



## **Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação para células-tronco mesenquimais caninas**

### **Evaluation of different cryopreservation protocols for canine mesenchymal stem cells**

Brisa Miranda Andrade Santos <sup>1</sup>, Marianna Gabrielle Almeida Galvão <sup>2</sup>, Adriana Bozzi <sup>3\*</sup>

1. Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)
2. Mestra em Biologia e Biotecnologia de microrganismos da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)
- 3\*. Autor correspondente: Adriana Bozzi. abozzi@uesc.br. Doutora em Imunologia e Docente da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Endereço: Campus Soane Nazaré de Andrade, Rod. Jorge Amado, Km 16 - Salobrinho, Ilhéus - BA, 45662-900

#### **RESUMO**

**Introdução:** as células-tronco mesenquimais (CTM) são candidatas para o reparo tecidual e controle da inflamação no tratamento de diversas doenças veterinárias. Neste contexto, é importante a criopreservação dessas células para a criação de biobancos e disponibilidade imediata em terapêuticas celulares, garantindo a manutenção de suas características funcionais e transporte adequado. **Objetivos:** expandir *in vitro* e caracterizar morfológicamente as CTM de cães; avaliar diferentes protocolos de criopreservação para as CTM, tendo como padrão a criopreservação de células VERO que são células de linhagem contínua provenientes de rim de macaco. **Metodologia:** as CTM foram extraídas do tecido adiposo subcutâneo de cães utilizando a enzima collagenase tipo II e fragmentação física, e caracterizadas morfológicamente por microscopia óptica. As células VERO foram expandidas *in vitro* a partir de uma cultura secundária. A avaliação de um protocolo de criopreservação eficiente para as CTM tendo como padrão as células VERO foi feita utilizando-se dois protocolos: “Protocolo A”, solução contendo 10% dimetilsulfóxido (DMSO) em soro fetal bovino (SFB); “Protocolo B”, solução contendo 5% DMSO e 20%



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

SFB, em meio RPMI. Em ambos os protocolos as células foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 dias e a viabilidade das CTM e das células VERO foi analisada, antes e após o congelamento, por coloração em Azul de Trypan 0,4% em PBS. **Resultados e discussão:** as células extraídas do tecido adiposo de cães apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos e aderência à plataforma de cultura, com um tempo de confluência reduzido a cada passagem de cultura. Após trinta dias da criopreservação, as CTM apresentaram viabilidade de 71,2% e 72%, quando recuperadas dos protocolos A e B, respectivamente. Em comparação com as células VERO que apresentaram uma viabilidade de 80,90% e 68,5%, quando recuperadas dos protocolos A e B, respectivamente, ambos os protocolos foram adequados para o congelamento das CTM, uma vez que não se observou diferenças significativas na viabilidade celular antes e após o congelamento. Entretanto, as células VERO foram recuperadas com uma viabilidade maior quando se utilizou o protocolo A. Isto pode ser explicado pela porcentagem maior de SFB no protocolo A. **Conclusão:** a depender da linhagem celular, o protocolo de congelamento celular poderá interferir na viabilidade da célula após o descongelamento. Além disso, o uso de uma porcentagem maior de SFB poderá favorecer a recuperação celular.

**Palavras-chave:** Terapêutica celular; Biobancos; Clínica Veterinária; Viabilidade Celular; Proliferação celular.

## ABSTRACT

**Introduction:** mesenchymal stem cells (MSCs) are candidates for tissue repair and inflammation control in the treatment of several veterinary diseases. In this context, it is important to cryopreservation of these cells for the creation of biobanks and immediate availability in cellular therapies, ensuring the maintenance of their functional characteristics and adequate transport. **Objectives:** to expand in vitro and morphologically characterize canine MSCs; to evaluate different cryopreservation protocols for MSCs, taking as standard the cryopreservation of VERO cells, which are continuous lineage cells from monkey kidney. **Methodology:** MSCs were extracted from the subcutaneous adipose tissue of dogs using the enzyme collagenase type II and physical fragmentation, and morphologically characterized by optical microscopy. VERO cells were expanded in vitro from a secondary culture. The evaluation of an efficient cryopreservation protocol for MSCs using VERO cells as the standard was performed using two protocols: "Protocol A", a solution containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in fetal bovine serum (FBS); "Protocol B", a solution containing 5% DMSO and 20% FBS, in RPMI medium. In both protocols, the cells were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 30 days and the viability of MSCs and VERO cells was analyzed, before and after freezing, by staining with 0.4% Trypan Blue in PBS. **Results and discussion:** the cells extracted from the adipose



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

tissue of dogs presented morphology similar to fibroblasts and adherence to the culture platform, with a reduced confluence time with each culture passage. After 30 days of cryopreservation, the MSCs presented viability of 71.2% and 72%, when recovered from protocols A and B, respectively. In comparison with VERO cells, which showed viability of 80.90% and 68.5% when recovered from protocols A and B, respectively, both protocols were suitable for freezing MSCs, since no significant differences in cell viability were observed before and after freezing. However, VERO cells were recovered with higher viability when protocol A was used. This can be explained by the higher percentage of FBS in protocol A. Conclusion: depending on the cell line, the cell freezing protocol may interfere with cell viability after thawing. Furthermore, the use of a higher percentage of FBS may favor cell recovery.

