas e os efeitos tóxicos adversos observados durante o transplante das CT previamente criopreservadas.

# REFERÊNCIAS

ALVES, A.L.G.; VIEIRA, M.E.M.; BARREIRA, A.P.B.; MOTA, L.S.L.S.; SAITO, M.E.; KOHAYGAWA, A.; HUSSNI, C.A.; WATANABE, M.J.; OLIVEIRA, P.G.G. Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.4, p.650–655, 2009.

ALVES, A.L.G.; STEWART, A.A.; DUDHIA, J.; KASASHIMA, Y.; GOODSHIP, A.E.; SMITH, R.K.W. Cell-based therapies for tendons and ligament injuries. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.27, p.315-333, 2011.

ARNHOLD, S.J.; GOLETZ, I.; KLEIN, H.; STUMPF, G.; BELUCHE, L.A..; ROHDE, C.; ADDICKS, K.; LITZKE, L.F. Isolation and characterization of bone marrow – derived equine mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v.68, n.10, p.1095-1105, 2007.

BADRZADEH, H.; S. NAJMABADI, S.; PAYMANI, R.; MACASO, T.; AZADBADI, Z.; AHMADY, A. Super cool x-1000 and supercool z-1000, two ice blockers, and their effect on vitrification/warming of mouse embryos. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v.151, n.1, p.70–71, 2010.

BI, Y.; EHIRCHIOU, D.; KILTS T.M.; INKSON, C.A.; EMBREE, M.C.; SONOYAMA, W.; LI, L.; LEET A.I., SEO, B.; ZHANG, L.; SHI, S.; YOUNG, M. F. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. **Nature Medicine**, v.13, n.10, p.1219-1227, 2007.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assay. **Cell Stem Cell**, v.2, n.4, p.313-319, 2008.

BURK, J.; RIBITSCH, I.; GITTEL, C.; JUELKE, H.; KASPER, C.; STASZYK, C.; BREHM, W. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. **The Veterinary Journal**, v.195, p.98–106, 2013.

BURK, J.; BADYLAK, S.F.; KELLY, J.; BREHM, W. Equine Cellular Therapy - From Stall to Bench to Bedside? **Citometry Part A**, v.83A, p.103-113, 2013.

BUCHANAN, S.S; GROSS, S.A; ACKER J.P; TONER, M; CARPENTER J.F; PYATT, D.W. Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. **Stem Cells and Development**, v.13, p.295-305, 2004.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, supl. 1, p.25-35, 2009.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v.9, p.641-650, 1991.

CARPENTER, J.F.; HANSEN, T.N. Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: mediation through influence on ice crystal growth. **Proceedings of the** 

**National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, n.19, p.8953–8957, 1992.

CARRADE, D.D.; LAME, M.W.; KENT, M.S.; CLARK, K.C.; WALKER, N.J.; BORJESSON, D.L. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. **Cell Medicine**, v.4, p.1–11, 2012.

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES A.L.G.; OLIVEIRA, P.G.G.; ÁLVAREZ, L.E.C.; AMORIM, R.L.; HUSSNI, C.A.; DEFFUNE, E. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. Journal of Equine Veterinary Science, v.31, n.1, p.26–34, 2011.

DE MATTOS CARVALHO, A.; BADIAL, P.R.; ÁLVAREZ, L.E.C.; YAMADA, A.L.M.; BORGES, A.S.; DEFFUNE, E.; HUSSNI, C.A.; ALVES, AL.G. Equine tendonitis therapy using mesenchymal stem cells and platelet concentrates: a randomized controlled trial. **Stem Cell Research & Therapy**, v.4, n.4, p.85, 2013.

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

DE SCHAUWER, C.; GOOSSENS, K.; PIEPERS, S.; HOOGEWIJS, M.K.; GOVAERE, J.L. J.; SMITS, K.; MEYER, E.; SOOM, A.V.; VAN DE WALLE, G.R. Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. **Stem Cell Research & Therapy**, v.5, n.1, p.6, 2014.

