

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Maria Luiza Arruda Kneipp

**DIFERENTES HEMOCOMPONENTES COMO SUBSTITUTOS DO SORO
FETAL BOVINO NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
EQUINAS DERIVADAS DE MEMBRANA SINOVIAL**

Belo Horizonte

2022

Maria Luiza Arruda Kneipp

Diferentes hemocomponentes como substitutos do soro fetal bovino no cultivo de células-tronco mesenquimais equinas derivadas de membrana sinovial

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Armando de Mattos Carvalho

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves

Belo Horizonte

2022

K68d Kneipp, Maria Luiza Arruda, 1995 -
Diferentes hemocomponentes como substitutos do soro fetal bovino no cultivo de células-tronco mesenquimais equinas derivadas de membrana sinovial / Maria Luiza Arruda Kneipp. – 2022.
53 f.il

Orientador: Armando de Mattos Carvalho
Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Ciência animal.
Área de Concentração: Ciência animal.
Bibliografias: f. 44 a 53

1. Equino - Teses - 2. Patologia Veterinária - Teses - 3. Ciência animal - Teses - I. Carvalho, Armando de Mattos - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA LUIZA ARRUDA KNEIPP

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.

Aprovado(a) em 14 de junho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Armando de Mattos Carvalho - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Rafael Resende Faleiros

Dr.(a). João Pedro Hübbe Pfeifer

Dr.(a). Ana Liz Garcia Alves



Documento assinado eletronicamente por **Armando de Mattos Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 15/06/2022, às 15:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Resende Faleiros, Professor do Magistério Superior**, em 16/06/2022, às 12:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Pedro Hübbe Pfeifer, Usuário Externo**, em 21/06/2022, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Liz Garcia Alves, Usuária Externa**, em 19/07/2022, às 18:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0, informando o código verificador 1512978 e o código CRC 91C8720B.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Pai Celestial por me permitir viver e alcançar mais uma vitória. O Mestrado foi um desafio que superou as minhas expectativas e, nEle encontrei forças para seguir lutando pelo que acredito.

Aos meus familiares: aos meus pais que SEMPRE me apoiaram em tudo, ensinando princípios humanos fundamentais para ter êxito em todos os segmentos da vida. Aos meus irmãos por sempre acreditarem em mim, valorizando minha trajetória e dando apoio sempre que preciso. Aos meus sobrinhos Theo, Davi e Léo por serem capazes de melhorar o astral com a presença e luz que carregam. Eu amo vocês!

Ao Kaio por ser um porto seguro, por me respeitar, pela parceria, por ter compartilhado comigo a trajetória árdua e por acreditar em mim mais do que eu mesma.

Ao Prof. Armando, orientador e amigo, por me apoiar desde o primeiro contato, por ser um líder nobre e inspirador. Te devo muito, professor!

Ao Prof. Rafael Faleiros pela inspiração, apoio e por ter aberto as portas do mestrado para mim.

À Profa. Ana Liz por ter me acolhido de modo especial, juntamente com a sua equipe (Gustavo, Emanuel, Fernanda, Vitória e João), permitindo trocas de muitas experiências engrandecedoras.

À Pimpim que, mesmo sendo uma gata, fez muita diferença por amenizar o estresse e ser companheira a todo momento.

Às equipes que permitiram a realização do experimento: UFMG, SIMCAV; CGA Unesp/Btu; Haras Concorde; Haras Recanto da Saúde; Laboratório Clínico Veterinário – Unesp/Botucatu; Omics; Laboratório de Citometria de Fluxo (FMB/Btu).

A todos os amigos que dividiram a trajetória e somaram de alguma maneira para a realização profissional e pessoal que vivo agora.

RESUMO

Os cavalos atletas podem desenvolver uma série de lesões musculoesqueléticas que são uma consequência comum da sobrecarga física, o que afeta negativamente a qualidade de vida e o desempenho atlético do animal. A terapia com células-tronco para regeneração tecidual tem ganhado espaço rapidamente como tratamento de escolha para lesões ortopédicas equinas. O soro fetal bovino (SFB) é usado como suplemento universal ao cultivo de células-tronco, e tem sido alvo de questionamentos éticos, científicos e de segurança. Com o intuito de abordar as possíveis deficiências do SFB como nutriente para a expansão clínica das células-tronco mesenquimais (CTM) humanas e animais, os pesquisadores têm focado em produtos derivados do sangue como alternativas. Nos últimos anos, o plasma rico em plaquetas e/ou lisado plaquetário foram propostos como substitutos do SFB, ao sustentar expansão celular, principalmente de células humanas. Dessa forma, o presente estudo buscou comparar diferentes hemoderivados como suplementos ao meio de cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial (MsCTM) equina, buscando eleger um hemocomponente equivalente ou superior ao SFB, de modo a remover componentes xenogênicos potencialmente causadores de reações imunes pós-transplante de CTM equinas. Foram propostos lisado plaquetário (LP) e soro equino (SE) alogênicos como possíveis substitutos do SFB, os quais foram avaliados no cultivo de MsCTM quanto à morfologia celular; aderência ao plástico; capacidade de diferenciação em tri linhagem (adipogênica, osteogênica e condrogênica); caracterização imunofenotípica pela expressão de receptores de superfície CD13⁻, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, MHC-II; capacidade de expansão pela taxa de proliferação celular e tempo de duplicação da população celular; e metabolismo celular pelo ensaio do MTT. Todos os grupos apresentaram adesão ao plástico e morfologia dentro do esperado para células-tronco. A diferenciação em tri linhagem foi positiva em todos os grupos, com destaque para adipogênese espontânea pelos grupos LP e SE. A expressão de receptores de superfície foi similar entre os grupos mantendo o padrão imunofenotípico de células-tronco. O grupo SFB teve as taxas de proliferação e duplicação superiores em relação aos demais, evidenciando melhor capacidade de expansão clonal, seguido pelo grupo LP cuja concentração ao final do cultivo foi semelhante à do grupo SFB. O metabolismo celular oscilou entre os grupos, com superioridade do grupo SFB,

havendo diferença estatística no momento 24h nos grupos LP e SE e no momento 48h no grupo LP. Os resultados do estudo permitiram afirmar que as MsCTM cultivadas com lisado plaquetário e soro equino foram capazes de manterem as características essenciais para serem identificadas como células-tronco. Porém, destaca-se a adipogênese espontânea pelas células dos grupos com hemocomponentes equinos, que justifica estudos aprofundados a fim de que a aplicação clínica da terapia celular não seja prejudicada pelo comportamento precoce e inesperado das células. Embora as taxas de proliferação e viabilidade celular encontradas com SE e LP terem sido insuficientes para manter a expansão celular em níveis similares ou superiores ao SFB, faz-se necessário dar continuidade aos estudos relacionados ao assunto a fim de explorar a composição de cada hemoderivado e sua influência no cultivo celular, além da comparação de diferentes concentrações que podem gerar resultados satisfatórios ao cultivo livre de soro.

Palavras-chave: Adipogênese. Hemoderivado. Lisado plaquetário. Xenocontaminante.

ABSTRACT

Athlete horses can develop a series of musculoskeletal injuries that are a common consequence of physical overload, which negatively affects the quality of life and athletic performance of the animal. Stem cell therapy for tissue regeneration has rapidly gained ground as the treatment of choice for equine orthopedic injuries. Fetal bovine serum (FBS) is used as a universal supplement for the cultivation of stem cells, and has been the subject of ethical, scientific and safety questions. In order to address the possible shortcomings of FBS as a nutrient for the clinical expansion of human and animal mesenchymal stem cells (MSCs), researchers have focused on blood products as alternatives. In recent years, platelet-rich plasma and/or platelet lysate have been proposed as substitutes for FBS, by sustaining cellular expansion, mainly of human cells. Thus, the present study sought to compare different blood products as supplements to the equine synovial membrane-derived mesenchymal stem cell (MSCTM) culture medium, seeking to elect a blood component equivalent or superior to FBS, in order to remove xenogeneic components potentially causing reactions after transplantation of equine MSCs. Allogeneic platelet lysate (PL) and equine serum (SE) have been proposed as possible substitutes for FBS, which were evaluated in SmMSC culture regarding cell morphology; adherence to plastic; ability to differentiate into trilineages (adipogenic, osteogenic and chondrogenic); immunophenotypic characterization by expression of surface receptors CD13-, CD34-, CD44+, CD45-, CD90+, CD105+, MHC-II; expansion capacity by cell proliferation rate and cell population doubling time; and cellular metabolism by the MTT assay. All groups showed adhesion to the plastic and morphology as expected for stem cells. Tri-lineage differentiation was positive in all groups, with emphasis on spontaneous adipogenesis in the PL and SE groups. The expression of surface receptors was similar between the groups, maintaining the immunophenotypic pattern of stem cells. The FBS group had higher proliferation and duplication rates than the others, showing better clonal expansion capacity, followed by the PL group, whose concentration at the end of cultivation was similar to that of the FBS group. Cellular metabolism fluctuated between groups, with superiority of the FBS group, with a statistical difference at the 24h moment in the PL and SE groups and at the 48h moment in the PL group. The results of the study allowed us to affirm that the MsCTM cultivated with platelet lysate and equine serum were able to maintain the essential characteristics to be identified as

stem cells. However, the spontaneous adipogenesis by the cells of the groups with equine blood components stands out, which justifies in-depth studies so that the clinical application of cell therapy is not impaired by the early and unexpected behavior of the cells. Although the proliferation and cell viability rates found with SE and PL were insufficient to maintain cell expansion at similar or higher levels than FBS, it is necessary to continue studies related to the subject in order to explore the composition of each blood product and its influence on cell culture, in addition to comparing different concentrations that can generate satisfactory results for serum-free culture.

Keywords: Adipogenesis. Blood derivative. Platelet lysate. Xenocontaminant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema do delineamento experimental do preparo do pool de lisado plaquetário..... 22
- Figura 2.** Esquema do delineamento experimental da produção do pool de soro equino..... 23
- Figura 3.** Esquema do delineamento experimental do cultivo das MsCTM..... 24
- Figura 4.** Morfologia das MsCTM em P9 nos diferentes meios de cultivo celulares. A e B: MsCTM em meio com SFB 10%. C e D: MsCTM em meio com SE 10%. E e F: MsCTM em meio com LP 10%. A, C e E: objetiva de aumento de 5x. B, D e F: objetiva de aumento de 10x..... 29
- Figura 5.** Avaliação da diferenciação adipogênica das MsCTM de cada grupo. Coloração com Oil Red. A e B: MsCTM cultivadas em meio com SFB. C e D: MsCTM cultivadas em meio com SE; E e F: MsCTM cultivadas em meio com LP. A, C e E: amostra controle de cada grupo sob condições de cultivo sem meio indutor de diferenciação, objetiva de aumento de 5x. B, D, F: amostras cultivadas com meio de diferenciação adipogênico, objetiva de aumento de 5x... 31
- Figura 6.** Avaliação da diferenciação osteogênica das MsCTM de cada grupo. Coloração com Alizarin Red. A e B: MsCTM cultivada em meio com SFB. C e D: MsCTM cultivada em meio com SE; E e F: MsCTM cultivada em meio com LP. A, C e E: amostras controle de cada grupo cultivada sob condições de cultivo sem meio indutor de diferenciação osteogênica, objetiva de aumento de 5x. B, D, F: amostras de cada grupo cultivadas com meio indutor de diferenciação osteogênica, objetiva de aumento de 5x..... 32
- Figura 7.** Avaliação da diferenciação condrogênica das MsCTM de cada grupo. Coloração com Azul de Toluidina e Hematoxilina e Eosina. A e B: MsCTM cultivadas em meio com SFB. C e D: MsCTM cultivadas em meio com SE. E e F: MsCTM cultivadas em meio com LP. A, C e E: amostras de cada grupo cultivadas com meio indutor de diferenciação condrogênica, coradas com Azul de Toluidina. B, D e F: amostras de cada grupo cultivadas com meio indutor de diferenciação condrogênica, coradas com Hematoxilina e Eosina, objetiva de aumento de 5x..... 33
- Figura 8.** Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das MsCTM em P11 sob as três condições: SFB, SE, LP. Houve manutenção da positividade para CD105, CD90 e CD44 e negatividade para CD45, CD34, CD13 e MHC-II. 35

Figura 9. Representação das curvas de crescimento de cada grupo nos tempos 0, 48, 96, 144, 192 e 240 horas de cultivo.	36
Figura 10. Representação do TDPC dos grupos. Ambos os grupos tratados apresentam tempo maior para duplicar a população celular, evidenciando capacidade de proliferação inferior ao grupo SFB.	37
Figura 11. Ensaio do MTT evidenciando queda da atividade metabólica do grupo SE no momento 72 horas e recuperação no momento 96h. A atividade metabólica do grupo LP apresentou queda do momento 24 horas até o momento 72 horas, com recuperação no momento 96h. ** Diferença significativa ($p = 0,0021^{**}$).	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados em porcentagem (%) da imunofenotipagem das MsCTM em P11 dos grupos SFB, SE e LP obtidos por citometria de fluxo.....	34
Tabela 2 Valores de proliferação celular após 48, 96, 144, 192 e 240 horas de cultivo das MsCTM com SFB, SE e LP.....	36
Tabela 3. Valor em horas de TDPC das MsCTM dos grupos SFB, SE, LP.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

BMP: proteína morfogenética óssea

CD: *cluster of differentiation*

CTGF: fator de crescimento do tecido conjuntivo

CTM: células-tronco mesenquimais

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA: Acido etilenodiamino tetra-acético

EGF: fator de crescimento epidérmico

FGF-2: fator de crescimento fibroblástico

HGF: fator de crescimento do hepatócito

IGF-1: fator de crescimento tipo insulina-1

LP: lisado plaquetário

MHC-II: complexo principal de histocompatibilidade tipo II

mL: mililitro

mRNA: RNA mensageiro

MsCTM: células-tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial

MTT: [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo difeniltetrazólio]

nm: nanômetro

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE2: prostaglandina E2

PRP: plasma rico em plaquetas

SE: soro equino

SFB: soro fetal bovino

SITC: sociedade internacional de terapia celular

TDPC: tempo de duplicação da população celular

TGF- β : fator de crescimento transformante β

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

μL : microlitro

μm : micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Células-tronco	14
2.2 Soro fetal bovino no cultivo de células-tronco	16
2.3 Hemoderivados	17
2.3.1. Soro equino	18
2.3.2. Plasma rico em plaquetas	19
2.3.3. Lisado plaquetário	19
3 MATERIAIS E METODOLOGIA.....	21
3.1 Seleção dos animais	21
3.2 Coleta de material biológico	21
3.3 Produção do pool de lisado plaquetário	21
3.4 Preparo do soro equino	22
3.5 Cultivo das Células-tronco Mesenquimais derivadas de Membrana Sinovial (MsCTM)	23
3.6 Caracterização e diferenciações celulares	24
3.7 Avaliação da proliferação celular.....	26
3.8 Avaliação do metabolismo celular pelo ensaio do MTT	27
3.9 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	27
4.1 Seleção dos animais e coleta de material biológico	27

4.2	Produção do lisado plaquetário e do soro equino	28
4.3	Cultivo das MsCTM	28
4.4	Diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica.....	30
4.5	Imunofenotipagem.....	34
4.6	Taxa de proliferação celular	35
4.7	Tempo de duplicação da população celular (TDPC)	36
4.8	Metabolismo celular (MTT).....	37
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO.....	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

Na indústria equina, a claudicação devido a lesão articular é a causa mais prevalente de queda da função atlética e descarte de cavalos de corrida (Goodrich e Nixon, 2006). Os cavalos atletas podem desenvolver uma série de lesões musculoesqueléticas que incluem trauma à cartilagem articular, osteoartrite, lesões dos meniscos, osteocondrite dissecante e lesões tendíneas e ligamentares (Colbath *et al.*, 2017). Tais lesões são uma consequência comum da sobrecarga física, o que afeta negativamente a qualidade de vida e o desempenho atlético do animal (Brossi *et al.*, 2015).