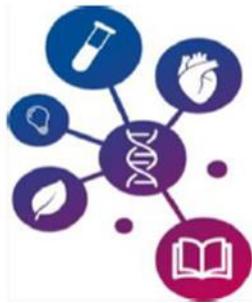
**Keywords:** Cell therapy; Biobanks; Veterinary Clinic; Cell viability; Cell proliferation.

## Introdução

As células-tronco mesenquimais (CTM) são uma população heterogênea de células multipotentes que apresentam a capacidade de se diferenciar em células do mesênquima como adipócitos, condrócitos e osteócitos (1), com funções na regeneração de tecidos e na imunomodulação. Desta forma, interferem na inflamação por meio da modulação das respostas da imunidade inata (2) e adquirida, quando em microambientes inflamatórios com altos níveis de interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (3).

Além disso, outros efeitos terapêuticos têm sido observados como promoção da angiogênese, sobrevivência da célula e quimiotáticas. O mecanismo de ação das CTM ocorre através da liberação de mediadores parácrinos anti-inflamatórios (4), como também através da liberação de exossomos que atuam como mensageiros da comunicação celular independente do contato célula a célula (5).

A manutenção das células em cultura por longo período pode proporcionar efeitos deletérios como instabilidade fenotípica, morte celular, senescência e até contaminação (6). Sendo assim, o desenvolvimento de procedimentos adequados de armazenamento a médio e longo prazo são de fundamental importância para manutenção da viabilidade celular, além



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

de manter suas características como sua capacidade fenotípica, capacidade de diferenciação para contribuir diretamente em sua aplicação terapêutica *in vivo* (7).

A criopreservação consiste na conservação de células, tecidos ou amostras biológicas em temperaturas negativas, na presença de crioprotetores como DMSO, glicerol, etilenoglicol ou propilenoglicol para manutenção da integridade da amostra para posterior utilização (8). Dessa forma, a criopreservação celular possibilita o armazenamento e transporte celular sem danificá-las, possibilitando aplicações clínicas, além de reduzir o tempo de espera da amostra ficar pronta e tornando-a de maior qualidade (9). Dessa forma, a criopreservação e o armazenamento de células-tronco são essenciais para que um biobanco mantenha uma coleção de linhagens celulares para pesquisa e uso clínico (10).

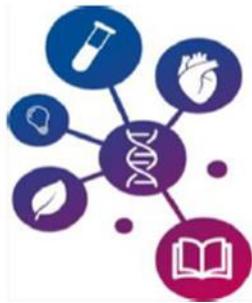
Dessa forma, o objetivo central do trabalho foi avaliar dois protocolos de criopreservação para CTM a fim de analisar a sua viabilidade e identificação do protocolo mais eficaz. Como comparação, os mesmos protocolos foram avaliados em células VERO, as quais são células epiteliais renais de linhagem contínua, extraídas de um macaco verde africano.

## Material e Métodos

### *Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais*

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) sob o número 008/20. As CTM foram obtidas de cães provenientes do hospital veterinário da UESC.

Inicialmente o fragmento de tecido adiposo da região inguinal de cães, isolado cirurgicamente, foi lavado com PBS 0,15M. A fim de se separar as CTM da fração adipocitária, o tecido foi fragmentado com uma tesoura e, posteriormente, incubado com solução de colagenase do tipo II (Sigma) a 0,15% por 60 min em estufa (37° C, 5% de CO<sub>2</sub>),



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

sendo periodicamente agitado.

Após esse período, o material biológico foi centrifugado a 1400 RPM por 10 min e, em seguida, o sobrenadante descartado. O precipitado de células foi ressuspensionado em meio DMEM (Meio Eagle Modificado de Dulbecco) (Gibco) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB; Cultilab), 1% dos antibióticos penicilina/estreptomicina (Biopremier) e 60 mg/mL de gentamicina (Chemitec) e, então cultivado em placas de seis poços (Nunc), em uma estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C até a confluência em um grau aproximado de 90%.