DEVRIES A.L.; KOMATSU, S.K.; FEENEY, R.E. Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from antarctic fishes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.245, n.11, p.2901-2908, 1970.

DELLER, R.C.; VATISH, N.; MITCHELL, D.A.; GIBSON, M.I. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing. **Nature Communications**, v.5, p.1–7, 2014.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315–317, 2006.

DUAN, W.; LOPEZ, M. J.; HICOK, K. Adult multipotent stromal cell cryopreservation: pluses and pitfalls. **Veterinary Surgery**, v.47, p.19-29, 2017.

DURGAM, S; STEWART, M. Evidence supporting intralesional stem cell therapy to improve equine flexor tendon healing. **Veterinary Evidence Online**, v.2, n.1, p.1-16, 2017.

ELLIOTT, G.D.; WANG, S.; FULLER, B.J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, p.1-18, 2017.

FAHY, G. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v.60, p.545-553, 2010. FAITA, T.; SILVA, V.N.; SATTIN, W.R.; PINHEIRO, A.O.; AMBRÓSIO, C.E. Membrana amniótica: fonte alternativa de células-tronco mesenquimais em diversas espécies animais. **Pesquisa. Veterinária. Brasileira**, v.36, n.6, p.520-525, 2016.

FILHO S.T.L.P.; TREICHEL, T.L.E.; JUNIOR, J.S.A.; ROSA. M.B.; DALMOLIN, F.; BRUN, M.V.; KRAUSE, A.; PIPPI, N.L. Células-Tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.49-59, 2013.

FLEMING, K.K.; HUBEL, A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. **Transfusion and Apheresis Science**, v.34, n.3, p.309–315, 2006.

FRIEDESTEIN, A.J.; CHAILAKHYAN, R.K.; LATSINIK, N.V.; PANASYUK, A.F.; KEILISS-BOROK, I.V.Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, v.17, n.4, p.331-334, 1974.

FRISBIE, D.D.; SMITH, R.K.W. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. **Equine Veterinary Journal**, v.42, p.86–89, 2010.

FUJIMURA, J.; OGAWA, R.; MIZUNO, H.; FUKUNAGA, Y.; SUZUKI, H. Neural differentiation of adipose-derived stem cells Isolated from GFP transgenic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.333, p.116–121, 2005.

FUJII, S; MIURA, Y; IWASA, M; YOSHIOKA, S; FUJISHIRO, A; SUGINO, N; KANEKO, H; NAKAGAWA, Y; HIRAI, H; TAKAORI-KONDO, A; ICHINOHE, T; MAEKAWA, T. Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from cryopreserved umbilical cord blood cells. **Journal of Clinical and Experimental Hematopathology**, v.57, n.1, p.1-8, 2017.

FULLER, B.J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state **CryoLetters**, v.25, n.6, p.375-388, 2004.

GAO, D; CRITSER, J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, v.41, n.4, p.187-196, 2000.

GIMBLE, J.M.; KATZ, A.J.; BUNNELL, B.A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circulation Research**, 2007.

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

GIOVANNINI, S.; BREHM, W.; MAINIL-VARLET, P.; NESIC, D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. **Differentiation**, v.76, p.118-129, 2008.

GURRUCHAGA, H; CIRIZA, J; BURGO, L.S; RODRIGUEZ-MADOZ, J.R; SANTOS, E; PROSPER, F; HERNÁNDEZ, R.M; ORIVE, G; PEDRAZ, J.L. Cryopreservation of

microencapsulated murine mesenchymal stem cells genetically engineered to secrete erythropoietin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.485, p.15-24, 2015.

HANNA, C; HENNEBOLD, J. Ovarian germline stem cells: an unlimited source of oocytes? **Fertility and Sterility**, v.101, n.1, p.20-30, 2014.

HASHIMOTO, S.; SUZUKI, N.; YAMANAKA, M.; YOSHIHIKO HOSOI, Y.; ISHIZUKA, B.; MORIMOTO, Y. Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues. **Reproductive Biomedicine Online**, v.21, p.501-509, 2010.

