

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 10 (6)

December 2017

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=373&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Viabilidade de células mononucleares da medula óssea de coelhos preservadas em gelo artificial

## Viability of mononuclear stem cells from bone marrow of rabbits maintained on artificial ice

Pereira, D.P.; Eurides, D.; Alves, L.B.; Oliveira, D.A.; Souza, L.A.; Eurides, G.P.; Gonçalves, G.F.

Universidade Federal de Uberlândia

Author for correspondence: [duvaldo@ufu.br](mailto:duvaldo@ufu.br)

**Resumo.** Objetivou-se avaliar a viabilidade de células mononucleares da medula óssea de oito coelhos adultos, machos, da raça nova Zelândia, após a coleta e isolamento e preservadas caixa de isopor com placas de gelo-gel artificial, no momento inicial zero e decorrido 30, 60 e 90 minutos. Depois de mantidas em gelo-gel artificial, as células viáveis e as inviáveis foram somadas para calcular a taxa de viabilidade para cada período pré-estabelecido. As células mononucleares da medula óssea de coelhos quando em caixa térmica com gelo artificial, ocorre decréscimo de células viáveis depois de 30 minutos de 3,69% ( $0,10 \times 10^6$ ), entre 30 e 60 de 7,06% ( $0,32 \times 10^6$ ) e de 60 e 90 minutos 13,57% ( $0,18 \times 10^6$ ), com perda total de 46,29% ( $0,61 \times 10^6$ ).

**Palavras-chaves:** Preservação Celular. Terapia Celular. Azul de Tripán. *Oryctolagus cuniculus*.

**Abstract.** This study aimed to assess the feasibility of bone marrow mononuclear cells from eight adult rabbits, male, race new Zealand, after collection and isolation on initial zero and passed 30, 60 and 90 minutes. Cells were maintained in polystyrene boxes with gel ice and artificial viable and unviable were summed to calculate the rate of viability for each pre-set. Mononuclear cells from bone marrow of rabbits in cooler with ice artificial occurs decrease in viable cells after 30 (3.69%), between 30 and 60 (7.06%) and between 60 and 90 minutes (13.57%), with total loss of 46.29%.

**Keywords:** Cell Preservation. Cellular therapy. Stem Cell, Trypan Blue. *Oryctolagus cuniculus*.

### Introdução

O maior desafio da manipulação celular é a preservação das características funcionais e a manutenção da viabilidade. Dificuldades podem estar relacionadas ao processo de isolamento celular, reduzindo assim as taxas de rendimento, bem como a viabilidade das células mononucleares (Olsson et al., 2009).

Foram descritas técnicas de isolamento, cultura, expansão e manipulação de células mononucleares para tratamentos de doenças hematopoiéticas e osteogênese imperfeitas (Baksh et al., 2004). Portanto, a medicina regenerativa apresenta como instrumento

terapêutico no tratamento de doenças degenerativas (Kassem et al., 2004).

Ensaio da viabilidade de células mononucleares são baseados na atividade metabólica e integridade da membrana celular e a identificação e exclusão de células mortas foram realizadas com marcação com azul de tripan (Cell, 2003). Entretanto, vários fatores atuam sobre a viabilidade das células da medula óssea como a ausência de padronização de protocolo de criopreservação, que permite a manutenção da viabilidade celular (Silva, 2007). Foi verificado a proliferação de células mononucleares do ligamento periodontal humano criopreservadas durante 45 dias em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e em nitrogênio líquido a -

196°C. Ambos os protocolos foram eficazes, porém, a criopreservação em nitrogênio líquido manteve maior taxa de proliferação celular em todos os intervalos (Soares et al., 2012).

Objetivou-se avaliar a viabilidade de células mononucleares da medula óssea de coelhos, preservadas em caixa térmica com gelo artificial, no momento inicial zero e decorrido 30, 60 e 90 minutos.

## Material e métodos

### Colheita da medula óssea

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, análise final nº 050/11 e protocolo CEUA/UFU 003/11. Utilizou-se oito coelhos hígidos, machos, com idade de 12 a 15 meses, da raça Nova Zelândia, com peso entre 3,0kg e 4,5kg, para coleta de medula óssea e obtenção de células mononucleares. Os animais permaneceram em jejum hídrico e sólido por um período de duas e quatro horas, respectivamente. Em seguida submetidos à associação anestésica

com o cloridrato de cetamina (Cetamin. Syntec. Patrocínio Paulista, SP, Brasil), (30,0mg/kg, IM) e cloridrato de xilazina (Kensol, König, Patrocínio Paulista, SP, Brasil), (5,0mg/kg, IM). A pele da região escapulo-umeral foi tricotomizada e realizada antisepsia com álcool 70% e polivinilpirrolidona (Riodine, Rioquímica, São Jose do Rio Preto, SP, Brasil).