O meio de cultura foi trocado pelo menos duas vezes a cada semana. Quando as células atingiram o grau de confluência de 80-90%, foi feita a passagem de um poço para dois poços de uma placa de seis poços. Esse tratamento permitiu a expansão da população de CTM e, conseqüentemente sua purificação. Tratamento realizado até a terceira passagem (P3), a fim de evitar a senescência proliferativa, quando as células foram utilizadas.

## ***Cultura de células VERO***

As células VERO utilizadas já se encontravam preservadas a -80°C e foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas adicionando-se meio RPMI (Gibco Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% SFB 1% antibiótico PSA (Penicilina-estreptomicina e ampicilina) e recuperadas sob centrifugação a 1400 RPM, por 10 minutos. O sedimento de células foi ressuspensionado em meio RPMI suplementado com 10% SFB 1% PSA e, então, cultivado em placas de seis poços em uma estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C. O meio de cultura foi trocado pelo menos duas vezes a cada semana até a confluência de 80-90% quando foi feita a passagem de um poço para dois poços de uma placa de seis poços, totalizando 3 passagens. Para tanto, adicionou-se solução de tripsina/EDTA (Sigma) 0,05%.



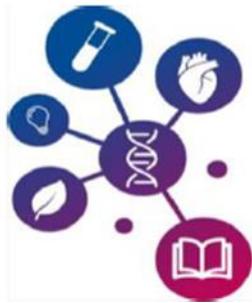
## *Criopreservação de células VERO e CTM*

Ao atingirem a confluência de 90%, as células foram submetidas à digestão enzimática com tripsina/EDTA (Sigma) 0,05%. Para tanto, retirou-se o meio de cultura do poço, adicionou-se 500  $\mu$ L de tripsina e incubou-se por 3 minutos na estufa para as células soltarem. Após esse período, conferiu-se no microscópio óptico a ausência de aderência das células na plataforma de cultura e, em seguida, neutralizou-se a ação da tripsina com o meio RPMI 10% SFB 1% PSA.

As células foram recuperadas por centrifugação à 1400 RPM, 4°C por 10 minutos, formando um pellet e após, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de RPMI ou DMEM, de acordo com o tipo celular. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade analisada por Azul de Trypan (descrito a seguir). O número de células foi ajustado para  $3,2 \times 10^6$  por criotubo.

Foram realizados dois protocolos: no protocolo A, as células ( $3,2 \times 10^6$ ) foram ressuscitadas em 0,5 mL de SFB e transferidas para os criotubos previamente identificados. Posteriormente, cerca 0,5 mL de uma solução de 20% dimetilsulfóxido (DMSO) em SFB foram adicionados em cada criotubo. No protocolo B, as células ( $3,2 \times 10^6$ ) foram ressuscitadas em 0,5 mL de RPMI suplementado com 20% de SFB, transferidas para os criotubos identificados e adicionados mais 0,5 mL de uma solução de 20% SFB e 10% DMSO, em meio RPMI. Todo o procedimento foi realizado no gelo. Em ambos os protocolos as células foram armazenadas, nas primeiras 24 horas, a -20°C, e em seguida transferidas para o ultrafreezer -80°C até o descongelamento.

Após os 30 dias de criopreservação realizou-se o descongelamento de ambas as linhagens celulares. Para tanto, os criotubos foram retirados do -80°C e colocados em banho-maria a 37°C por alguns segundos até o descongelamento celular. Imediatamente, as células foram lavadas com meio DMEM (Gibco) ou RPMI, de acordo com o tipo celular, suplementados com 10% de SFB (Cultilab) para retirar o DMSO. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação a 1400 RPM, 4°C por 10 minutos e submetidas à análise



de viabilidade celular.

### *Análise da viabilidade celular*

As células VERO e as CTM foram recuperadas da centrifugação foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura e diluídas 1:100 em solução Azul de Tripán 0,4% (Gibco) e homogeneizado. Em seguida, colocou-se 10 $\mu$ L da amostra na câmara de Neubauer para visualização em microscópio óptico e contagem das células viáveis (não coradas) e não viáveis (células azuis). O cálculo de viabilidade foi expresso em porcentagem, dividindo o total de células viáveis (não coradas) pelo número de células totais (coradas e não coradas), multiplicado por 100. A viabilidade foi analisada no dia da criopreservação (dia zero; D0), e trinta dias após a criopreservação (dia trinta; D30) quando as células foram descongeladas.

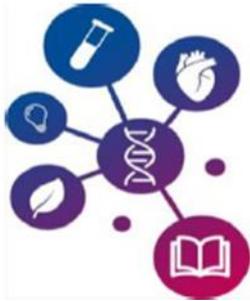
### *Análise estatística*

Os dados foram analisados no programa estatístico GraphPrism 8.0.1, aplicando-se o teste *t* de Student, sendo considerado estatisticamente significativo os valores de  $p < 0,05$ .