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

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

KATZ, A.J.; THOLPADY, A.; THOLPADY, S.S.; HULAN SHANG, H.; ROY C. OGLE, R.C. cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hadas) cells. **Stem Cells**, v.23, p.412-423, 2005.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K., 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, K. J.; LEE, Y.; KIM, B.; KIM, Y.; KIM, B.; KANG, H.; JUNG, S.; CHOI, S.; SCHMIDT, J.A.; RYU, B. Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing. **Cryobiology**, v.70, p.175–183, 2015.

KOERNER, J.; NESIC, D.; ROMERO, J. D.; BREHM, W.; MAINIL-VARLET, P.; GROGAN, S. P. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.24, n.6, p.1613–1619, 2006.

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

LOVELOCK, J.E; BISHOP, M.W.H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. **Nature**, v.183, p.1394-1395, 1959.

LIU, Y; XU, X; MA, X; LIU, J; CUI, Z. Effect of various freezing solutions on cryopreservation of mesenchymal stem cells from different animal species. **CryoLetters**, v.32, n.5, p.425-435, 2011.

MAIA, L.; DIAS, M.C.; MORAES, C.N.; DELL'AQUA, P.F.; MOTA, L.S.L.S.; SANTILONI, V.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Conditioned medium: a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v.41, n.3, p.239-248, 2017. MAMBELLI, L. I.; ENRICO J.C. SANTOS, E.J.C.; FRAZÃO, P.J.R.; CHAPARRO, M.B.; KERKIS, A.; ZOPPA, A.L.V.; KERKIS, I. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue engineering. Part C**, Methods, v.15, n.1, p.87–94, 2009.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; JIMÉNEZ-TRIGOS, E.; LAVARA, R.; VICENTE, J. S. Generation of live offspring from vitrified embryos with synthetic polymers SuperCool X-1000 and SuperCool Z-1000. **CryoLetters**, v.35, n.4, p.286-292, 2014.

MARIÑAS-PARDO L.; GARCÍA-CASTRO, J.; RODRÍGUEZ-HURTADO, I.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.; NÚÑEZ-NAVEIRA, L.; HERMIDA-PRIETO, M. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Horse Allo20) for the treatment of osteoarthritis associated lameness in horses: characterization, safety and efficacy of intra articular treatment. **Stem Cells and Development**, p.1-67,2018.

MARQUEZ-CURTIS, L.A.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; MCGANN, L.E.; ELLIOTT, J.A.W. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. **Cryobiology**, v.71, n.2, p.181-192, 2015.

MARTINELLO T.; BRONZINI, I.; MACCATROZZO, L.; IACOPETTI, I.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F.; PATRUNO, M. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. **Tissue Engineering: Part C**, v.16, n.4, 2010.

MERCATI, F.; PASCUCCI, L.; CURINA, G.; SCOCCO, P.; TARDELLA, F.M.; DALL'AGLIO, C.; MARINI, C.; CECCARELLI, P. Evaluation of storage conditions on equine adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells. **The Veterinary Journal**, v.200, n.2, p.339–342, 2014.

MERYMAN, H. T. Cryopreservation of living cells: principles and practice. **Transfusion**, v.47, p.935-945, 2007.

MITCHELL, A.; RIVAS, K.A.; SMITH, R.; WATTS, A.E. Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95 % autologous serum and 5 % DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95 % and DMSO at 10 or 5 %. **Stem Cell Research & Therapy**, v.6, p.231, 2015.

MOHANTY, N.; GULATI, B.R.; KUMAR, R.; GERA, S.; KUMAR, S.; KUMAR, P.; YADAV, P.S. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from equine umbilical cord blood. **Cytotechnology**, v.68, n.4, p.795–807, 2016.

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

MOTTA, J.P.R.; PARAGUASSÚ-BRAGA, F.H.; BOUZAS, L.F.; PORTO, L.C. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. **Cryobiology**, v.68, n.3, p.343–348, 2014.
MUTTINI, A.; SALINI, V.; VALBONETTI, L.; ABATE, M. Stem cell therapy of tendinopathies: suggestions from veterinary medicine. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v.2, n.3, p.187-192, 2012.