A terapia com células-tronco para reparação tecidual tem ganhado espaço rapidamente como tratamento de escolha para lesões ortopédicas equinas (Borjesson *et al.*, 2011). As células-tronco mesenquimais (CTM) despertam grande interesse tanto na comunidade científica quanto na comunidade clínica (Taylor *et al.*, 2007) devido ao seu potencial terapêutico, principalmente pela capacidade de melhorar a qualidade da reparação tecidual por meio de suas propriedades regulatórias, de imunomodulação (Yaneselli *et al.*, 2019), produção de citocinas, fatores de crescimento (Colbath *et al.*, 2019) e anti-inflamatórias (Rosa *et al.*, 2020). Em cavalos, particularmente, o tratamento de condições ortopédicas com CTM tem um histórico bem documentado (Hagen *et al.*, 2021).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células-tronco

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), as CTM são definidas como células que, em cultivo *in vitro* são aderentes ao plástico; expressam ($\geq 95\%$) antígenos de superfície específicos CD105, CD90 e CD73; e são capazes de se diferenciar nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. (Dominici *et al.*, 2006).

São diversas as fontes de CTM disponíveis, dentre elas medula óssea, tecido adiposo, sangue periférico, sangue e matriz do cordão umbilical, tendão (Alves *et al.*,

2013), músculo (Cao *et al.*, 2003), gengiva e ligamento periodontal (Mensing *et al.*, 2011), além da membrana sinovial (Bari *et al.*, 2001).

Dentre as diferentes estruturas que compõem e mantêm a homeostase de uma articulação sinovial, a membrana sinovial ou sinóvia constitui a face interna da cápsula articular, que reveste a cavidade articular. É composta pelas camadas íntima e sub-íntima, sendo a primeira responsável pela composição do líquido sinovial ao funcionar como um filtro biológico. Nesta mesma camada, há populações celulares denominadas sinoviócitos de diferentes tipos, cujas funções englobam fagocitose e secreção/síntese de proteínas e mediadores de baixo peso molecular. A camada subíntima é composta pelos tecidos conjuntivo frouxo, adiposo e fibroso (Goodrich e Nixon, 2006; Frisbie e Johnson, 2019).

Uma questão importante na terapia com células-tronco, é o estabelecimento de uma remoção não invasiva de tecidos em conjunto com uma fonte abundante de células e um baixo nível de contaminação (Passeri *et al.*, 2009). Em equídeos, a lavagem articular é principalmente utilizada com fins diagnósticos e terapêuticos de enfermidades como artrite séptica, remoção de fragmentos intra-articulares, tratamento de defeitos focais da cartilagem articular e doença do osso subcondral. Há estudos controversos a respeito das consequências da artroscopia, que sugerem que o procedimento estimula a inflamação em articulações saudáveis ao aumentar os níveis de prostaglandina E2 (PGE2) (Watkins *et al.*, 2021), assim como para fins de obtenção de tecido para isolamento de CTM, a sinóvia pode ser obtida por via artroscópica, com baixa invasividade e sem causar danos ao sítio doador (Bami *et al.*, 2020).

Embora a medula óssea seja considerada uma fonte boa e aceitável de células-tronco e comumente utilizada, apesar da dificuldade de obtenção, a membrana sinovial apresenta superioridade em termos de condrogênese, miogênese, osteogênese, tenogênese, possui fontes mais acessíveis, alta taxa de proliferação, baixa imunogenicidade e maior potencial de diferenciação condrogênica comparado com CTM de outras fontes. Estudos têm demonstrado que os fatores biológicos relacionados à atividade imunorreguladora e especificidade das CTM são amplamente dependentes do tecido do qual as células-tronco são derivadas (Li *et al.*, 2020). Dessa

forma, a membrana sinovial é considerada uma conveniente fonte de células progenitoras para o tratamento de lesões musculoesqueléticas (Bami *et al.*, 2020) e lesões condrais (Gale *et al.*, 2019).

A terapia com CTM requer isolamento e expansão em laboratório para obter uma população homogênea e alcançar o número de células necessárias ao tratamento (Yaneselli *et al.*, 2019). No entanto, isso pode ter um grande impacto nas propriedades e manutenção do potencial regulador das células-tronco, que são fortemente influenciadas pelas condições de cultura utilizadas (Schubert *et al.*, 2017). O cultivo celular *in vitro* procura reproduzir o ambiente fisiológico e as respostas características dos diferentes tipos celulares. Os meios de cultura habitualmente utilizados e necessários à viabilidade e proliferação celulares são compostos por duas partes: meio de nutrientes basal e suplementos, cujas composições podem variar consideravelmente (Sato e Kan, 1998).

2.2 Soro fetal bovino no cultivo de células-tronco

As CTM são tipicamente cultivadas e/ou criopreservadas na presença de soro fetal bovino (SFB), o aditivo mais utilizado no cultivo *in vitro*, que contém principalmente nutrientes e fatores de crescimento, além de reduzir a formação de gelo extracelular, participar na estabilização da membrana celular, prevenir concentração excessiva de solutos e minimizar desidratação celular a níveis toleráveis durante a criopreservação (Wang *et al.*, 2017). Além disso, possui conhecidos custo-benefício e riqueza em moléculas de adesão, fatores de crescimento, micronutrientes e hormônios que promovem fixação, crescimento e proliferação de células de mamíferos em cultivo (Guiotto *et al.*, 2020).

Como suplemento universal, o uso de SFB é alvo de questionamentos éticos, científicos e de segurança (Seo *et al.*, 2013). As desvantagens envolvem questões éticas ligadas à sua obtenção, o risco de contaminação com patógenos como vírus e príons, a variabilidade de lote para lote, bem como a escassez esperada no futuro quando terapias celulares serão usadas mais rotineiramente (Schubert *et al.*, 2017).

Mesmo nos casos onde há depleção prévia do SFB por alguns dias, a interiorização de seus componentes pelas CTM poderia comprometer a eficácia de

sua administração, especialmente nos casos de administrações clínicas seriadas em que há aumento na produção de anticorpos e, conseqüentemente, maior risco de reações imunológicas e diminuição da eficácia da terapia (Joswig *et al.*, 2017; Chapman *et al.*, 2020). Deste modo, é particularmente desejável excluir quaisquer componentes xenogênicos de um cultivo celular, de modo a diminuir a probabilidade de reações imunes após a administração de CTM (Anitua *et al.*, 2013; Cowper *et al.*, 2019).

Embora o potencial xenogênico do SFB não tenha sido totalmente elucidado na espécie equina, dados apresentados recentemente sugerem que CTM derivadas de medula óssea cultivadas com SFB, em comparação com CTM isentas de xenógeno, são reconhecidas e direcionadas para morte celular pelo equino receptor (Rowland *et al.*, 2018).

Em contraste com a medicina humana, o conhecimento a respeito do cultivo de CTM de grandes animais livres de SFB é limitado, apesar de sua relevância para estudos pré-clínicos e desenvolvimento da terapêutica celular veterinária (Schubert *et al.*, 2017). A substituição do SFB por hemoderivados em meio de cultura de CTM é uma área de interesse atual na terapia celular humana e animal (Bieback *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2013; Cowper *et al.*, 2019).

2.3 Hemoderivados

Com o intuito de abordar as possíveis deficiências do SFB como nutriente para a expansão clínica das CTM humanas, os pesquisadores têm focado em produtos derivados do sangue como alternativas (Cowper *et al.*, 2019), incluindo plasma, soro, soro de cordão umbilical e derivados de plaquetas (Bieback, 2013; Samberg *et al.*, 2019), como plasma rico em plaquetas (PRP) e lisado plaquetário (LP) (Astori *et al.*, 2016; Bieback *et al.*, 2009).

Os produtos biológicos são uma mistura complexa de numerosas moléculas bioativas consideradas importantes para a regeneração funcional dos tecidos (Holmes *et al.*, 2018), e têm sido relatados como benéficos em cenários em que a eficiência, custo-benefício e segurança nas formas de intervenções ortopédicas são necessárias para restaurar a função normal e a estrutura dos componentes musculoesqueléticos,

tanto em humanos como em equinos. Produtos ricos em plaquetas, em particular, ganharam popularidade por suas concentrações aumentadas de fatores de crescimento (Brossi *et al.*, 2015).

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos multinucleados envolvidas no processo inicial de cicatrização de feridas (Notodihardjo *et al.*, 2019), hemostasia primária e regeneração tecidual (Burnouf *et al.*, 2016). Além dos fatores de coagulação, armazenam uma série de mediadores bioativos potentes nos α -grânulos, incluindo quimiocinas e fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento tipo insulina-1 (IGF-1), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF-2), fator de crescimento do hepatócito (HGF), fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e proteína morfogenética óssea 2, 4, 6 (BMP-2, BMP-4, BMP-6) (Burnouf *et al.*, 2016).

2.3.1. Soro equino

O soro é um hemoderivado que contém moléculas oriundas de plaquetas que se tornam disponíveis após a ativação plaquetária (Nurden, 2011), além de permitir o isolamento e a expansão de CTM mantendo propriedades biológicas celulares adequadas similares ao SFB (Chisini *et al.*, 2017). De fato, é bem conhecido que o soro representa uma fonte fundamental de nutrientes, citocinas e moléculas de adesão necessárias para o crescimento celular *in vitro*, metabolismo e para estimular a proliferação (Franke *et al.*, 2014).

Quando utilizado como suplemento alogênico não xenogênico substituto do SFB ao meio de cultivo de CTM derivadas da medula óssea de camundongos, apresentou resultados superiores quanto à diferenciação osteogênica e proliferação celular quando comparado à mesma concentração do SFB, sendo mais estável do que este (Fani *et al.*, 2016). Shetty *et al.* (2007), cultivando CTM de diferentes fontes com soro de cordão umbilical humano por três passagens, obtiveram rendimentos comparáveis aos do SFB. Da mesma forma, Stute *et al.* (2004) cultivaram CTM derivadas da medula óssea com meios suplementados com soro autólogo em diferentes concentrações e com SFB, e obtiveram resultados equivalentes quanto ao

isolamento e à expansão de CTM tanto no meio de cultivo suplementado com 10% de soro autólogo como no meio suplementado de SFB na mesma concentração. O soro equino tem sido visto como uma alternativa para fornecer fatores de crescimento e hormônios na biologia celular moderna (Franke *et al.*, 2014).

2.3.2. Plasma rico em plaquetas

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um biomaterial autólogo, rico em fatores de crescimento, que pode ser caracterizado como quimiotático, mitogênico, angiogênico, analgésico e anti-inflamatório (Yamada, 2011). Constitui uma fração do plasma com concentração plaquetária três a cinco vezes maior do que a concentração plasmática (Subiran *et al.*, 2021). Quando ativadas, as plaquetas liberam grânulos contendo moléculas, incluindo fatores de crescimento que desempenham papéis importantes na proliferação, migração e diferenciação celulares (Lai *et al.*, 2018). Tem sido usado como terapia para lesões musculoesqueléticas, pois contém vários fatores de crescimento que podem potencialmente otimizar a cicatrização tecidual (Garbin e Olver, 2019), além de ser capaz de promover a expansão das CTM, diminuir o tempo necessário para atingir a confluência (Chierigato *et al.*, 2011), sendo considerado um promotor de proliferação de CTM *in vitro* (Lai *et al.*, 2018).

O tratamento com PRP alogênico não é uma prática comum na medicina equina devido aos possíveis efeitos adversos devido à incompatibilidade entre o doador e o paciente (Seidel *et al.*, 2021). A limitação quanto ao seu uso consiste na dificuldade de purificar o sobrenadante rico em fator plaquetário das membranas plaquetárias, que formam grandes agregados e aderem às superfícies das CTM (Chierigato *et al.*, 2011), além de conter complemento, imunoglobulinas, albumina e fibrinogênio, os quais tornam o PRP alogênico propenso a resposta imune/alérgica (Pennati *et al.*, 2020).