Com o animal em decúbito lateral esquerdo e com flexão da articulação escapulo-umeral introduziu-se uma agulha de Rosenthal, previamente com solução estéril de heparina (5000 UI/mL), (Liquemine. Roche, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.), na região do tubérculo umeral por meio de movimentos rotacionais. Após penetração no espaço medular do úmero, aspirou-se 2,0mL da medula óssea com seringa de 5,0mL contendo 0,1mL de heparina. Durante a punção foram feitos movimentos lentos com a seringa para homogeneização das amostras com a solução de heparina e evitar a formação de coágulos (Eurides 2010), (Figura 1).

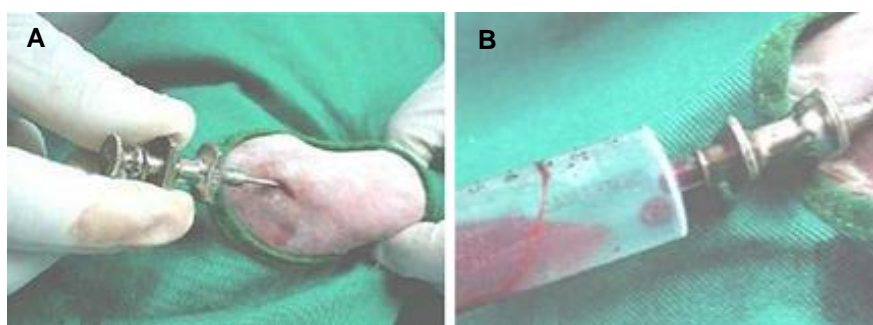


Figura 1. Inserção da agulha de Rosenthal no tubérculo umeral de coelho (A) e aspiração da medula óssea com seringa (B).

Para isolamento e rendimento das células mononucleares utilizou-se o protocolo descrito por Oliveira (2008), Souza (2009) e Alves (2011). Os animais foram avaliados, diariamente, durante sete dias quanto a alterações locais de locomoção. Em capela de fluxo laminar colocou-se os aspirados de medula óssea individualmente em tubos estéreis de 15,0mL tipo Falcon (CRAL, Cotia, SP, Brasil) e dissolvidos em solução salina tamponada de Dulbecco (DPBS). Diluiu-se a solução volume a volume (v/v), 2,0mL da amostra em 2,0mL de solução salina tamponada de Dulbecco's (DPBS). A solução foi adicionada com pipeta de Pasteur sobre 2,0mL de solução Ficoll-Hypaque Plus na densidade 1,077g/mL em outro tubo Falcon, para separação das células mononucleares, formando uma segunda solução.

### Determinação do rendimento e da viabilidade das células mononucleares

A solução foi adicionada com pipeta de Pasteur sobre 2,0mL de solução Ficoll-Hypaque Plus na densidade 1,077g/mL em outro tubo Falcon, para

separação das células mononucleares, formando uma segunda solução. Depois de centrifugação a 495G durante 30 minutos e resfriada a 15°C, cada amostra foi separada em quatro porções distintas dentro do tubo. Na superfície da solução identificou-se o plasma, logo abaixo a nuvem celular composta pelas células mononucleares, em seguida o Ficoll-Hypaque e por último as células que compõe a parte vermelha do sangue. Removeu-se o sobrenadante composto pelo plasma e a nuvem celular formada sobre a solução de Ficoll-Hypaque que foi coletada com pipeta Pasteur, e transferida para outro tubo estéril de 15,0mL. O sedimento celular foi lavado por duas vezes com 10,0mL de DPBS a 385G durante 10 minutos a 4°C, para remoção de restos de plasma.

Após desprezar o sobrenadante, foi adicionado a amostra 1,0mL de tampão de lise de eritrócitos contendo cloreto de amônio 0,16M e Tris 0,17M, com pH 7,6 durante cinco minutos à temperatura ambiente. Realizou-se outra lavagem com a adição de 10,0mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, São

Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (BFS. Invitrogen, São Paulo, Brasil), que foi posteriormente desprezado, permanecendo aderido no fundo do tubo apenas o aglomerado celular. Adicionou-se ao sedimento celular a quantidade necessária do meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, até que a amostra atingiu o volume total de 500 $\mu$ l.