## **Resultados e Discussão**

### *Extração e expansão da cultura de CTM*

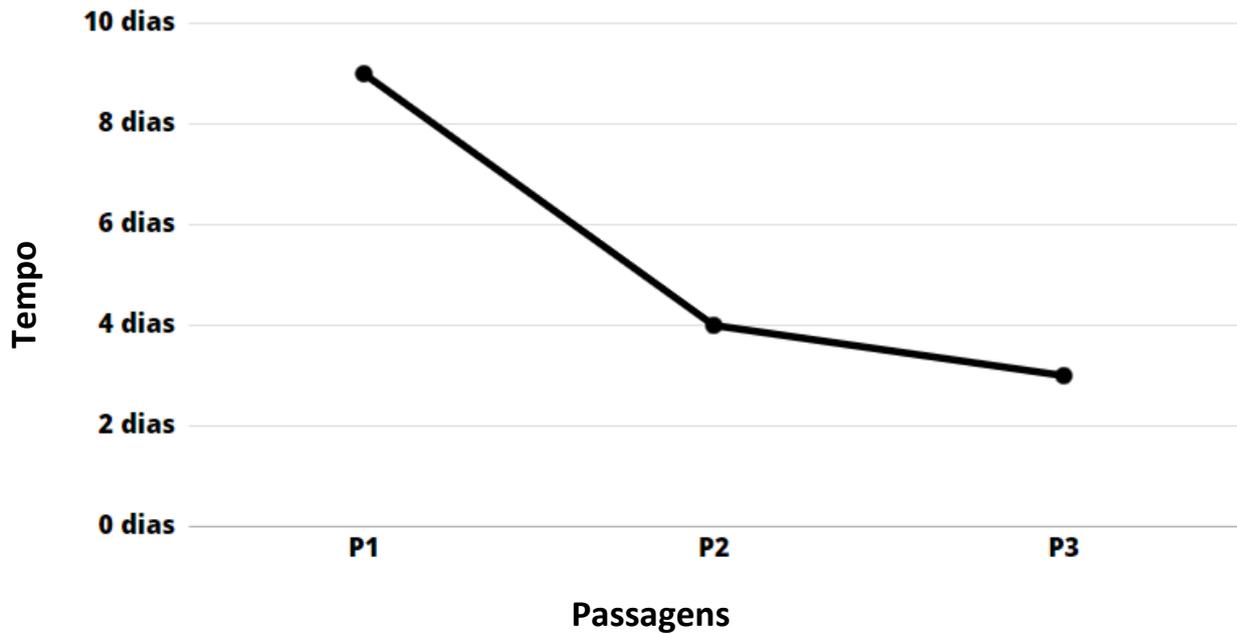
As CTM foram extraídas do tecido adiposo de cães e após nove dias da cultura *in vitro*, apresentaram morfologia fibroblastóide e confluência adequada para realização da primeira passagem (P1). Para as demais passagens (P2 e P3), o intervalo de tempo caiu gradativamente para quatro e três dias, respectivamente (Figura 1). Desta forma, notou-se que o tempo para atingir a confluência de 90% reduziu a cada passagem de cultura. Além disso, as CTM apresentaram morfologia “*fibroblastóide like*”, clássica de CTM, com aderência a plataforma



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

de cultura (Figura 2), de acordo com o preconizado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (11).