2.3.3. Lisado plaquetário

O lisado plaquetário (LP) é um hemoderivado oriundo do rompimento das membranas plaquetárias presentes no PRP por meio de ciclos de congelamento e descongelamento para liberação dos fatores de crescimento (Astori *et al.*, 2016; Angelis *et al.*, 2020) que, graças aos quais as plaquetas são capazes de mediar o

reparo tecidual em locais lesionados sob condições fisiopatológicas (Iudicone *et al.*, 2014). O lisado plaquetário está sendo estudado extensivamente, principalmente envolvendo cultivo de CTM humanas (Schubert *et al.*, 2017), com quantidade limitada de estudos envolvendo cultivo de células animais (Yaneselli *et al.*, 2019). Na medicina veterinária, há relatos de uso terapêutico de LP em casos de endometrite em éguas (Colombo *et al.*, 2022), osteoartrite (Tyrnenopoulou *et al.*, 2016; Perrone *et al.*, 2020), injúrias musculares (Fukuda *et al.*, 2022) e como um produto antimicrobiano alternativo (Gordon *et al.*, 2021). Tornou-se alvo de interesse por reduzir problemas associados à suplementação clássica de SFB, além de poder ser produzido de forma alogênica, com baixo custo, em larga escala em humanos (Iudicone *et al.*, 2014; Cowper *et al.*, 2019) e equinos (Seo *et al.*, 2013; Russell e Koch, 2015; Hagen *et al.*, 2021).

Quando produzido sob condições controladas e padronizadas, o LP demonstrou ser um suplemento eficiente para a expansão celular (Russel e Koch, 2015). Evidências crescentes indicam que LP tem potencial para se tornar o suplemento apropriado para propagação de células com propósitos de reparação (Burnouf *et al.*, 2016). Várias alternativas ao uso de SFB foram exploradas, com resultados mais encorajadores usando meios quimicamente definidos/sem soro ou suplementados com lisado plaquetário (Hagen *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, o PRP e/ou lisado plaquetário foram propostos como substitutos do SFB (Phetfong *et al.*, 2017). Embora o PRP possua elevada concentração de fatores de crescimento, a membrana plaquetária possui elementos imunogênicos (Chierigato *et al.*, 2011), o que poderia interferir negativamente na administração de CTM. Por outro lado, o lisado plaquetário possui elevada concentração de fatores de crescimento, porém sem apresentar a membrana plaquetária, o que lhe confere melhor aplicabilidade de maneira alogênica. Ademais, é substancialmente mais econômico do que SFB para expansão CTM devido às aceleradas taxas de proliferação celular (Cowper *et al.*, 2019).

Diante do exposto, o presente estudo buscou comparar diferentes hemoderivados como suplementos ao meio de cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina, buscando eleger um

hemocomponente equivalente ou superior ao SFB, de modo a remover componentes xenogênicos potencialmente causadores de reações imunes pós-transplante de CTM equinas.

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

O estudo foi conduzido seguindo os princípios da ética e do bem-estar na experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu (Protocolo 0049/2021). O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Terapia Celular, FMVZ, UNESP.

3.1 Seleção dos animais

Três equinos (450-500 kg, escore de condição corporal 7/9, machos, castrados, idade entre oito e dez anos) foram selecionados seguindo os critérios de higiene obtidos a partir dos exames físicos e complementares, que incluíram avaliação dos parâmetros fisiológicos da espécie, hemograma (hematimetria, plaquetas e leucometria) e bioquímico (enzimas hepáticas, bilirrubina, marcadores renais como ureia e creatinina), a fim de excluir fatores que possam afetar a qualidade dos hemoderivados. Os exames laboratoriais foram realizados pelo Laboratório Clínico Veterinário (LCV) da FMVZ-UNESP.

3.2 Coleta de material biológico

Após a avaliação do estado de saúde, o sangue total para a preparação de lisado plaquetário e soro equino foi obtido assepticamente da veia jugular em tubos de coleta com reagentes específicos para cada hemoderivado: tubos com capacidade de 3,6mL contendo 3,2% de citrato de sódio para o preparo do lisado plaquetário e tubos com capacidade de 8mL sem anticoagulante para obtenção do soro. Após a coleta, o sangue foi imediatamente processado.

3.3 Produção do pool de lisado plaquetário

O lisado plaquetário foi preparado a partir da separação do concentrado de plaquetas. O volume contido nos tubos com citrato de sódio foi acondicionado em

tubos de polipropileno e submetido a descanso por 30 minutos à temperatura ambiente e ausência de luz. Após o primeiro período de descanso, foram centrifugados a 300 x g durante cinco minutos e submetidos ao segundo descanso de tempo igual. Em seguida, o plasma foi centrifugado a 700 x g por 15 minutos. 75% do volume de plasma foi descartado, restando apenas 25% correspondente ao concentrado de plaquetas ou PRP, que foram submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento a fim de romper as membranas plaquetárias e liberar os fatores de crescimento. Os ciclos consistiram em congelação sob temperatura de - 80°C *overnight* e descongelação a 37°C em banho-maria. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para tubos de centrifugação estéreis. Para a remoção dos debris plaquetários, as amostras foram centrifugadas a 4000 x g por 30 minutos e o sobrenadante aspirado acima do material peletizado e filtrado em filtros estéreis de 0,22 µm, estando pronto para uso. Foi necessário adicionar 2UI/ml de heparina sódica (Cristália, São Paulo – BR) durante a preparação do meio de cultivo a fim de evitar sua coagulação (Yaneselli *et al.*, 2019).

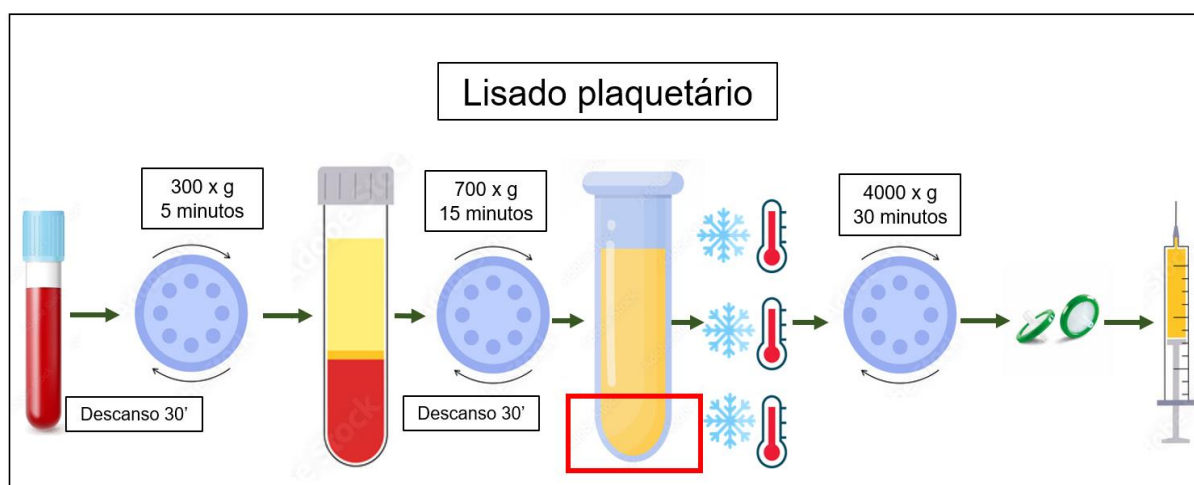


Figura 1. Esquema do delineamento experimental do preparo do pool de lisado plaquetário.

3.4 Preparo do soro equino

Após a coleta, os tubos foram mantidos ao abrigo da luz e submetidos a descanso de uma hora a fim de permitir coagulação e separação do soro. Este foi obtido a partir de uma única centrifugação dos tubos sem anticoagulante a 716 x g durante 10 minutos, aspirado, filtrado em membranas estéreis de 0,22 µm e

acondicionado em tubos de polipropileno. Posteriormente, foi congelado à temperatura de -20°C até o momento de utilização, quando foi descongelado no banho-maria a 37°C e adicionado ao meio de cultivo do grupo correspondente.

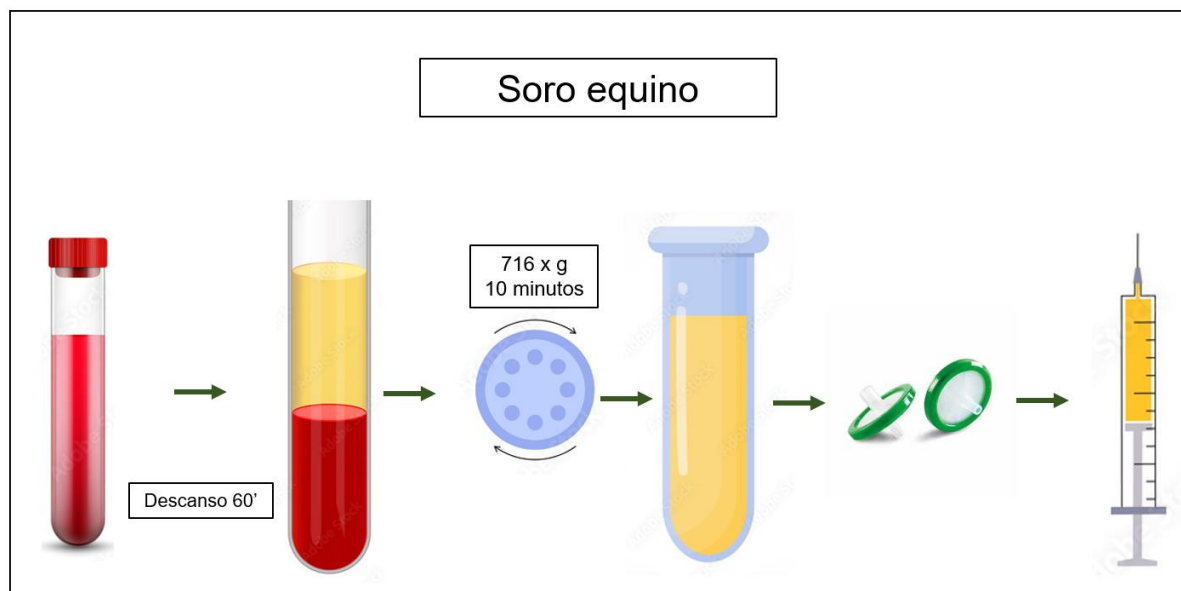


Figura 2. Esquema do delineamento experimental da produção do pool de soro equino.

3.5 Cultivo das Células-tronco Mesenquimais derivadas de Membrana Sinovial (MsCTM)

Foram utilizadas MsCTM criopreservadas na quarta passagem (P4), previamente caracterizadas, provenientes do biobanco do Laboratório de Terapia Celular, FMVZ, UNESP Campus Botucatu. Até a sexta passagem (P6) as MsCTM foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo celular com meio de cultivo composto por: DMEM-F12 Glutamax® (Thermo Fisher, MA – USA) suplementado com 10% de SFB (SFB - Thermo Fisher, MA – USA) e 1% de antibiótico-antimicótico (10.000 UI de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 μg de anfotericina B por mL. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A partir da sétima passagem (P7), as células foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo celular em triplicata, formando os seguintes grupos com três meios distintos, compostos por DMEM-F12 Glutamax®, 1% de antibiótico-antimicótico, suplementado com uma das três substâncias seguintes:

(a) Grupo controle - SFB: DMEM-F12 Glutamax®, 1% de antibiótico-antimicótico, 10% de soro fetal bovino;

(b) Grupo SE: DMEM-F12 Glutamax®, 1% de antibiótico-antimicótico, 10% de soro equino;

(c) Grupo LP: DMEM-F12 Glutamax®, 1% de antibiótico-antimicótico, 10% de LP, 2UI/ml de heparina sódica.

As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Todo o procedimento celular foi realizado em cabine de biossegurança (Trox, São Paulo, São Paulo - Brasil) para manter a esterilidade da amostra. O meio de cultivo foi trocado a cada 48-72 horas, até atingirem confluência de 80% de preenchimento do fundo da garrafa, para então realizar a dissociação enzimática com Tripsina EDTA 0,25% (Thermo Fisher, MA – USA). As análises foram realizadas a partir da nona passagem (P9) quando os grupos atingiam o número de células necessários.

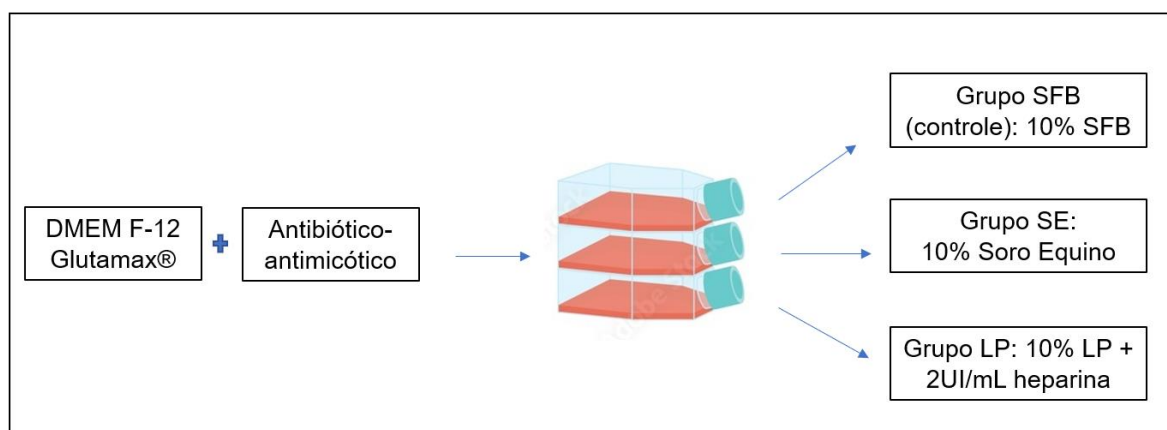


Figura 3. Esquema do delineamento experimental do cultivo das MsCTM.

3.6 Caracterização e diferenciações celulares

Ainda em cultivo, parte das MsCTM foram destinadas à caracterização por meio da morfologia, capacidade de aderência ao fundo da garrafa, imunofenotipagem e diferenciação em tri linhagem (osteogênica, adipogênica e condrogênica). Os critérios para caracterização de CTM de cavalos são baseados em um painel de marcadores

e incluem vários dos critérios que são usados para caracterizar CTM humanas, conforme determinado pela SITC.