#### *Células mononucleares preservadas em gelo artificial*

Duas placas de gelo artificial em gel (Tech gel. Cibragel, São Bernardo do Campo, SP. Brasil) de 500mL foram colocadas no freezer por 30 horas até o congelamento e as amostras foram mantidas em uma caixa térmica de isopor com área útil de 10,7cm x 19,5cm x 14,2cm (2,92m<sup>3</sup>), com as placas de gelo para análise da viabilidade no momento inicial zero e depois de 30, 60 e 90 minutos. A temperatura no interior da caixa térmica foi aferida com termômetro de máxima e mínima em cada momento analisado.

Da amostra de cada coelho foram retiradas três alíquotas de 10 $\mu$ l da suspensão e adicionada a 10 $\mu$ l do corante azul de tripan em cada tubo de Eppendorf para contagem das células em câmara hemocitométrica de Neubauer. A contagem de células viáveis e não viáveis foi realizada sob microscopia de luz, e o cálculo do número de células por mililitro foi determinado pela fórmula  $V \times FN \times FT / \#Q$ , onde  $V$  = número de células viáveis contadas;  $FN$  = fator da câmara de Neubauer ( $10^4$ );  $FT$  = fator de diluição do azul de tripan (2) e  $\#Q$  = número de quadrantes da câmara utilizados para a contagem.

A viabilidade foi determinada por técnica de exclusão vital, ou seja, das células não coradas por azul de tripan, como descrito por Freshney (2001) e Bittencourt et al., (2006). Foi aplicada a equação matemática  $V \times 100/NT$ , onde,  $V$  = células viáveis e  $NT$  = número total de células viáveis e não viáveis, contadas na câmara hemocitométrica.

Utilizou-se a análise de variância com o teste de Tukey com nível de significância de 0,05 para determinar se a variação da viabilidade em relação ao período de tempo foi estatisticamente significativa, com software estatístico SISVAR (Ferreira, 2016).

#### **Resultados e discussão**

Durante do período de observação, o método de colheita da medula óssea através do tubérculo umeral dos coelhos, não ocasionou sinais de claudicação hematoma subcutâneo e infecção óssea após a punção e aspiração medular (In et al., 2001).

Durante a colheita a formação de coágulos é considerada desfavorável, pois a agregação

plaquetária pode proporcionar o aprisionamento de células mononucleares e, conseqüentemente, ocasionar a redução no rendimento de células durante o processo de isolamento (Eurideset al., 2010). Esse procedimento foi evitado ao diluir inicialmente o sangue com heparina e PBS, o que pode ter aumentado o rendimento celular e reduzido a agregação de células vermelhas.

A técnica de diluição da medula óssea com heparina sódica e tampão DPBS foram eficientes para evitar a coagulação e no isolamento celular (Muschleret al., 1997). Supõe-se que homogeneização das amostras com o anticoagulante e o tampão impediu a formação de coágulos, influenciando positivamente no rendimento final de mononucleares da medula óssea.

O protocolo, com gradiente de densidade de Ficoll, na proporção de 2:1, centrifugação a 495g e durante 30 minutos a 15°C, foi eficaz para o isolamento, a viabilidade e o desempenho de células mononucleares de medula óssea de coelhos (Oliveira et al., 2011).

#### *Viabilidade de células mononucleares da medula óssea*

O rendimento de células mononucleares do ligamento periodontal humano foi eficaz quando criopreservadas durante 45 dias a -80°C e em nitrogênio líquido a -196°C (Soares et al., 2012). Foi verificado por Ribeiro et al. (2012), que após congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento da medula óssea de equinos preservada em solução soro fetal bovino e dimetilsulfóxido, a viabilidade média das amostras foi de 86%. Com o protocolo utilizado neste experimento de isolamento de células mononucleares de coelhos mantidas em refrigeração com gelo artificial, notou-se decréscimo da viabilidade celular de acordo com os períodos de observação. No momento inicial zero, com temperatura de 1,0°C contendo  $1,34 \times 10^6$  células, a taxa de viabilidade média entre as amostras foi de 95,8%. Verificou-se que aos 30 minutos a 1,3°C total de  $1,27 \times 10^6$ , a viabilidade foi de 92,11%, aos 60 minutos a 1,3°C com  $1,00 \times 10^6$  passou a ser de 85,05%, sendo que aos 90 minutos a 1,5°C foi de  $0,94 \times 10^6$  constatou-se viabilidade de 71,48% (Tabela 1).