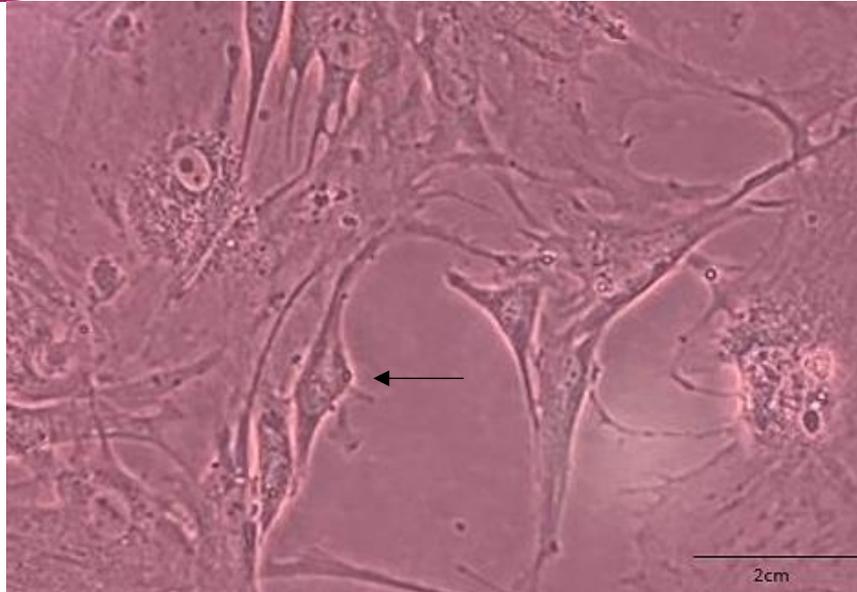


**Figura 1:** Intervalo de tempo para as passagens de cultura das CTM de cães. As células foram extraídas do tecido adiposo de cães e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB. Quando as células atingiram uma confluência de 90%, foi feita a passagem (P) de uma garrafa para duas garrafas de cultura (1:2).



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

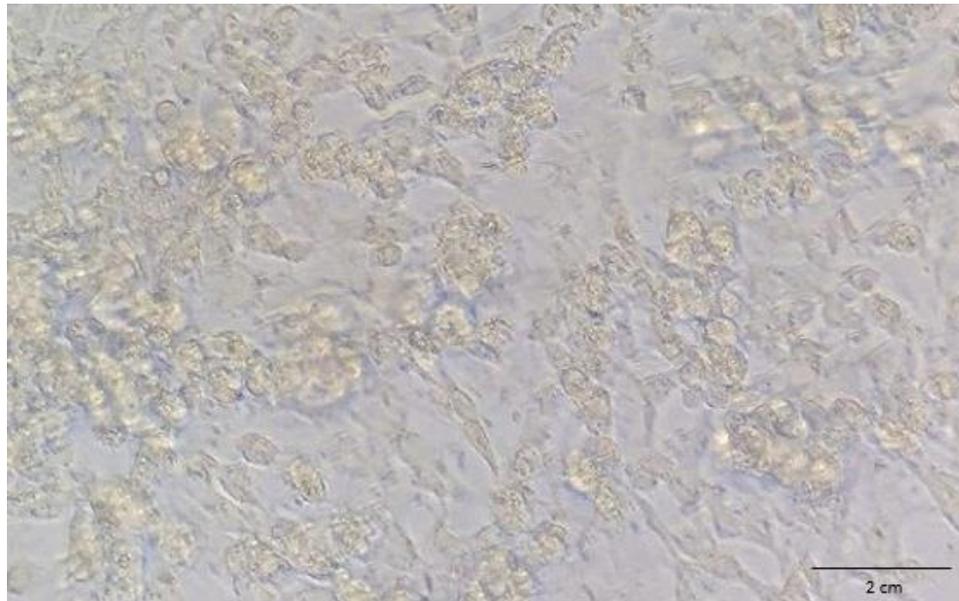
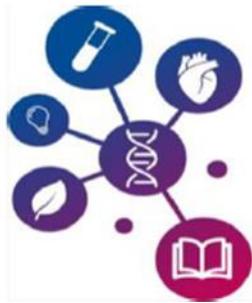
AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA



**Figura 2:** Cultura de células-tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo de cães. Observar a morfologia “fibroblastóide like” das CTM (seta preta). Aumento: 400x.

### ***Expansão da cultura de células VERO***

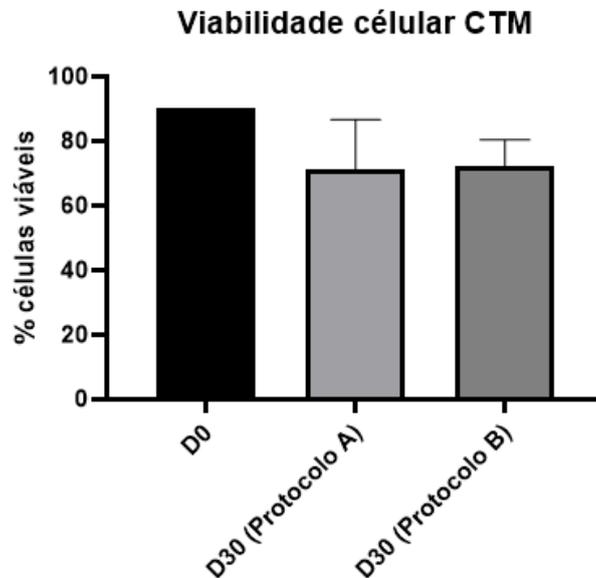
As células VERO são isoladas do epitélio do rim de *Chlorocebus* sp, sendo extensivamente utilizadas em ensaios de cultura celular (12). As células apresentaram formato fibroblastóide (Figura 3) e rápido crescimento, sendo que em cerca de sete dias a cultura adquiriu 80% de confluência.