A avaliação de citometria de fluxo para caracterização imunofenotípica foi realizada em conjunto com o Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), no Laboratório de Citometria de Fluxo, Laboratório de Biotecnologia Aplicada, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp, utilizando o aparelho FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). A seleção dos anticorpos foi parcialmente baseada em um estudo prévio sobre o conhecimento das pesquisas em CTM equinas (Schawer *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2013). A expressão dos receptores de superfície '*cluster of differentiation*' (CD) foi identificada pela relação antígeno-anticorpo. Os marcadores positivos utilizados foram: *mouse anti-rat* CD90 PERCP (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) e *mouse anti-human* CD105 FITC mAb (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) para avaliar a expressão interespécies. Os anticorpos monoclonais específicos *mouse anti-horse* CD44 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK), *mouse anti-horse* CD13 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) e *mouse anti-horse MHC Class II* (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK), foram marcados com o anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse IgG-FITC* (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Os marcadores negativos utilizados foram o *mouse anti-human* CD34 FITC (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) e o *mouse anti-rat* CD45 PE (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

As MsCTM provenientes de P9 foram diferenciadas nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica demonstrando sua multipotencialidade. As diferenciações adipogênica e osteogênica foram realizadas em duplicata, sendo que uma amostra adicional para cada grupo foi mantida em meio de cultura não indutor de diferenciação durante 14 dias como controle destas. A diferenciação condrogênica também teve uma amostra controle composta por MsCTM em meio de cultura não indutor de diferenciação por 21 dias.

Para a diferenciação adipogênica, as células foram incubadas na densidade de 20.000 células/cm² em uma placa de cultura de 6 poços e cultivadas em meio de cultura adipogênico *StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Grand Island, NY, USA) durante 14 dias. O meio de cultura foi trocado a cada três dias.

Posteriormente, as células foram fixadas com solução de formaldeído 10% durante 10 minutos, seguido de lavagens com água ultrapura (Milli-Q®) e coloração com *Oil Red* (Gibco, Grand Island, NY, USA).

Para a diferenciação osteogênica das MsCTM, as células progenitoras da nona passagem foram incubadas a uma densidade de 20.000 células/cm² em placa de cultura de 6 poços e mantidas em condições osteogênicas com o meio *Stem Cell Osteogenesis Kit* (Gibco, Grand Island, NY, USA) durante 14 dias, e a troca do meio a cada três dias. As células foram fixadas em solução de formaldeído 10% durante 10 minutos, seguido de lavagens com água ultrapura (Milli-Q®) sendo corada com *Alizarin Red* (Gibco, Grand Island, NY, USA).

A condrogênese foi induzida em um pellet celular preparado com 2×10^6 células alocadas em um tubo cônico de 15 mL de polipropileno. O pellet foi cultivado a 37°C com 5% CO₂ em 2 mL de meio de cultivo condrogênico *StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Grand Island, NY, USA), que foi trocado a cada três dias. Após o período de três semanas de incubação, o pellet foi fixado em solução de formaldeído 10% durante 24 horas a temperatura ambiente, parafinado e, posteriormente, cortado em seções de 5 µm, sendo corado com hematoxilina e eosina para a histologia geral e com Azul de Toluidina para detectar os proteoglicanos sulfatados.

3.7 Avaliação da proliferação celular

Para determinar o tempo de ciclo das células expostas a distintos suplementos adicionados ao meio de cultivo, foram plaqueadas amostras na concentração de 5×10^3 /cm² (Urrutia *et al.*, 2019) em placas de cultura celular de seis poços, totalizando 45.000 células por poço. A taxa de proliferação celular de cada amostra foi determinada por contagem automatizada (*Countess® 3 Automated Cell Counter*, Invitrogen) de células viáveis em intervalos de 48h, 96h, 144h, 192h e 240h após o plaqueamento inicial. Em seus respectivos momentos, cada poço foi dissociado enzimaticamente com 1000 µl de Tripsina EDTA 0,25% (Thermo Fisher, MA – USA) e submetido à leitura. Os resultados de cada cultivo foram aplicados na fórmula seguinte e analisados por um algoritmo em software online: Roth V. 2006 Doubling Time Computing, disponível em: <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

$$\text{Tempo de duplicação} = \frac{\text{Duração} \times \log(2)}{\log(\text{inicial}) - \log(\text{final})}$$

3.8 Avaliação do metabolismo celular pelo ensaio do MTT

A atividade metabólica celular de cada grupo foi avaliada pelo ensaio do MTT, adaptado de Kumar *et al.* (2018). É um ensaio de citotoxicidade colorimétrico que envolve a conversão do corante amarelo solúvel em água MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio] a um formazan roxo insolúvel pela ação da redutase mitocondrial. As MsCTM foram cultivadas com cinco replicações cada grupo em placas de 96 poços, com densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço, durante 96 horas. A cada intervalo de 24h, a absorbância de cada poço foi mensurada a 570 nm usando o espectrofotômetro BioTek Powerwave x52® (Highland Park, Winooski, VT, USA), software Gen5. Cada grupo teve seu controle negativo composto pelo meio de cultivo sem MsCTM.

3.9 Análise estatística

Os dados experimentais foram relatados como média \pm desvio padrão. O desvio padrão também foi utilizado como barra de erro nas figuras. Após a análise descritiva dos dados, eles foram submetidos a um teste de normalidade. Foi realizado ANOVA e, em seguida o teste de Tukey para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi $< 0,05$. O software utilizado para todas as análises foi o GraphPad Prism v.9 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Seleção dos animais e coleta de material biológico

Os animais escolhidos apresentaram parâmetros do exame físico (frequências cardíaca e respiratória, motilidade intestinal, tempo de preenchimento capilar, coloração das mucosas e temperatura) e dos exames laboratoriais dentro da normalidade fisiológica para a espécie equina. A avaliação dos resultados de ambos os exames permitiu a seleção dos candidatos hígidos e aptos a serem utilizados como

doadores de sangue para o estudo em questão. A concentração plasmática média de plaquetas dos candidatos escolhidos foi de 144.766 ± 45.192 plaquetas/ μL .

A via de coleta escolhida foi de fácil acesso e manuseio, permitindo coletar o volume suficiente para produção dos hemocomponentes de, aproximadamente, 660mL de cada animal.

4.2 Produção do lisado plaquetário e do soro equino

Após as centrifugações e separação do plasma para produzir o concentrado de plaquetas e, posteriormente, obtenção do LP, a concentração foi de $1.371.075 \pm 218.291$ plaquetas/ μL , correspondente a 9 vezes a concentração plasmática inicial. Com a finalidade de romper as membranas plaquetárias e liberar os fatores de crescimento, os três ciclos de congelamento/descongelamento foram eficazes e propiciaram a geração de quantidade significativa de sedimentos correspondentes aos debris plaquetários ao término da última centrifugação. Após filtração em membranas de $0,22\mu\text{m}$, o hemocomponente estava pronto para ser adicionado ao meio de cultivo. O preparo do soro equino se deu de maneira relativamente simples após descanso, centrifugação e filtração, estando pronto para uso imediato.

4.3 Cultivo das MsCTM

As MsCTM foram descongeladas em P5 e mantidas em meio de cultivo com SFB até a sétima passagem (P7), a partir da qual os meios de cultivo suplementados com hemocomponentes foram apresentados às células. As análises realizadas no estudo se iniciaram após duas passagens com o meio de cultivo de cada grupo, ou seja, a partir da nona passagem (P9) em diante devido à necessidade de alcançar número suficiente de células e tempo de exposição aos meios testados. Cada grupo seguiu uma cronologia distinta devido às condições do meio e comportamento das células diante das condições a que estavam expostas.

As células apresentaram morfologia fusiforme com pequenas variações, capacidade de adesão ao plástico e expansão clonal semelhantes. A morfologia variou desde células mais delgadas e alongadas (grupos SFB e SE) a mais cuboides e leve redução das extensões citoplasmáticas (grupo LP). Destaque para o grupo

SE, cujas células expandiram com menos contato entre si, formando um arcabouço frouxamente interligado. A Figura 4 representa a morfologia das MsCTM em P9 expostas aos grupos controle SFB, SE e LP.

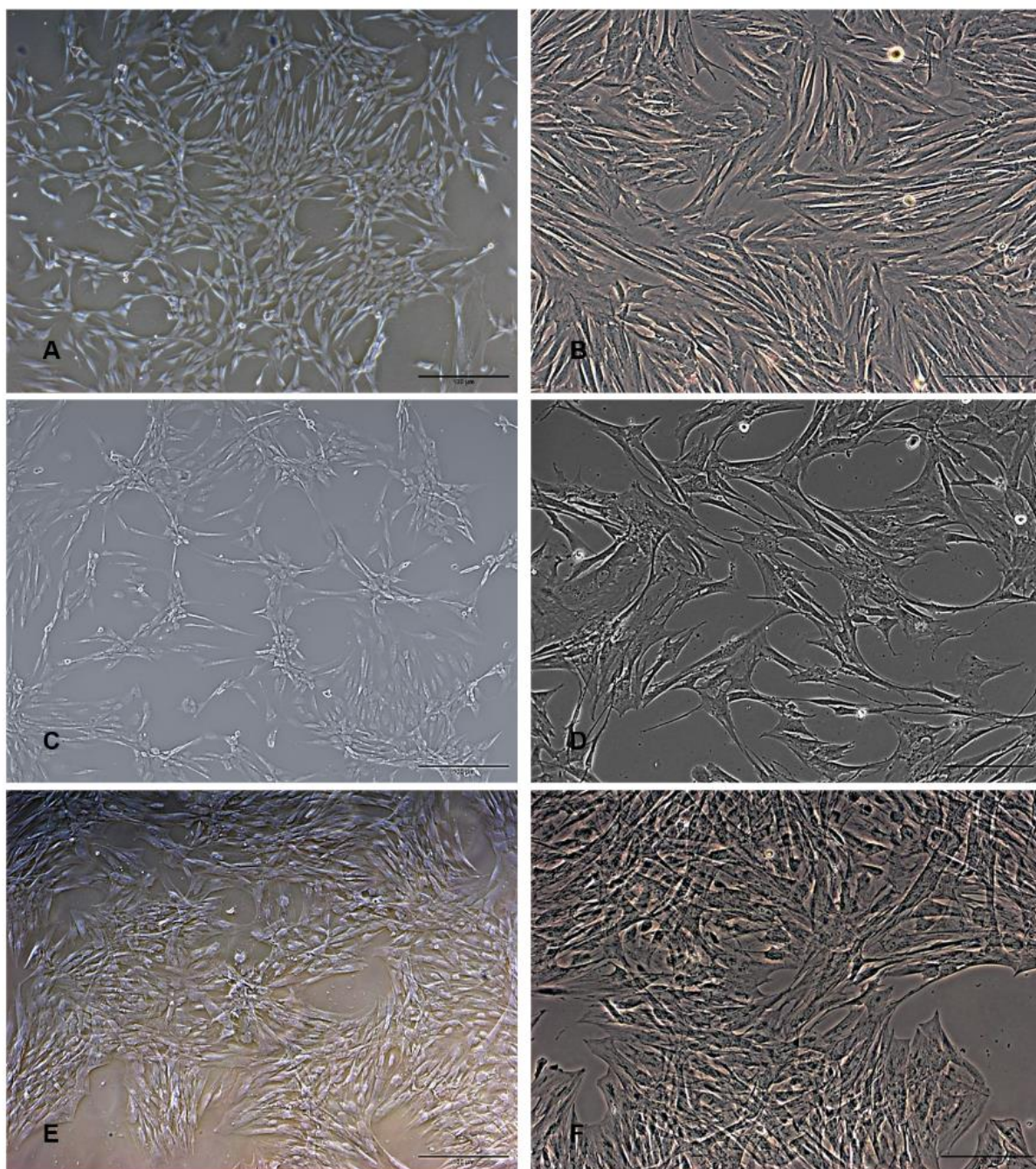


Figura 4. Morfologia das MsCTM em P9 nos diferentes meios de cultivo celulares. **A e B:** MsCTM em meio com SFB 10%. **C e D:** MsCTM em meio com SE 10%. **E e F:** MsCTM em meio com LP 10%. **A, C e E:** objetiva aumento de 5x. **B, D e F:** objetiva de aumento de 10x.

4.4 Diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica

Dentre as modalidades de caracterização das CTM, avaliar sua capacidade de diferenciação em tecidos mesodermis como osso, gordura e cartilagem é considerado fundamental para determinação da capacidade tronco destas células. As MsCTM expostas aos diferentes meios de cultivo utilizadas no estudo foram submetidas às diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica, e avaliadas qualitativamente usando coloração histoquímica. A capacidade de diferenciação adipogênica foi determinada pela coloração *Oil Red*, marcando em vermelho as gotículas lipídicas e triglicerídeos do citoplasma (Figura 5). A capacidade de diferenciação osteogênica foi confirmada pela detecção de nódulos de cristais de hidroxiapatita, corados por *Alizarin Red* (Figura 6). A diferenciação condrogênica representada na Figura 7 foi determinada pelas colorações de Azul de Toluidina, evidenciando marcação de proteoglicanos e glicosaminoglicanos presentes na cartilagem hialina, e Hematoxilina e Eosina (H&E), após 21 dias de cultivo em *pellet* celular sedimentado em tubo cônico.