NTAI, A; LA SPASA, A; DE BLASIO, P; BIUNNO, I. trehalose to cryopreserve human pluripotent stem cells. **Stem Cell Research**, v.31, p.102-112, 2018.

PELTIER, R.; BRIMBLE, M.A.; WOJNAR, J.M.; WILLIAMS, D.E.; EVANS, C.W. DEVRIES, A.L. Synthesis and antifreeze activity of fish antifreeze glycoproteins and their analogues. **Chemical Science**, v.1, n.5, p.538–551, 2010.

PESSÔA, L.V.F. **Estudo do potencial de pluripotência de células tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical submetidas á reprogramação induzida geneticamente (células iPS)**. 2016. 133f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

PETSA, A.; GARGANI, S.; FELESAKIS, A.; GRIGORIADIS, N.; GRIGORIADIS, J. Effectiveness of protocol for the isolation of Wharton's Jelly stem cells in large-scale applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v.45, p.573-576, 2009.

POLLOCK, K.; SUMSTAD, D.; KADIDLO, D.; MCKENNA, D. H.; HUBEL, A. Clinical mesenchymal stromal cell products undergo functional changes in response to freezing. **Cytotherapy**, v.17, n.1, p.38–45, 2015.

RANERA, B.; ORDOVÁS, L.; LYAHYAI, J.; BERNAL, M.L.; FERNANDES, F.; REMACHA, A.R.; ROMERO, A.; VÁZQUEZ, F.J.; OSTA, R.; CONS, C.; VARONA, L.; ZARAGOZA, P.; MARTÍN-BURRIEL, I.; RODELLAR, C. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. **Equine Veterinary Journal**, v.44, p.33-42, 2012.

RANERA, B.; LYAHYAIA, J.; ROMERO, A.; VÁZQUEZA, F.J.; REMACHA, A.R.; BERNALC, M.L.; ZARAGOZA, P.; RODELLAR, C.; MARTÍN-BURRIEL, I. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.144, p.147-154, 2011.

RAO, W.; HUANG, H.; WANG, H.; ZHAO, S.; DUMBLETON, J.; ZHAO, G.; HE, X. Nanoparticle-Mediated Intracellular Delivery Enables Cryopreservation of Human Adipose-Derived Stem Cells Using Trehalose as the Sole Cryoprotectant. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.7, p 5017-5028, 2015.

RAY S.S.; PRAMANIK, K.; SARANGI, S.K.; JAIN, N. Serum-free non-toxic freezing solution for cryopreservation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Biotechnology Letters**, v.38, p.1397-1404, 2016.

RENZI S.; LOMBARDO, T.; SILVIA DOTTI, S.; DESSI, S.S.; DE BLASIO, P.; FERRARI, M. Mesenchymal stromal cell cryopreservation. **Biopreservation and Biobanking**, v.10, n.3, p.276-281, 2012.

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

RODRÍGUEZ-LUCENA, D.; BENITO, J.M.; ÁLVAREZ, E.; JAIME, C.; PEREZ-MIRON, J.; MELLET, C.O.; FERNÁNDEZ, J. M. G. Synthesis, structure, and inclusion capabilities of trehalose-based cyclodextrin analogues (cyclotrehalans). **Journal of Organic Chemistry**, v.73, n.8, p.2967–2979, 2008.

SCHWARZ, C; LEICHT, U; DROSSE, I; ULRICH, V; LUIBL, V; SCHIEKER, M; RÖCKEN, M. Characterization of adipose-derived equine and canine Mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. **Veterinary Research Communications**, v.35, p.487-499, 2011.

SCHIPANI, E.; KRONENBERG, H.M. Adult mesenchymal stem cells. In: Harvard Stem Cell Institute. **Stembook,** Cambridge, MA: The Stem Cell Research Community, 2009. cap. 36, p1-7.