**Figura 3:** Cultura de células VERO, após o descongelamento. Aumento: 400x.

### *Avaliação dos protocolos de criopreservação em células-tronco mesenquimais*

Ao avaliar os diferentes protocolos de criopreservações com diferentes concentrações de DMSO verificou-se que no dia zero (D0) a população de CTM caninas apresentava uma média de 90% de viabilidade. Trinta dias após o descongelamento (D30), verificou-se uma média de viabilidade celular similar entre os “Protocolo A” (71,2%) e “Protocolo B” (72%). Dessa forma, em ambos os protocolos houve redução na viabilidade celular, porém não significativa (Figura 4).

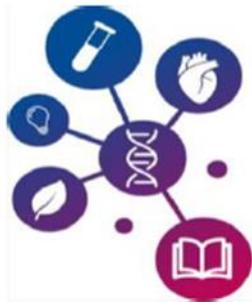


**Figura 4: Viabilidade das CTM de cães após criopreservação em diferentes protocolos.** Protocolo A utilizou 10% DMSO em SFB. Protocolo B utilizou 5% DMSO e 20% SFB em meio RPMI. Grupo controle (D0); grupo criopreservado (D30).

Estudos demonstraram que o DMSO é citotóxico para as CTM (13–15), ao reduzir sua capacidade de proliferação e diferenciação após o congelamento (16). Portanto, é realizado a lavagem das CTM para retirada do crioprotetor imediatamente após o descongelamento reduzindo a possibilidade de citotoxicidade (17).

Ding e colaboradores (2010) não identificaram diferenças na viabilidade celular, formação de colônias, taxa de proliferação, potencial de diferenciação, expressão de marcadores de superfície e capacidade imunomoduladora das CTM criopreservadas com 10% de DMSO e 90% de SFB (18). Assim, a concentração de 10% DMSO não afetou a capacidade proliferativa celular (19). No entanto, no presente estudo, a utilização de 10% de DMSO também não comprometeu a viabilidade celular.

Thirumala e colaboradores (2020) analisaram um protocolo de criopreservação composto por 80% de SFB e 10% de DMSO, obtendo uma taxa de sobrevivência celular



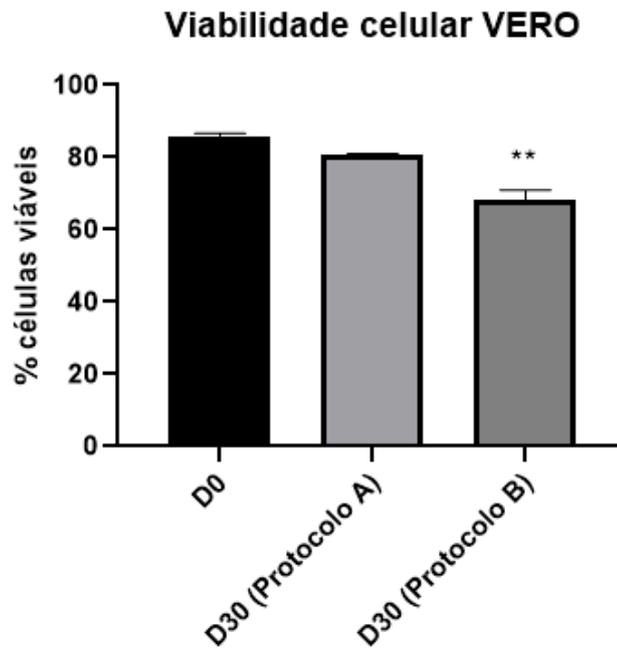
# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

superior a 80% (20). A taxa de viabilidade celular, bem como a capacidade de diferenciação em adipócitos e osteoblastos das CTM derivadas do tecido adiposo, demonstrou uma sobrevivência superior a 90% após os processos de congelamento e descongelamento em meio contendo 10% de DMSO (21). Além disso, a combinação de DMSO e SFB é amplamente empregada em protocolos de criopreservação de diferentes tipos celulares, como espermatozoides, favorecendo uma maior taxa de motilidade espermática após o descongelamento (22).

### *Avaliação dos protocolos de criopreservação em células VERO*

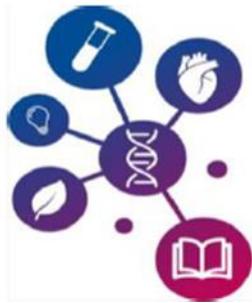
Após as células VERO atingirem 90% de confluência, a viabilidade celular foi analisada por meio do azul de tripan, antes do processo de congelamento (D0). Neste período, as células VERO apresentaram uma viabilidade de 85,95%. Trinta dias após a criopreservação (D30), as células VERO criopreservadas com o protocolo A apresentaram uma viabilidade de 80,90%, compatível com os dados do D0. Em contrapartida, verificou-se uma redução significativa ( $P<0,05$ ) na viabilidade celular (68,5%) no grupo tratado com o protocolo B (Figura 5).