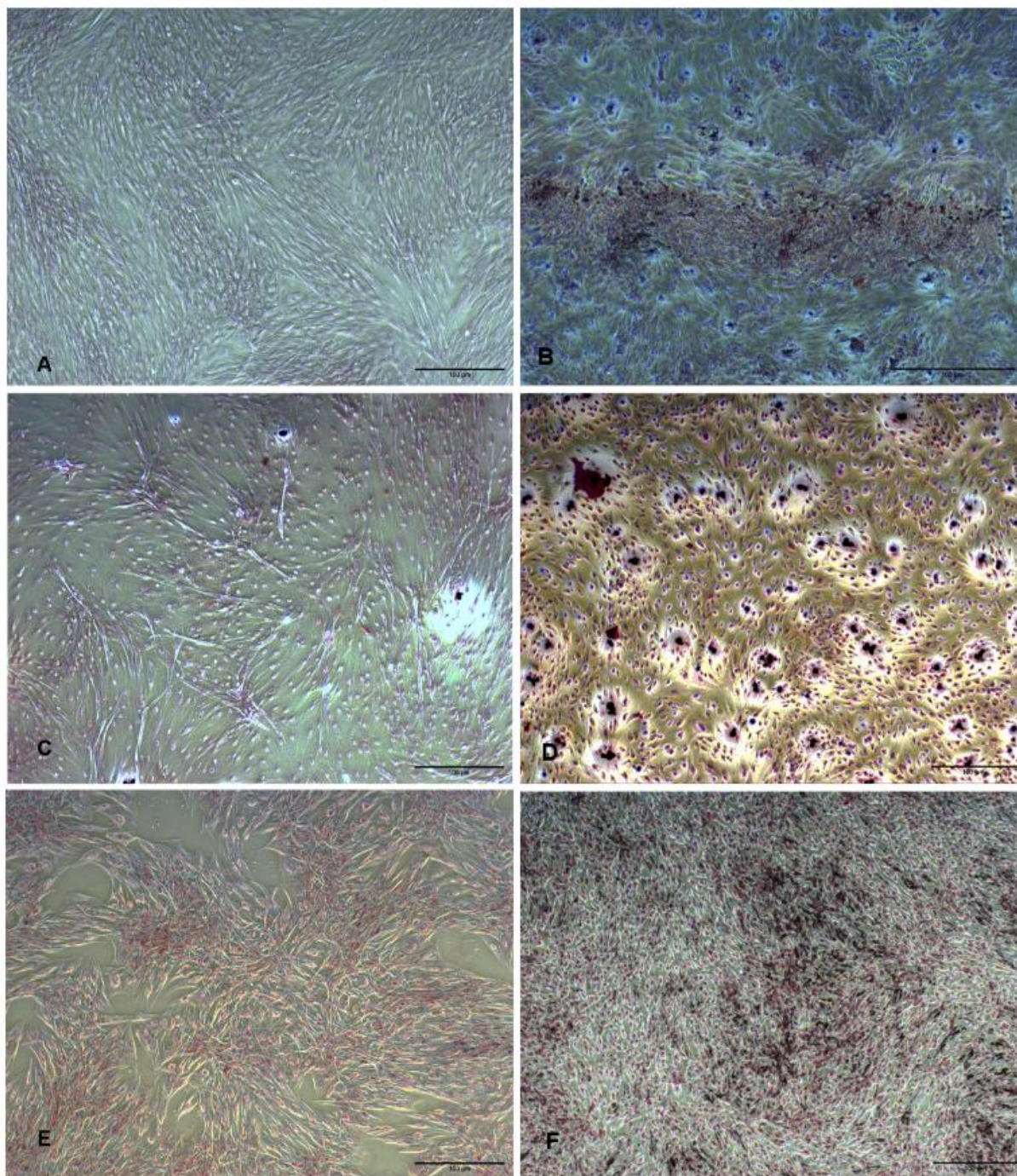


Figura 5. Avaliação da diferenciação adipogênica das MsCTM de cada grupo. Coloração com Oil Red. **A e B:** MsCTM cultivadas em meio com SFB. **C e D:** MsCTM cultivadas em meio com SE; **E e F:** MsCTM cultivadas em meio com LP. **A, C e E:** amostra controle de cada grupo sob condições de cultivo sem meio indutor de diferenciação, objetiva de aumento de 5x. **B, D, F:** amostras cultivadas com meio de diferenciação adipogênica, objetiva de aumento de 5x.

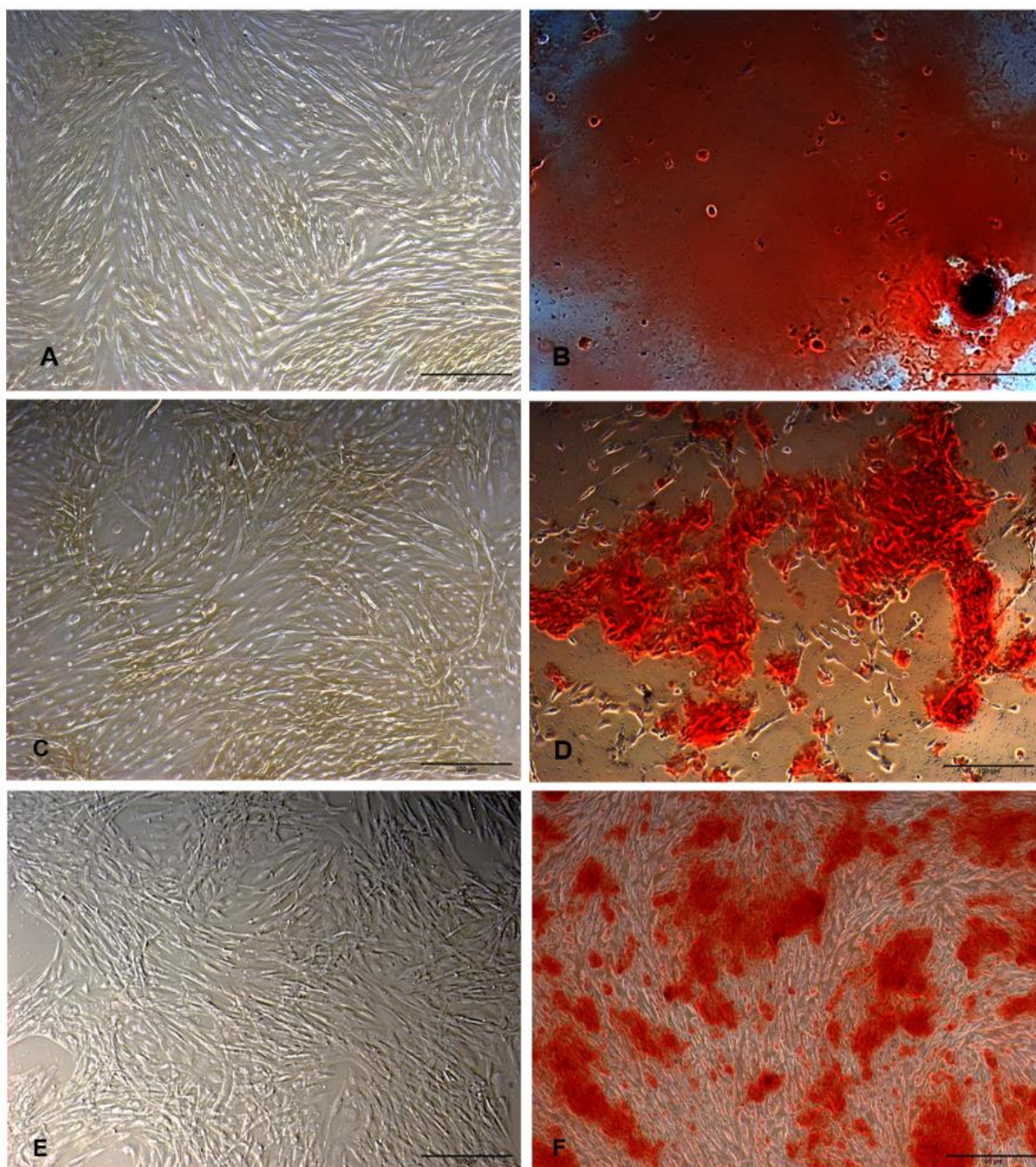


Figura 6. Avaliação da diferenciação osteogênica das MsCTM de cada grupo. Coloração com Alizarin Red. **A e B:** MsCTM cultivada em meio com SFB. **C e D:** MsCTM cultivada em meio com SE; **E e F:** MsCTM cultivada em meio com LP. **A, C e E:** amostras controle de cada grupo cultivada sob condições de cultivo sem meio indutor de diferenciação osteogênica, objetiva de aumento de 5x. **B, D, F:** amostras de cada grupo cultivadas com meio indutor de diferenciação osteogênica, objetiva de aumento de 5x.

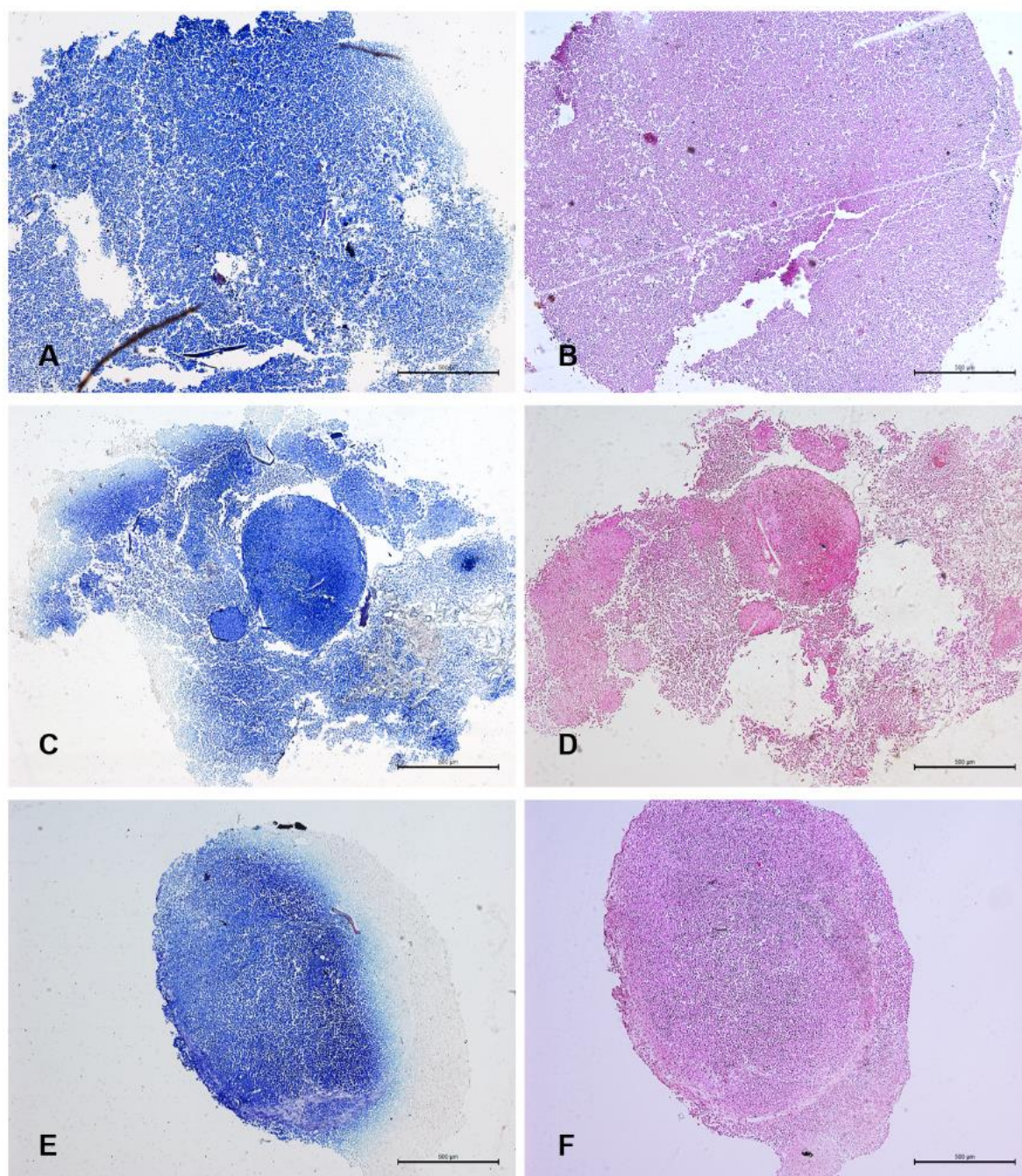


Figura 7. Avaliação da diferenciação condrogênica das MsCTM de cada grupo. Coloração com Azul de Toluidina e Hematoxilina e Eosina. **A e B:** MsCTM cultivadas em meio com SFB. **C e D:** MsCTM cultivadas em meio com SE. **E e F:** MsCTM cultivadas em meio com LP. **A, C e E:** amostras de cada grupo cultivadas com meio indutor de diferenciação condrogênica, coradas com Azul de Toluidina. **B, D e F:** amostras de cada grupo cultivadas com meio indutor de diferenciação condrogênica, coradas com Hematoxilina e Eosina, objetiva de aumento de 5x.

Em todos os grupos, as MsCTM foram capazes de se diferenciar em tri linhagem, com destaque para as células dos grupos LP e SE que apresentaram

adipogênese espontânea (Figura 5) pela amostra controle cultivada em meio não indutor de diferenciação adipogênica. Além disso, a marcação de adipogênese das MsCTM induzidas à diferenciação foi mais intensa nos grupos LP e SE em comparação ao grupo SFB, conforme visto na Figura 5.

4.5 Imunofenotipagem

As MsCTM provenientes da décima primeira passagem (P11), expostas aos três diferentes meios de cultivo, foram submetidas à caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo após a marcação com receptores de superfície específicos. Os resultados estão dispostos na Tabela 1 e ilustrado na Figura 5. Todas as células foram negativas (<2%) para os seguintes marcadores: CD34, marcador hematopoiético; CD 45, marcador leucocitário; CD 13, marcador mieloide; e complexo principal de histocompatibilidade tipo II (MHC-II). O marcador de adesão celular CD 90 teve forte expressão (> 95%) em todos os grupos analisados, assim como o marcador CD44, que é um receptor de adesão multifuncional identificado como um marcador de CTM, com resultados superiores a 85%. O marcador de angiogênese, CD 105, apresentou expressão positiva variada entre os grupos, com maior expressão pelas células do grupo LP (93,97%), seguido pelo grupo SE (85,66%) e, por fim, pelo grupo SFB (67,56%). Assim, a cultura com os suplementos SE ou LP não parece alterar a expressão dos marcadores característicos do fenótipo das MsCTM, pois exibiram características imunofenotípicas semelhantes.

Tabela 1. Resultados em porcentagem (%) da imunofenotipagem das MsCTM em P11 dos grupos SFB, SE e LP obtidos por citometria de fluxo.