Observou-se acentuada queda na taxa de viabilidade em um coelho com perda de 46% durante o período de 90 minutos de avaliação. O que pode ser devido à manipulação da colheita da medula óssea ou durante as avaliações da viabilidade.

Tabela 1. Avaliação da viabilidade (%) das células (Cels.) mononucleares da medula óssea de coelhos da raça Nova Zelândia preservadas em caixa térmica com gelo artificial em diferentes temperaturas, no momento inicial (zero) e aos 30, 60 e 90 minutos.

Amostras	MOMENTOS							
	0' (1°C)		30' (1,3°C)		60' (1,3°C)		90' (1,5°C)	
	N <sup>o</sup> Cels.	Viabilidade	N <sup>o</sup> Cels.	Viabilidade	N <sup>o</sup> Cels.	Viabilidade	N <sup>o</sup> Cels.	Viabilidade
1	1,83 x 10 <sup>6</sup>	94,09	2,20 x 10 <sup>6</sup>	87,88	0,45 x 10 <sup>6</sup>	68,25	0,34 x 10 <sup>6</sup>	47,80
2	1,16 x 10 <sup>6</sup>	92,55	0,91 x 10 <sup>6</sup>	88,10	0,84 x 10 <sup>6</sup>	87,82	0,66 x 10 <sup>6</sup>	82,54
3	2,05 x 10 <sup>6</sup>	94,74	1,11 x 10 <sup>6</sup>	90,54	0,94 x 10 <sup>6</sup>	85,13	1,05 x 10 <sup>6</sup>	62,78
4	0,45 x 10 <sup>6</sup>	100	0,46 x 10 <sup>6</sup>	98,19	0,46 x 10 <sup>6</sup>	88,57	0,37 x 10 <sup>6</sup>	72,89
5	0,54 x 10 <sup>6</sup>	98,78	0,54 x 10 <sup>6</sup>	96,35	0,55 x 10 <sup>6</sup>	91,21	0,53 x 10 <sup>6</sup>	79,87
6	1,92 x 10 <sup>6</sup>	95,49	1,79 x 10 <sup>6</sup>	93,14	1,86 x 10 <sup>6</sup>	88,90	1,85 x 10 <sup>6</sup>	80,29
7	0,67 x 10 <sup>6</sup>	93,78	0,82 x 10 <sup>6</sup>	89,47	0,78 x 10 <sup>6</sup>	84,47	0,76 x 10 <sup>6</sup>	77,68
8	2,11 x 10 <sup>6</sup>	96,93	2,39 x 10 <sup>6</sup>	93,17	2,14 x 10 <sup>6</sup>	86,08	1,97 x 10 <sup>6</sup>	67,96
MÉDIA	1,34 x 10 <sup>6</sup>	95,80a	1,27 x 10 <sup>6</sup>	92,11a	1,00 x 10 <sup>6</sup>	85,05b	0,94 x 10 <sup>6</sup>	71,48c

A manutenção das amostras em caixas térmicas de isopor em gelo artificial ocasionou diminuição expressiva na taxa de viabilidade das células mononucleares. Já no momento zero na temperatura de 1,0°C constatou-se a viabilidade média de 95,8%, 1,34 x 10<sup>6</sup> células. Possivelmente, foi devido ao manuseio das células no processamento laboratorial e mudança da temperatura durante os períodos de avaliações. Aos 30 minutos a 1,3°C, a taxa de viabilidade celular média apresentou em 92,11%, 1,27 x 10<sup>6</sup> células.

Por meio da análise de variância das médias de viabilidade nos períodos pré-estabelecidos verificou-se que entre os intervalos zero e 30 minutos, não ocorreu perca significativa da viabilidade. Entretanto, decorrido de 30, 60 e 90 minutos a diminuição da viabilidade foi constante e intensa (Tabela 1). Apesar da redução da

viabilidade das células mononucleares não se observou diferença significativa entre o momento zero e trinta minutos. Já aos 60 minutos a 1,3°C, o percentual de viabilidade média foi de 85,05%, do total de 1,00 x 10<sup>6</sup> células, sendo que a redução foi significativa em relação aos 30 minutos. Entretanto, no período de observação de 90 minutos a 1,5°C, a percentagem de viabilidade média foi de 71,49%, do total de 0,94 x 10<sup>6</sup> células, relação significativa, em relação ao momento 60 minutos, com diminuição expressiva em relação ao período inicial. Portanto, com decréscimo intenso da viabilidade entre os momentos analisados.