**Figura 5: Viabilidade das células VERO após criopreservação em diferentes protocolos.** Protocolo A utilizou 10% DMSO em SFB. Protocolo B utilizou 5% DMSO e 20% SFB em meio RPMI. Dados significativos ( $P<0,05$ ) estão representados por asteriscos (\*\*) em relação ao grupo controle (D0).

A diferença na viabilidade observada entre os protocolos pode ser explicada pelas concentrações de SFB e DMSO. Enquanto o “protocolo A” apresenta 10% DMSO em SFB, o “protocolo B” apresenta 20% SFB e 5% DMSO em meio RPMI, verificando menores quantidades de SFB e DMSO quando comparado ao primeiro. Portanto, a maior porcentagem de SFB pode ter sido benéfica para manutenção da viabilidade celular das células VERO.

As lesões geradas na célula no processo de congelamento são ocasionadas pela formação de cristais de gelo intra e extracelular (23) tendo em vista que essa formação de gelo extracelular promove um efluxo osmótico elevando a concentração de solutos intracelulares, o que pode provocar um dano osmótico devido à toxicidade do soluto (22). Além disso, se as células forem resfriadas em uma velocidade elevada impede com que ocorra a saída correta de água da célula, assim, forma cristais intracelulares que lesam a estrutura celular por



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

proporcionar danos mecânicos (24). Para mais, o congelamento promove um estresse promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio que estimulam a apoptose celular (24). Por este motivo deve-se associar um crioprotetor nos protocolos de congelamento.

O mecanismo de ação dos crioprotetores está relacionado com a sua capacidade de se unir a moléculas de água evitando a formação de cristais de gelo e reduzir o potencial lesivo das grandes concentrações de soluto para realização da desidratação, a fim de evitar formação de cristais no interior das células (25). Para a criopreservação ser eficaz, ou seja, para que ela mantenha preservada as características celulares, é necessário um resfriamento bem controlado e a concentração adequada de um agente crioprotetor. Dessa forma, o agente protetor proporciona que a água deixe a célula lentamente a fim de manter preservada a integridade da membrana celular, contudo, esse processo deve ser rápido o suficiente para bloquear a formação de cristais de gelo em seu interior (26).

O DMSO é um agente crioprotetor hidrofílico, incluído no grupo de substâncias de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na membrana plasmática celular e prevenir a formação de núcleos de cristais de gelo e desacelerar o crescimento do cristal de gelo intracelular (15, 23, 27).

Pereira *et al.*, 2020 evidenciou que aumentar as concentrações de SFB apresentou efeito benéfico para criopreservação de células somáticas de *Pecari tajacu Linnaeus* (28). As soluções de criopreservação são mais frequentemente suplementadas com 10% de DMSO (25) visto a ação citotóxica. Contudo, essa concentração mantém o efeito benéfico para o congelamento e reduz a possibilidade de promover redução na viabilidade celular (23). Um estudo relatou que quando testadas com concentrações de DMSO de 0 a 10% na ausência de SFB, as porcentagens de células apoptóticas, necróticas e vivas foram de 20%, 50% e 30%, respectivamente (29), dessa forma, evidencia o efeito benéfico da presença do SFB na manutenção da viabilidade celular.

## Conclusão

Conclui-se que as CTM isoladas do tecido adiposo de cães demonstraram um comportamento adequado de proliferação e aderência em plataforma de cultura,



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

apresentando características morfológicas típicas e confluência celular crescente após cada passagem. A análise dos protocolos de criopreservação, utilizando diferentes concentrações de DMSO e SFB, mostrou que ambos os protocolos testados reduziram a viabilidade celular, embora sem diferenças significativas, com resultados dentro dos padrões esperados para a preservação de células VERO e CTM. O uso de DMSO como crioprotetor provou ser eficaz em prevenir danos estruturais causados pela formação de cristais de gelo, sendo sua concentração um fator determinante para a manutenção da viabilidade celular após o descongelamento. A maior porcentagem de SFB, em particular, mostrou-se benéfica para a preservação da integridade celular. Esses achados reforçam a importância de um controle preciso sobre os agentes crioprotetores e os processos de resfriamento para garantir a preservação das características funcionais e viabilidade das células criopreservadas.

## Agradecimentos

Agradecemos à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Estadual de Santa Cruz pela autorização e viabilização da execução do projeto sob o número 073.6764.2021.0021229-10, assim como ao Programa Institucional de Iniciação Científica (PIBIC/UDESC) pelo apoio financeiro por meio do programa CNPq/UDESC. Ressalta-se que o estudo enfrentou limitações decorrentes de restrições financeiras, as quais dificultaram o acesso a insumos e reagentes essenciais para a pesquisa.