	CD 105	CD 90	CD 44	CD 45	CD 34	CD 13	MHC-II
SFB	67,56	99,08	94,77	1,98	1,34	1,84	1,2
SE	85,66	99,85	86,48	1,48	0,58	0,78	0,52
LP	93,97	98,61	87,6	1,51	0,39	1,25	0,98

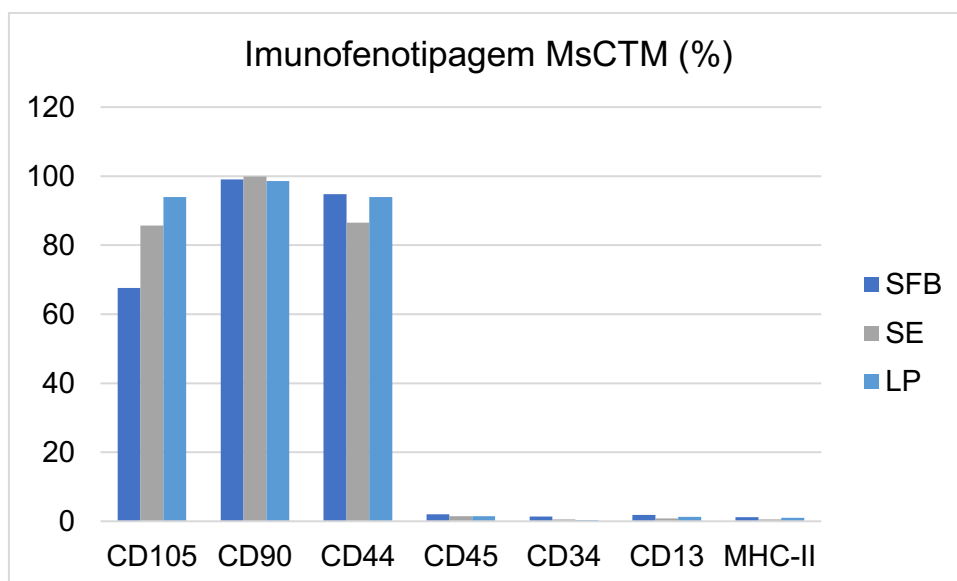


Figura 8. Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das MsCTM em P11 sob as três condições: SFB, SE, LP. Houve manutenção da positividade para CD105, CD90 e CD44 e negatividade para CD45, CD34, CD13 e MHC-II.

4.6 Taxa de proliferação celular

Os valores da taxa de proliferação celular estão descritos na Tabela 2. É possível observar na Figura 6 a curva de crescimento de cada grupo. Após passar por um período de adaptação correspondente às primeiras 48 horas de cultivo, cada grupo manifestou um comportamento distinto no decorrer do tempo. O grupo SFB manteve crescimento exponencial e a maior concentração final. O grupo LP apresentou fase logarítmica entre 48 e 144 horas, inibição por contato às 192h e atingiu o platô em seguida, finalizando com a concentração celular próxima do grupo controle. O grupo SE manifestou comportamento que destoou dos demais ao apresentar queda da concentração após o período de adaptação até o momento de 144 horas, com leve aumento às 192h e queda na concentração final. Dentre os dois grupos suplementados com hemoderivados equinos, o grupo LP apresentou concentração celular final maior do que SE e mais próxima do grupo SFB, mas nenhum destes foi superior ao SFB.

Tabela 2 Valores de proliferação celular após 48, 96, 144, 192 e 240 horas de cultivo das MsCTM com SFB, SE e LP.

	SFB	SE	LP
48 horas	111.000	199.000	158.000
96 horas	252.000	152.000	440.000
144 horas	469.000	152.000	1.290.000
192 horas	504.000	252.000	152.000
240 horas	581.000	170.000	522.000

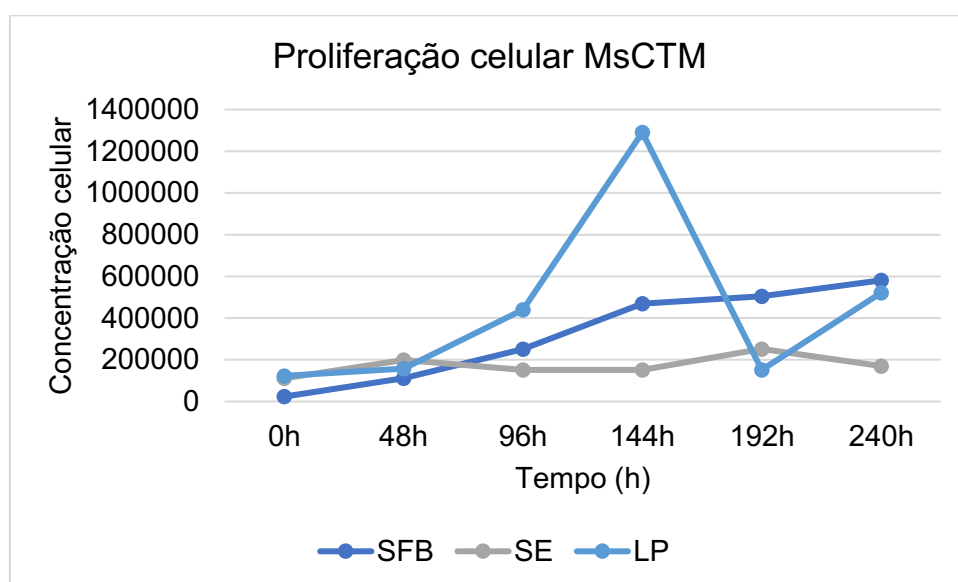


Figura 9. Representação das curvas de crescimento de cada grupo nos tempos 0, 48, 96, 144, 192 e 240 horas de cultivo.

4.7 Tempo de duplicação da população celular (TDPC)

A análise consiste no tempo necessário para a população de células dobrar de tamanho. O grupo controle apresentou menor tempo em relação aos demais, seguido pelo grupo LP e SE respectivamente. As células do grupo SE apresentaram tempo de duplicação 4,7 vezes maior que o grupo SFB e 2,0 vezes maior do que o grupo LP, evidenciando capacidade de proliferação celular inferior. Ambos os grupos com hemoderivados equinos foram inferiores ao SFB na avaliação da capacidade de

proliferação celular. O valor do TDPC de cada grupo está disposto na Tabela 3 e representado na Figura 7.

Tabela 3. Valor em horas de TDPC das MsCTM dos grupos SFB, SE, LP.

	SFB	SE	LP
Tempo (h)	93,58	438,23	214,98

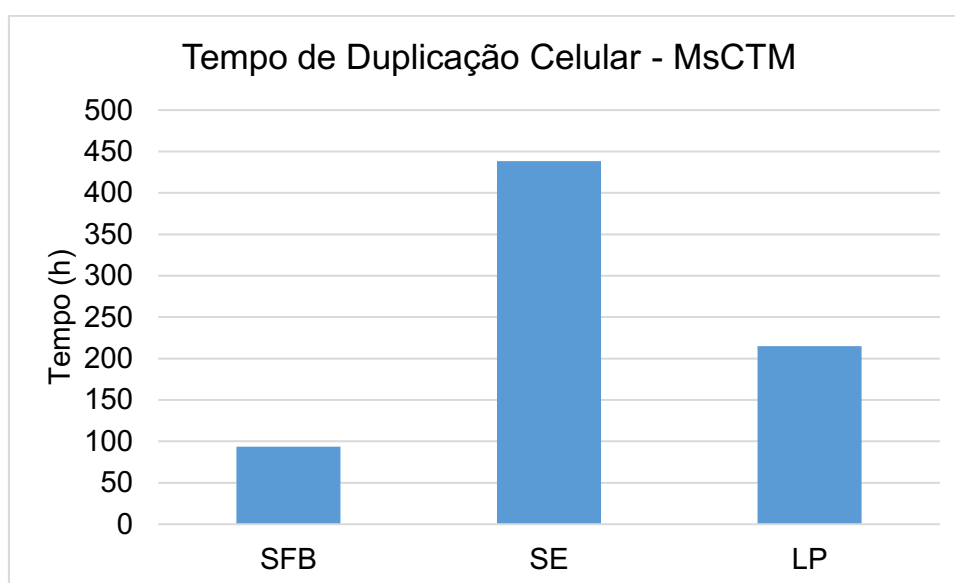


Figura 10. Representação do TDPC dos grupos. Ambos os grupos tratados apresentam tempo maior para duplicar a população celular, evidenciando capacidade de proliferação inferior ao grupo SFB.

4.8 Metabolismo celular (MTT)

A atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio do MTT, cujo princípio é baseado na redução do sal de tetrazólio amarelo solúvel em água a cristais de formazan roxo não solúveis em água por meio de células metabolicamente ativas. A figura 8 representa os resultados do ensaio do MTT. O grupo SE apresentou atividade metabólica crescente até o momento 48 horas, mostrando queda no momento 72 horas e recuperação no tempo 96 horas, havendo diferença estatística entre os grupos SFB (controle) e SE no momento 24 horas ($p = 0,0021^{**}$). O grupo LP apresentou atividade metabólica decrescente nas primeiras 72 horas, recuperando no momento 96 horas, havendo diferença estatística significativa entre os grupos controle e LP (p

= 0,0021**) nos momentos 24 e 48 horas. Não houve diferença estatística entre os grupos SE e LP durante o tempo de análise correspondente a 96 horas. O grupo SE teve maior capacidade de manter-se metabolicamente ativo em comparação ao grupo LP, que apresentou capacidade inferior, porém ambos foram inferiores ao grupo SFB.

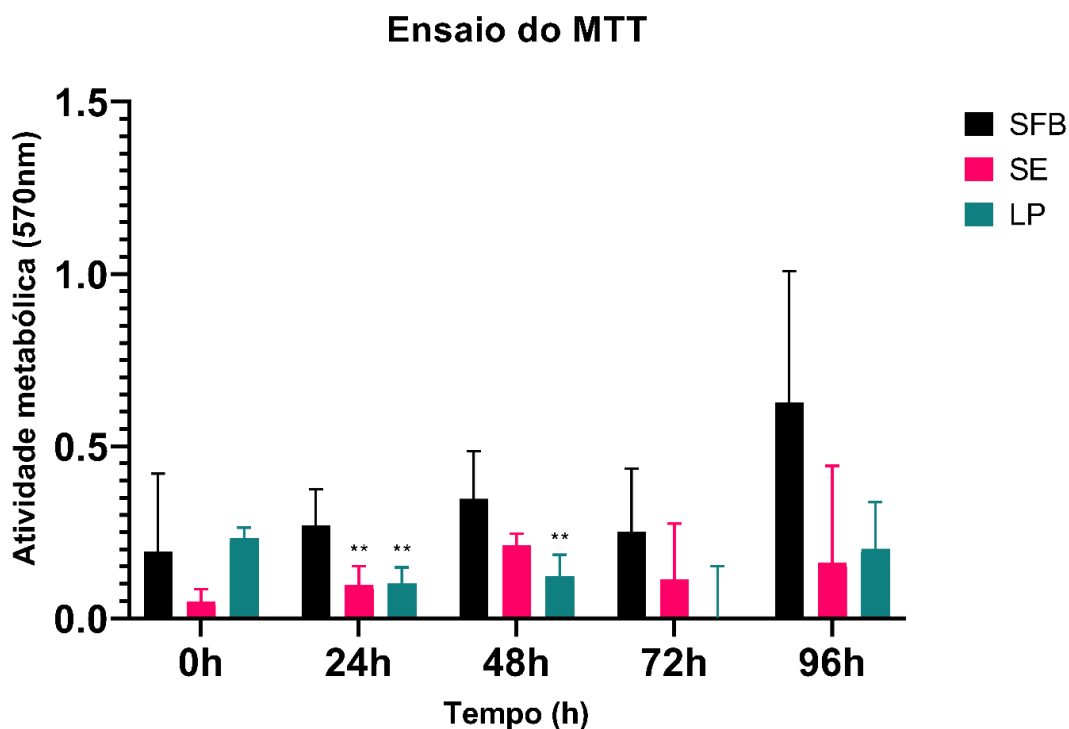


Figura 11. Ensaio do MTT evidenciando queda da atividade metabólica do grupo SE no momento 72 horas e recuperação no momento 96h. A atividade metabólica do grupo LP apresentou queda do momento 24 horas até o momento 72 horas, com recuperação no momento 96h. ** Diferença significativa ($p = 0,0021^{**}$).

5 DISCUSSÃO

Com o objetivo de eleger um hemocomponente equivalente ou superior ao SFB, de modo a remover componentes xenogênicos potencialmente causadores de reações imunes pós-transplante de CTM equinas, o presente estudo avaliou o comportamento das MsCTM cultivadas com lisado plaquetário e soro equino em comparação com MsCTM cultivadas com o meio de cultivo comumente utilizado suplementado com SFB. Foram avaliados morfologia celular, diferenciação em

trilinhagem (adipogênica, osteogênica e condrogênica), caracterização imunofenotípica, capacidade de proliferação celular e metabolismo celular.

Os hemoderivados foram produzidos a partir da coleta de sangue total em tubos específicos para cada hemoproduto. O volume sanguíneo coletado de cada animal foi inferior ao limite máximo seguro de coleta, cerca de 20% do volume total de sangue que um equino possui, correspondente a 8% do peso corporal (Mudge, 2014). A facilidade de obtenção e disponibilidade abundante da base dos hemoderivados são fatores favoráveis que sustentam a possibilidade de sua utilização no cultivo celular.

O lisado plaquetário é processado a partir do concentrado de plaquetas e pode ser obtido por meio de três procedimentos distintos: a partir do sangue total com anticoagulante pelo método de *buffy coat*, a partir do PRP ou diretamente por plaquetaférese (Hagen *et al.*, 2021). A composição final do PRP, assim como do soro, está sujeita a enorme variabilidade causada pelas condições de saúde sistêmica e estado de hidratação, sexo e idade do paciente, qualidade da técnica de punção venosa, sistema ou métodos de processamento utilizados. Tais fatores podem interferir na concentração plaquetária, cuja concentração ótima ainda precisa ser elucidada e, conseqüentemente, nas concentrações de fatores de crescimento e citocinas (Gilbertie *et al.*, 2018). Os hemoderivados equinos do presente estudo foram preparados a partir de um pool, seja do PRP para o LP seja do soro dos três doadores saudáveis selecionados, a fim de reduzir a variabilidade individual sobre a qualidade e composição do produto.