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

SMITH, R.K.W.; GARVICAN, E.R.; FORTIER, L.A. The current 'state of play' of regenerative medicine in horses: what the horse can tell the human. **Regenerative Medicine**, v.9, n.5, p.673-685, 2014.

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

SPASS, J; DE SCHAUWER, C; CORNILLIE, P; MEYER, E; VAN SOOM, A; VAN DE WALLE, G.R. Culture and characterization of equine peripheral blood mesenchymal stromal cells. **The Veterinary Journal**, v.195, p.107-113, 2013.

STEWART, M.C.; STEWART, A.A. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.27, n.2, p.243–261, 2011.

STOKICH, B.; OSGOOD, Q.; GRIMM, D.; MOORTHY, S.; CHAKRABORTY, N.; MENZE, M.A. Cryopreservation of hepatocyte (HepG2) cell monolayers: Impact of trehalose. **Cryobiology**, v.69, n.2, p.281–290, 2014.

TAVASSOLI, M.; CROSBY, W. H. Transplantation of marrow to extramedullary sites. **Science**, v.161, p.54-56, 1968.

TIAN, T.; ZHAO, G.; HAN, D.; ZHU, K.; CHEN, D.; ZHANG, Z.; WEI, Z.; CAO, Y.; ZHOU, P. Effects of vitrification cryopreservation on follicular morphology and stress relaxation behaviors of human ovarian tissues: Sucrose versus trehalose as the non-permeable protective agent. **Human Reproduction**, v.30, n.4, p.877–883, 2015.

TILL, J.E.; MCCULLOCH, E.A.; SIMINOVITCH, L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. **Physiology**, v.51, p.29-36, 1964.

TING, A.Y.; YEOMAN, R.R.; LAWSON, M.S.; ZELINSKI, M.B. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. **Human Reproduction**, v.28, n.5, p.1267–1279, 2012.

VIDAL, M.A.; KILROY, G.E.; LOPEZ, M.J.; JOHNSON, J.R.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v.36, n.7, p.613–622, 2007.

VITA, B.; CAMPOS, L.L.; LISTONI, A.J.; MAIA, L.; FREITAS, N.P.P.; ALVARENGA, F.L.; PRESTES, N.C. Anexos fetais: uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais para a medicina veterinária equina. **Veterinária e Zootecnica**, v.19, n.1, p.8-22, 2012.

VIZCARRA, Alberto Montano Diego. (In) Uso de polímeros sintéticos melhora a qualidade de folículos pré-antrais caprinos vitrificados e cultivados no tecido ovariano. 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2017.

WOWK, B.; LEITL, E.; RASCH, C.M.; MESBAH-KARIMI, N.; HARRIS, S.B.; FAHY, G.M. Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agents. **Cryobiology**, v.40, n.3, p.228-236, 2000.

YONG, K.W.; BELINDA PINGGUAN-MURPHY, B.; XU, F.; ABAS, W.A.B.W.; CHOI, J.R.; OMAR, S.Z.; AZMI, M.A.N.; CHUA, K.H.; SAFWANI, W.K.Z.W. Phenotypic and Functional Characterization of Long-Term Cryopreserved Human Adipose-derived Stem Cells. **Scientific Reports**, v.5, p.9596, 2015.

ZHANG, Y.; XIA, X.; YAN, J.; YAN, L.; LU, C.; ZHU, X.; WANG, T.; YIN, T.; R.; CHANG, H.; QIAO, J. Mesenchymal stem cell-derived angiogenin promotes primodial follicle survival and angiogenesis in transplanted human ovarian tissue. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.15, n.1, p.18, 2017.

ZUCCA, E.; CORSINI, E.; GALBIATI, V.; LANGE-CONSIGLIO, A.; FERRUCCI, F. Evaluation of amniotic mesenchymal cell derivatives on cytokine production in equine alveolar macrophages: an in vitro approach to lung inflammation. **Stem Cell Research and Therapy**, v.7, p.137, 2017.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, 2001.