Notou-se aumento do número de células inviáveis e declínio das células viáveis e a redução total da contagem celular para cada período analisado (Figura 2).

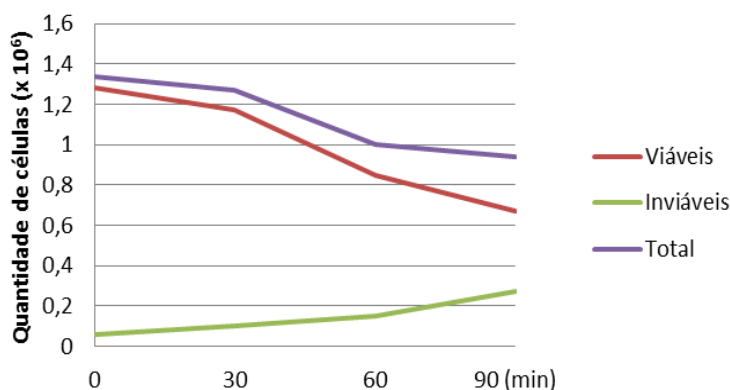


Figura 2. Comportamento das células mononucleares da medula óssea de coelhos aos 90 minutos de avaliação.

A redução da viabilidade foi significativa, sendo de 95,78% para 71,49% no período de 90 minutos de observação. A diferença da taxa de viabilidade entre os momentos analisados decresceu progressivamente, conforme observado na tabela 2.

A temperatura no interior da caixa não apresentou alterações estatisticamente significativas o que possivelmente não foi o fator relevante na queda da viabilidade. Com diferentes protocolos de isolamento das células mononucleares observou-se em equinos a média de viabilidade de 86,9% (Alves et al., 2009) de 86% (Ribeiro et al., 2012) e em coelhos da raça Nova Zelândia foi obtida 93,56%

(Oliveira, 2008), 91,00% (Souza, 2009) e 96,0% (Perin et al., 2003). Resultados coincidentes aos obtidos neste trabalho no momento inicial. Entretanto, não foram verificadas citações sobre a viabilidade de células mononucleares preservadas em caixa de isopor com gelo artificial, em relação ao período de observação 30, 60 e 90 minutos.

A viabilidade foi determinada por técnica de exclusão vital, coradas com azul de tripan no momento zero (Figura 3) e notou-se aumento de células coradas com aos 90 minutos de exposição ao resfriamento (Figura 4).

Tabela 2. Declínio da taxa de viabilidade (%) das células mononucleares da medula óssea de coelhos da raça Nova Zelândia preservadas em caixa térmica com gelo artificial, entre os momentos pré-estabelecidos.

Momentos	Declínio da viabilidade (%)	Número de células (x 10 <sup>6</sup> )
0 a 30 minutos	3,69	0,11
30 a 60 minutos	7,06	0,32
60 a 90 minutos	13,57	0,18



Figura 3. Células mononucleares da medula óssea de coelhos da raça Nova Zelândia obtidas no momento inicial (zero). Notar a presença de células inviáveis corada com azul de tripan (seta branca) e viável (seta preta).

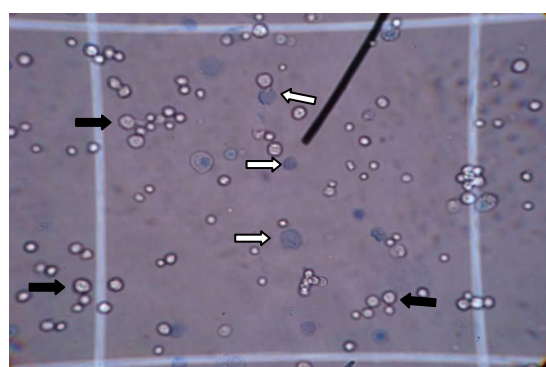


Figura 4. Células mononucleares da medula óssea de coelhos da raça Nova Zelândia obtidas decorrido 90 minutos em caixa térmica com gelo artificial. Observar a presença de célula inviável (seta branca) e viável (seta preta).