A concentração plaquetária do PRP foi 9,5 vezes a concentração sérica média de plaquetas, atingindo 1.371.075 plaquetas/ μ L. Em estudos prévios também envolvendo produção de LP equino a partir do PRP, as concentrações variaram entre 591×10^3 a $1000-2000 \times 10^3$ plaquetas/ μ L (Del Bue *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2013; Russell and Koch, 2015; Gilbertie *et al.*, 2018; Bozorgmanesh *et al.*, 2019; Yaneselli *et al.*, 2019). Além da concentração plaquetária, outro fator que pode interferir na concentração de fatores de crescimento é o número de ciclos de congelamento/descongelamento. Repetições realizadas por Laitinen *et al.* (2015) não geraram nenhum benefício ao LP produzido após cinco ciclos em comparação ao produzido após dois ciclos, além da possibilidade de inativação de componentes

críticos do suplemento proposto com mais ciclos. O número de ciclos descritos na literatura varia entre um a cinco (Burnouf *et al.*, 2016). Cowper *et al.* (2019) encontraram resultados positivos no cultivo, proliferação e diferenciação utilizando LP obtido com três ciclos, semelhante ao nosso estudo.

As células-tronco mesenquimais são comumente identificadas como células fusiformes, aderentes ao plástico, que crescem em monocamada e apresentam morfologia celular variável, variando de muito delgadas e alongadas a mais cuboides com menores extensões citoplasmáticas (Koch *et al.*, 2007). Avaliando os grupos, as MsCTM apresentaram morfologia com algumas variações, porém dentro do esperado para células-tronco, semelhante ao encontrado em estudo prévio com CTM da mesma origem (Prado *et al.*, 2015). Quando cultivadas em meio com LP, as MsCTM variaram a morfologia alongada para células mais cuboides com menores extensões citoplasmáticas, semelhante ao que Bari *et al.* (2001) observaram após indução da diferenciação osteogênica de MsCTM cultivadas com SFB. Ao serem cultivadas com SE, as CTM aderidas apresentaram padrão de organização em arcação circular frouxamente interligado, compatível com o exposto por Bieback *et al.*, (2009) ao cultivarem CTM humanas derivadas de medula óssea com 10% de soro humano. Apesar da variação morfológica entre os grupos, as MsCTM atenderam aos requisitos de morfologia e adesão para serem consideradas células-tronco.

A caracterização imunofenotípica das MsCTM não teve significância entre os grupos, semelhante ao que Cowper *et al.* (2019) encontraram ao comparar CTM derivadas de tecido adiposo cultivadas com SFB e com LP humano. Tendo em vista a origem de CTM, Li *et al.* (2020) concluíram que dentre os marcadores de superfície, as MsCTM humanas expressam CD90, CD105, CD44 e não expressam CD45 e CD34, semelhante ao encontrado no presente estudo. O CD34 é expresso na superfície das células-tronco hematopoiéticas e o CD45 está presente em todas as células hematopoiéticas nucleadas (exceto eritrócitos e plaquetas). Há destaque para a forte expressão de CD44, que também é receptor de ácido hialurônico, podendo ser considerado um marcador símbolo de CTM derivadas de membrana sinovial. As células dos três grupos expressaram fortemente CD44, assim como o CD105 e CD90. A expressão de CD90 tem sido relatada como decrescente à medida que há avanço das passagens (Nagase *et al.*, 2008), o que não encontramos no nosso estudo.

Mesmo a análise sendo realizada em P11, a expressão do marcador referido foi alta em todos os grupos (>95%), similar ao encontrado por Neybecker *et al.* (2020) avaliando MsCTM humanas. Prado *et al.* (2015) ao caracterizar MsCTM equinas apresentaram resultados divergentes dos encontrados no trabalho, com significativa expressão de CD45 (57.8 %) e CD34 (34,6%) e baixa expressão de CD105 (32,5%) e CD90 (41,4%). Gale *et al.* (2019) também obtiveram baixa expressão de CD105 para MsCTM equinas, tendo sido apontado como um marcador cuja expressão em células equinas é variável. Tais variações podem ser justificadas pela fonte de CTM, ao considerar a influência da gravidade e do estágio agudo ou crônico da osteocondrose na expressão desses marcadores. Foi possível notar que mesmo com suplementos diferentes, as MsCTM foram homogêneas ao não alterarem a expressão de marcadores de superfície celular específicos que as qualificam como células-tronco.

A multipotencialidade das células foi demonstrada pela capacidade de diferenciação em trilhação adipogênica, osteogênica e condrogênica pelos grupos após indução com os meios específicos e avaliação qualitativa por coloração histoquímica. Foi observada capacidade superior de diferenciação adipogênica pelas células dos grupos LP e SE submetidas ao meio indutor de diferenciação, evidenciada pela coloração mais intensa das vesículas lipídicas marcadas pelo corante *Oil Red* após 14 dias de cultivo. Quando a amostra controle de ambos os grupos foi corada, houve marcação de gotículas lipídicas destacando adipogênese espontânea, semelhante ao encontrado por Russel *et al.* (2015) ao cultivar CTM derivadas de medula óssea e tecido adiposo canino com LP sem meio indutor de diferenciação. Os autores associam o achado à alta expressão de marcadores específicos de mRNA, os quais aumentam progressivamente à medida que ocorre adipogênese. O presente estudo compartilha do achado e uma questão deve ser levada em consideração quanto ao uso clínico de CTM cultivadas com derivados de plaquetas. Como característica desejável de uma célula-tronco, temos a auto renovação, que é a divisão celular com manutenção do estado indiferenciado exigindo controle do ciclo celular e a manutenção da multipotência (Shenghui *et al.*, 2009). Dessa forma, existe a possibilidade do hemocomponente afetar a capacidade regenerativa da terapia com células-tronco quando associados por não ter o desempenho de uma substância neutra para o cultivo. A partir daí surge a necessidade de padronização de protocolos

e composição padrão dos hemoderivados capazes de sustentar a expansão de CTM para aplicação clínica segura e eficaz.

O potencial condrogênico das células foi positivamente marcado, o que pode se justificar pela alta expressão de CD90 pelas MsCTM de todos os grupos, considerado um importante marcador de diferenciação condrogênica (Prado *et al.*, 2015). Os resultados do presente estudo corroboram os de Nagase *et al.* (2008) e de Krawetz *et al.* (2012), sugerindo que o CD90 é um marcador de superfície celular que se correlaciona positivamente com o potencial condrogênico. A capacidade de diferenciação osteogênica marcada pela coloração *Alizarin Red* foi positiva e semelhante entre os grupos, não havendo osteogênese nas amostras controle. Resultados semelhantes foram encontrados em células humanas e equinas expostas a hemoderivados (Stute *et al.*, 2004; Bieback *et al.*, 2009; Cowper *et al.*, 2019; Hagen *et al.*, 2021). Embora as células tenham sido analisadas em P9, há estudo (Bari *et al.*, 2001) que aponta que os fatores como idade do doador, passagem celular e criopreservação não afetam o potencial das células derivadas de membrana sinovial. As diferenciações em tri linhagem observadas entre os grupos, indicam que as MsCTM são capazes de manterem a multipotencialidade como células-tronco quando expandidas em meios de cultivo com hemoderivados, porém o potencial tronco ainda precisa ser melhor estudo de modo a ser aprimorado e chegar num padrão ideal.

Ao avaliar a expansão celular, as MsCTM cultivadas com LP e SE manifestaram capacidade proliferativa e tempo de duplicação inferiores, quando comparadas às MsCTM cultivadas com SFB, durante a expansão do cultivo. A concentração celular final superior do grupo SFB evidenciou proliferação crescente e melhor capacidade de expansão. Estudos prévios com células humanas e equinas (Stute *et al.*, 2004; Bieback *et al.*, 2009; Yanaselli *et al.*, 2019; Cowper *et al.*, 2019;) mostram resultados opostos ao obterem resultados semelhantes ou superiores de proliferação de células cultivadas com hemoderivados em comparação a SFB. O grupo LP teve concentração celular final semelhante, mas não superior ao grupo SFB, apesar da oscilação da curva de crescimento que foi exponencial até 144 horas de cultivo. Após este período, ocorreu declínio da capacidade de proliferação de MsCTM com o mesmo tempo de cultivo exposto por Prado *et al.* (2015), que justificaram esse comportamento devido à redução da população celular na fase G2/M do ciclo celular.

O soro equino impossibilitou adequada proliferação celular, o que pode ser atribuído a menor concentração de fatores de crescimento em relação ao lisado plaquetário e ao SFB (Burnouf *et al.*, 2016).

A intensidade da cor do formazan é proporcional ao número de células viáveis e metabolicamente ativas, que podem ser usadas para estimar a viabilidade de vários tipos de células (Buranaamnuay, 2021). Com o ensaio colorimétrico do MTT, as células expostas a SFB foram superiores na manutenção da atividade metabólica durante o cultivo, corroborando sua capacidade de manter-se metabolicamente ativa e, conseqüentemente, melhor capacidade de proliferação. Quando cultivadas com SE, as células apresentaram padrão de atividade metabólica semelhante ao SFB, mas ainda inferior, mostrando serem capazes de manterem-se ativas, porém com menor capacidade de proliferação quando comparadas.

O grupo LP foi incapaz de manter-se metabolicamente ativo durante as primeiras 72 horas de análise, recuperando atividade apenas no momento 96 horas. Assim, manifestou padrão de viabilidade decrescente e incapacidade de sustentar a atividade celular uniformemente. Apesar da capacidade de proliferação intermediária dos grupos com hemoderivados equinos obtida no estudo, a concentração de 10% do LP mostrou-se insuficiente para alcançar resultados promissores comparáveis aos produzidos pelo SFB. Russel e Koch (2015) testaram concentrações de LP entre 5 e 60% e mostraram que as células têm taxas de crescimento ótimas em concentrações entre 20 e 40% de LP. Para aplicações clínicas de CTM em equinos faz-se necessário expansão para obter uma população celular homogênea e apropriado número de células (Yaneselli *et al.*, 2019). Já que um dos objetivos do estudo é eleger um hemocomponente capaz de substituir o SFB, os resultados encontrados não permitem afirmar que a substituição proposta seria eficaz. Portanto, acredita-se que em concentrações superiores há a possibilidade de resultados favoráveis ao uso de hemoderivados como substitutos do SFB no cultivo de CTM equinas.

A busca por um hemocomponente capaz de substituir o SFB do cultivo de CTM animais e humanas é real e atual. A Sociedade Internacional de Terapia Celular e várias agências reguladoras responderam com declarações de posição recomendando evitar o SFB na cultura de CTM para aplicações quando possível e

pediram um consenso sobre substituições de soro em meios de cultura de células (Pezzanite *et al.*, 2021). O lisado de plaquetas e o soro não são apenas alternativas atraentes para pronto uso aos concentrados de plaquetas para terapias ortobiológicas, mas também mostrou em diversos estudos grande promessa como suplemento de cultura celular substituindo o SFB em espécies humanas e equinas (Hagen *et al.*, 2022). Os fatores de crescimento são as principais moléculas que estimulam as células-tronco, seja aumentando sua sobrevivência ou sua taxa de proliferação (Anitua *et al.*, 2013). Portanto, a necessidade de padronização de protocolos de produção e composição dos hemoderivados, seus efeitos no cultivo celular, além da concentração ideal para sustentar o cultivo de CTM é uma demanda atual compartilhada pelos pesquisadores (Hagen *et al.*, 2021).

6 CONCLUSÃO

Ao comparar possíveis substitutos para o SFB no cultivo de CTM, os resultados do estudo permitiram afirmar que as MsCTM cultivadas com LP e SE foram capazes de manterem as características essenciais para serem identificadas como células-tronco, tais como adesão ao plástico, multipotencialidade (capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica) e expressão dos marcadores de superfície celular CD105, CD90, CD44 e não expressão de CD45, CD34, CD13 e MHC-II. Destaca-se a diferenciação adipogênica espontânea pelas células dos grupos com hemocomponentes equinos, cujo mecanismo deve ser elucidado a fim de que a aplicação clínica da terapia celular não seja prejudicada pelo comportamento precoce e inesperado das células nutridas com os substitutos desejáveis do SFB no cultivo de CTM. Embora as taxas de proliferação e viabilidade celular encontradas com 10% de SE e LP serem insuficientes para manter a expansão celular em níveis similares ou superiores ao SFB, faz-se necessário dar continuidade aos estudos relacionados ao assunto a fim de explorar a composição de cada hemoderivado e sua influência no cultivo celular, além da comparação de diferentes concentrações que podem gerar resultados satisfatórios e propiciar o cultivo livre de SFB.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A. L. G.; CARVALHO, A. M.; HUSSNI, C. A. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Equine Tendinitis. *Recent Patents On Regenerative Medicine*, v. 3, n. 2, p. 103-110, 2013.

ANGELIS, E.; GROLLI, S.; SALERI, R.; *et al.* Platelet lysate reduces the chondrocyte dedifferentiation during in vitro expansion: implications for cartilage tissue engineering. *Research In Veterinary Science*, v. 133, p. 98-105, 2020.

ANITUA, E.; PRADO, R.; ORIVE, G. Safety and efficient ex vivo expansion of stem cells using platelet-rich plasma technology. *Therapeutic Delivery*, v. 4, n. 9, p. 1163-1177, 2013.

ASTORI, G.; AMATI, E.; BAMBI, F.; *et al.* Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 7, n. 1, p. 93-100, 2016.

BAMI, M.; SARLIKIOTIS, T.; MILONAKI, M. *et al.* Superiority of synovial membrane mesenchymal stem cells in chondrogenesis, osteogenesis, myogenesis and tenogenesis in a rabbit model. *Injury*, v. 51, n. 12, p. 2855-2865, 2020.

BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*, v. 44, n. 8, p. 1928-1942, 2001.

BIEBACK, K.; HECKER, A.; KOCAÖMER, A.; *et al.* Human Alternatives to Fetal Bovine Serum for the Expansion of Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow. *Stem Cells*, v. 27, n. 9, p. 2331-2341, 2009.