## Referências

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
2. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012 May 25;12(5):383–96.
3. Shi Y, Wang Y, Li Q, Liu K, Hou J, Shao C, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2018



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

Aug 12;14(8):493–507.

4. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013 Oct;13(4):392–402.
5. Ha DH, Kim H, Lee J, Kwon HH, Park GH, Yang SH, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells*. 2020 May 7;9(5):1157.
6. Kumar A, Bhattacharyya S, Rattan V. Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Bank*. 2015 Dec 8;16(4):513–22.
7. Kim HJ, Sung IY, Cho YC, Kang MS, Rho GJ, Byun JH, et al. Three-Dimensional Spheroid Formation of Cryopreserved Human Dental Follicle-Derived Stem Cells Enhances Pluripotency and Osteogenic Induction Properties. *Tissue Eng Regen Med*. 2019 Oct 12;16(5):513–23.
8. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant*. 2021 Jan 1;30:096368972199961.
9. Hubell A. Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev*. 1997;11:224–223.
10. Pavón A, Beloqui I, Salcedo JM, Martin AG. Cryobanking Mesenchymal Stem Cells. 2017. p. 191–6.
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
12. Baust JM, Campbell LH, Harbell JW. Biobanking: The Future of Cell Preservation Strategies. *Biobanking in the 21st Century*. 2015;864:37–53.
13. Hilkens P, Driesen RB, Wolfs E, Gervois P, Vangansewinkel T, Ratajczak J, et al. Cryopreservation and Banking of Dental Stem Cells. 2016. p. 199–235.
14. Rowley SD, Feng Z, Yadock D, Holmberg L, MacLeod B, Heimfeld S. Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

- infusion histamine blockade. *Cytotherapy*. 1999 Jan;1(6):439–46.
15. Lindemann D, Werle SB, Steffens D, Garcia-Godoy F, Pranke P, Casagrande L. Effects of cryopreservation on the characteristics of dental pulp stem cells of intact deciduous teeth. *Arch Oral Biol*. 2014 Sep;59(9):970–6.
  16. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol*. 2007;82:463–72.
  17. Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S, et al. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol*. 2010 May 15;223(2):415–22.
  18. Vasconcelos RG, Ribeiro RA, Vasconcelos MG, Lima KC, Barboza CAG. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. *Cell Tissue Bank*. 2012 Aug 21;13(3):461–9.
  19. Liu G, Zhou H, Li Y, Li G, Cui L, Liu W, et al. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*. 2008 Aug;57(1):18–24.
  20. Oishi K, Noguchi H, Yukawa H, Miyazaki T, Kato R, Kitagawa Y, et al. Cryopreservation of Mouse Adipose Tissue-Derived Stem/Progenitor Cells. *Cell Transplant*. 2008 Jan 1;17(1–2):35–41.
  21. Garzón D, Peñaranda D, Pérez L, Marco-Jiménez F, Espert X, Müller T, et al. Effects of pH, Sodium Bicarbonate, Cryoprotectants and Foetal Bovine Serum on the Cryopreservation of European Eel Sperm. *Reprod Domest Anim*. 2008 Feb 25;43(1):99–105.
  22. Alves LA. Padronização das condições de criopreservação de hepatócitos de rato para terapia celular [Dissertação de Mestrado]. Instituto Oswaldo Cruz; 2015.
  23. Pilbauerová N, Suchánek J. Cryopreservation of Dental Stem Cells. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2018;61(1):1–7.
  24. Rhamdia J. Efeito da adição dos antioxidantes cisteína e glutamina ao processo de criopreservação [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2015.



# REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E BEM ESTAR

AFYA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE ITABUNA

25. Fleming KK, Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. *Transfus Apher Sci.* 2006 Jun;34(3):309–15.
26. Akiyama Y, Shinose M, Watanabe H, Yamada S, Kanda Y. Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by superflash freezing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019 Apr 16;116(16):7738–43.
27. Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.* 1986 Jan;76(1):61–90.
28. Lira GP, Barbosa AA, Nunes MB, Aguiar LV, Oliveira MF, Silva AR, et al. Cryopreservation of Collared Peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) Somatic Cells is Improved by Sucrose and High Concentrations of Fetal Bovine Serum. *Cryo Lett.* 2020 Oct;41(5):272–80.
29. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of Methylcellulose and Dimethyl Sulfoxide as the Cryoprotectants in a Serum-Free Freezing Media for Cryopreservation of Adipose-Derived Adult Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2010 Apr;19(4):513–22.