BIEBACK, K. Platelet Lysate as Replacement for Fetal Bovine Serum in Mesenchymal Stromal Cell Cultures. *Transfusion Medicine And Hemotherapy*, v. 40, n. 5, p. 326-335, 2013.

BORJESSON, D. L.; PERONI, J. F. The Regenerative Medicine Laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clinics In Laboratory Medicine*, v. 31, n. 1, p. 109-123, 2011.

BOZORGMANESH, R.; MAGDESIAN, K. G.; SUTTON-BURGES, J. W.; *et al.* Equine platelet concentrate preparation and validation. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*, v. 33, n. 3, p. 1500-1506, 2019.

BROSSI, P. M.; MOREIRA, J. J.; MACHADO, T. S. I.; *et al.* Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2015.

BURANAAMNUAY, K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: a variety of the assay protocols. *Open Veterinary Journal*, v. 11, n. 2, p. 251-269, 2021.

BURNOUF, T.; STRUNK, D.; KOH, M.B.C.; *et al.* Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, v. 76, p. 371-387, 2016.

CAO, B. ZHENG, B.; JANKOWSKI, R. J.; *et al.* Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nature Cell Biology*, v. 5, n. 7, p. 640-646, 2003.

CARVALHO, A.M.; YAMADA, A.L.M.; GOLIM, M. A. ; *et al.* Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 4, p. 939-945, 2013.

CHAPMAN, H. S.; GALE, A. L.; DODSON, M. E. *et al.* Autologous Platelet Lysate Does Not Enhance Chondrogenic Differentiation of Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Despite Increased TGF- β 1 Concentration. *Stem Cells And Development*, v. 29, n. 3, p. 144-155, 2020.

CHIEREGATO, K.; CASTEGNARO, S.; MADEO, D. *et al.* Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue. *Cytotherapy*, v. 13, n. 8, p. 933-943, 2011.

CHISINI, Luiz A.; CONDÉ, M. C. M.; GRAZIOLI, G. *et al.* Venous Blood Derivatives as FBS-Substitutes for Mesenchymal Stem Cells: a systematic scoping review. *Brazilian Dental Journal*, v. 28, n. 6, p. 657-668, 2017.

COLBATH, A. C.; DOW, S. W.; HOPKINS, L. S.; *et al.* Allogeneic vs. autologous intra-articular mesenchymal stem cell injection within normal horses: clinical and cytological comparisons suggest safety. *Equine Veterinary Journal*, v. 52, n. 1, p. 144-151, 2019.

COLBATH, A. C.; FRISBIE, D. D.; DOW, S.W. *et al.* Equine Models for the Investigation of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Orthopaedic Disease. *Operative Techniques In Sports Medicine*, v. 25, n. 1, p. 41-49, 2017.

COLOMBO, I.; MISLEI, B.; MARI, G. *et al.* Effect of platelet lysate on uterine response of mares susceptible to persistent mating-induced endometritis. *Theriogenology*, v. 179, p. 204-210, 2022.

COWPER, M.; FRAZIER, T.; WU, X.; *et al.* Human Platelet Lysate as a Functional Substitute for Fetal Bovine Serum in the Culture of Human Adipose Derived Stromal/Stem Cells. *Cells*, v. 8, n. 7, p. 724-736, 2019.

DOMINICI, M.; BLANC, K. Le; MUELLER, I.; *et al.* 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.

FANI, N.; ZIADLOU, R.; SHAHHOSEINI, M. *et al.* Comparative epigenetic influence of autologous versus fetal bovine serum on mesenchymal stem cells through in vitro osteogenic and adipogenic differentiation. *Experimental Cell Research*, v. 344, n. 2, p. 176-182, 2016.

FRANKE, J.; ABS, V.; ZIZZADORO, C.; *et al.* Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC Veterinary Research*, v. 10, n. 1, p. 119-127, 2014.

FRISBIE, D. D.; JOHNSON, S. A. Synovial Joint Biology and Pathobiology. In: AUER, J. A.; STICK, J. A.; KÜMMERLE, J. M.; PRANGE, T. *Equine Surgery*. 5. ed. Missouri: Elsevier, 2019. Cap. 79, p. 1326.

FUKUDA, K.; KURODA, T.; TAMURA, N.; *et al.* Platelet Lysate Enhances Equine Skeletal Muscle Regeneration in A Bupivacaine-Induced Muscle Injury Model. *Journal Of Equine Veterinary Science*, v. 112, p. 103892-1, 2022.

GALE, A. L.; LINARDI, R. L.; MCCLUNG, G.; *et al.* Comparison of the Chondrogenic Differentiation Potential of Equine Synovial Membrane-Derived and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers In Veterinary Science*, v. 6, p. 178-187, 2019.

GARBIN, L. C.; OLVER, C. S. Platelet-Rich Products and Their Application to Osteoarthritis. *Journal Of Equine Veterinary Science*, v. 86, p. 102820, 2020.

GILBERTIE, J. M.; LONG, J. M.; SCHUBERT, A. G.; BERGLUND, A. K.; SCHAER, T. P.; SCHNABEL, L. V. Pooled Platelet-Rich Plasma Lysate Therapy Increases Synoviocyte Proliferation and Hyaluronic Acid Production While Protecting Chondrocytes From Synoviocyte-Derived Inflammatory Mediators. *Frontiers In Veterinary Science*, v. 5, p. 1-11, 2018.

GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *The Veterinary Journal*, v. 171, n. 1, p. 51-69, 2006.

GORDON, J.; ÁLVAREZ-NARVÁEZ, S.; PERONI, J. F. Antimicrobial Effects of Equine Platelet Lysate. *Frontiers In Veterinary Science*, v. 8, p. 1-9, 2021.

GUIOTTO, M.; RAFFOUL, W.; HART, A. M.; *et al.* Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review. *Journal Of Translational Medicine*, v. 18, n. 1, p. 351-364, 2020.

HAGEN, A.; LEHMANN, H.; AURICH, S. *et al.* Scalable Production of Equine Platelet Lysate for Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Culture. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2021.

HAGEN, A.; HOLLAND, H.; BRANDT, V.; *et al.* Platelet Lysate for Mesenchymal Stromal Cell Culture in the Canine and Equine Species: analogous but not the same. *Animals*, v. 12, n. 2, p. 189-208, 2022.

IUDICONE, P.; FIORAVANTI, D.; BONANNO, G. *et al.* Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *Journal Of Translational Medicine*, v. 12, n. 1, p. 28-41, 2014.

JOSWIG, A-J.; MITCHELL, A.; CUMMINGS, K. J.; *et al.* Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 8, n. 1, p. 42-52, 2017.

KOCH, T. G.; HEERKENS, T.; THOMSEN, P. D; *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 26-34, 2007.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2018, n. 6, p. 469-472, 2018.

LAI, F.; KAKUDO, N.; MORIMOTO, N.; *et al.* Platelet-rich plasma enhances the proliferation of human adipose stem cells through multiple signaling pathways. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 9, n. 1, p. 107-116, 2018.

LAITINEN, A.; OJA, S.; KILPINEN, L.; *et al.* A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotechnology*, v. 68, n. 4, p. 891-906, 2015.

LI, N.; GAO, J.; MI, L.; *et al.* Synovial membrane mesenchymal stem cells: past life, current situation, and application in bone and joint diseases. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 11, n. 1, p. 381-392, 2020.

MENSING, N.; GASSE, H.; HAMBRUCH, N. *et al.* Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Veterinary Research*, v. 7, n. 1, p. 42-54, 2011.

MUDGE, M. C. Acute Hemorrhage and Blood Transfusions in Horses. *Veterinary Clinics Of North America: Equine Practice*, v. 30, n. 2, p. 427-436, 2014.

NAGASE, T.; MUNETA, T.; JU, Y.-J.; *et al.* Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees

with medial compartment osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 58, n. 5, p. 1389-1398, 2008.

NEYBECKER, P. HENRIONNET, C.; PAPE, E.; *et al.* Respective stemness and chondrogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow, synovial membrane, and synovial fluid. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 11, n. 1, p. 316-327, 2020.

NOTODIHARDJO, S. C.; MORIMOTO, N.; KAKUDO, N.; *et al.* Comparison of the efficacy of cryopreserved human platelet lysate and refrigerated lyophilized human platelet lysate for wound healing. *Regenerative Therapy*, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2019.

NURDEN, A. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis And Haemostasis*, v. 105, n. 06, p. 13-33, 2011.

PASSERI, S.; NOCCHI, F; LAMANNA, R.; *et al.* Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biology International*, v. 33, n. 1, p. 100-105, 2009.

PENNATI, A.; APFELBECK, T.; BROUNTS, S. *et al.* Washed Equine Platelet Extract as an Anti-Inflammatory Biologic Pharmaceutical. *Tissue Engineering Part A*, v. 1, n. 1, p. 1-30, 2020.

PERRONE, G.; LASTRA, Y.; GONZÁLEZ, C.; *et al.* Treatment With Platelet Lysate Inhibits Proteases of Synovial Fluid in Equines With Osteoarthritis. *Journal Of Equine Veterinary Science*, v. 88, p. 102952-102958, 2020.

PHETFONG, J.; TAWONSAWATRUK, T.; SEENPRACHAWONG, K.; *et al.* Re-using blood products as an alternative supplement in the optimisation of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stem cell culture. *Bone & Joint Research*, v. 6, n. 7, p. 414-422, 2017.

PRADO, A. A. F.; FAVARON, P. O.; SILVA, L. C. L. C.; *et al.* Characterization of mesenchymal stem cells derived from the equine synovial fluid and membrane. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 281-293, 2015.

ROSA, G.; KRIECK, A. M. T.; PADULA, E.; *et al.* Allogeneic synovial membrane-derived mesenchymal stem cells do not significantly affect initial inflammatory parameters in a LPS-induced acute synovitis model. *Research In Veterinary Science*, v. 132, p. 485-491, 2020.

ROWLAND, A. L.; XU, J. J.; JOSWIG, A. J.; *et al.* In vitro MSC function is related to clinical reaction in vivo. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 9, n. 1, p. 295-303, 2018.

RUSSELL, K. A.; KOCH, T. G.. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? *Equine Veterinary Journal*, v. 48, n. 2, p. 261-264, 2015.

RUSSELL, K. A.; GIBSON, T. W. G.; CHONG, A.; *et al.* Canine Platelet Lysate Is Inferior to Fetal Bovine Serum for the Isolation and Propagation of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Plos One*, v. 10, n. 9, p. 1-14, 2015.

SAMBERG, M.; STONE, R.; NATESAN, S. *et al.* Platelet rich plasma hydrogels promote in vitro and in vivo angiogenic potential of adipose-derived stem cells. *Acta Biomaterialia*, v. 87, p. 76-87, 2019.

SANTOS, V. H.; PFEIFER, J. P. H.; SOUZA, J. B.; *et al.* Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. *BMC Veterinary Research*, v. 14, n. 1, p. 114-123, 2018.

SATO, J. D.; KAN, M. Media for Culture of Mammalian Cells. *Current Protocols In Cell Biology*, v. 00, n. 1, p. 1-15, 1998.

SCHAUWER, C.; MEYER, E.; WALLE, G. R.; *et al.* Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*, v. 75, n. 8, p. 1431-1443, 2011.

SCHUBERT, S.; BREHM, W.; HILLMANN, A. *et al.* Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture. *Cytometry Part A*, v. 93, n. 1, p. 60-72, 2017.

SEIDEL, S. R. T.; SOUZA, A. F.; FÜLBER, J.; *et al.* Evaluation of platelet-rich plasma applied in the coronary band of healthy equine hooves. *The Canadian Veterinary Journal*, São Paulo, v. 7, n. 62, p. 729-735, 2021.

SEO, J.-P.; TSUZUKI, N.; HANEDA, S.; *et al.* Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Research In Veterinary Science*, v. 95, n. 2, p. 693-698, 2013.

SHENGHUI, H.; NAKADA, D.; MORRISON, S. J.. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, v. 25, n. 1, p. 377-406, 2009.

SHETTY, P; BHARUCHA, K; TANAVDE, V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.

STUTE, N.; HOLTZ, K.; BUBENHEIM, M. *et al.* Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental Hematology*, v. 32, n. 12, p. 1212-1225, 2004.

SUBIRAN, C.; KRISTENSEN, S. G.; ANDERSEN, C. Y. Umbilical cord blood–derived platelet-rich plasma: a clinically acceptable substitute for fetal bovine serum? *Fertility And Sterility*, v. 115, n. 2, p. 336-337, 2021.

TAYLOR, S. E.; SMITH, R. K. W.; CLEGG, P. D. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Veterinary Journal*, v. 39, n. 2, p. 172-180, 2007.

TYRNENOPOULOU, P.; DIAKAKIS, N.; KARAYANNOPOULOU, M.; *et al.* Evaluation of intra-articular injection of autologous platelet lysate (PL) in horses with osteoarthritis of the distal interphalangeal joint. *Veterinary Quarterly*, v. 36, n. 2, p. 56-62, 2016.

URRUTIA, D. N.; CAVIEDES, P.; MARDONES, R.; *et al.* Comparative study of the neural differentiation capacity of mesenchymal stromal cells from different tissue

sources: an approach for their use in neural regeneration therapies. *Plos One*, v. 14, n. 3, p. 1-17, 2019.

WANG, C.; XIAO, R.; CAO, Y.; et al. Evaluation of human platelet lysate and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants for the cryopreservation of human adipose-derived stem cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, v. 491, n. 1, p. 198-203, 2017.

WATKINS, A.; FASANELLO, D.; STEFANOVSKI, D.; Investigation of synovial fluid lubricants and inflammatory cytokines in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta-induced synovitis and joint lavage models. *BMC Veterinary Research*, v. 17, n. 1, p. 189-208, 2021.

YAMADA, A. L. M. Efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas (PRP) e células tronco mesenquimais na reparação de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos. 2011. 145 f. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Cirurgia Veterinária/FMVZ, Unesp, Botucatu, 2011.

YANESELLI, K.; BARRACHINA, L.; REMACHA, A. R. *et al.* Effect of allogeneic platelet lysate on equine bone marrow derived mesenchymal stem cell characteristics, including immunogenic and immunomodulatory gene expression profile. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 217, p. 109944, 2019.