Durante 90 minutos de manutenção em gelo-gel ocorreu redução progressiva da viabilidade celular. A temperatura no interior da caixa apresentou pouca variação, aumentado 0,5°C após 90 minutos. Demonstrando-se que as células mononucleares perderam viabilidade, mesmo com um método de preservação com pouca alteração da

temperatura. A taxa de viabilidade foi reduzida em decorrência da permanência das células fora da medula óssea dos coelhos. No entanto, existe a possibilidade da redução ter sido também devido à manipulação dos tubos de Eppendorf em cada período analisado.

Foi verificada redução progressiva da viabilidade celular durante 90 minutos de manutenção em gelo-gel. A temperatura no interior da caixa apresentou pouca variação, aumentado 0,5°C após 90 minutos. Demonstrando-se que as células mononucleares perderam viabilidade, mesmo com um método de preservação com pouca alteração da temperatura. A taxa de viabilidade foi reduzida em decorrência da permanência das células fora da medula óssea dos coelhos. No entanto, existe a possibilidade da redução ter sido também devido à manipulação dos tubos de Eppendorf em cada período analisado.

### Conclusão

As células mononucleares da medula óssea de coelhos, quando preservadas em caixa térmica com placas de gelo-gel artificial, ocorre decréscimo de células viáveis depois de 30 minutos de 3,69% ( $0,10 \times 10^6$ ), entre 30 e 60 de 7,06% ( $0,32 \times 10^6$ ) e entre 60 e 90 minutos 13,57% ( $0,18 \times 10^6$ ), com perda total de 46,29% ( $0,61 \times 10^6$ ).

### Referências

ALVES, B.A. Enxerto osteocondral alógeno associado à inoculação de células mononucleares da medula óssea e dexametasona no reparo da tróclea de coelhos. Dissertação (Saúde Animal). 2011, 52f. Disponível em: <http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/1759/1/EnxertoOsteocondralAlogeno.pdf> Acessado em: 20 jul 2016.

ALVES, A.L.G., VIEIRA, M.E.M., BARREIRA, A.P.B., MOTA, L.S.L.S., SAITO, M.E., KOHAYAGAWA, A., HUSSNI, C.A., WATANABE, M.J., OLIVEIRA, P.G.G. Protocolo de isolamento de células mononucleares da medula óssea de equinos. *Veterinária e Zootecnia*, 16(4):650-655, 2009.

BAKSH D.; SONG L., TUAN, R.S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal Cellular Molecular Medicine*, 8(3):301-316.

IM, G.I., KIM D.Y., SHIN, J.H., HYUN, C.W., CHO, W.H. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 83(2):289-294, 2001.

EURIDES, D., OLIVEIRA, B.J.N.A., SOUZA, L.A., SILVA, L.A.F., DALECK, C.R., FREITAS, P.M.C. Obtenção de células mononucleares da medula óssea pela punção do tubérculo umeral de coelhos. *Ars Veterinária*, 26:71-76, 2010.

FERREIRA, D.R. SISVAR software estatístico. Ciências Exatas da Universidade Federal de Lavras. Disponível:

<http://www.ppgest.ufscar.br/documentos/rt/rt27.pdf>. Acessado: 20 jul 2016.

KASSEM M., KRISTIANSEN M., ABDALLAH B.M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 95(5):209-214, 2004.

MUSCHLER, G.V., BOEHM, C., EASLEY K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *Journal Bone Joint Surgery American*. Am. 79(11):1699-1709, 1997.

OLSSON, D.C., PIPPI, N.L., MARTINS, D.B., TOGNOLI, G.K., SANTOS JÚNIOR, E.B., MULLER, D.C., LOPES S.T.A., MARCONATO, F., MÖRCHBÄCHER, P.D., TEIXEIRA, L.V. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. *Ciência Rural*, 39(1):141-147, 2009.

OLIVEIRA, B.J.N.A. Enxerto osteocondral alógeno, associado a inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo de sulco troclear de coelhos. 2008. 198p. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

OLIVEIRA, B.J.N.A., SOUZA, L.A., EURIDES, D., SILVA, L.A.F., BAUNGARTEN, L.B., BUSNARD, C.A. Aislamiento, viabilidad y rendimiento de células mononucleares de médula óssea de conejos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 45(1):113-118, 2011.

PERIN, E.C., DOHMANN, H.F.R., BOROJEVIC, R., SILVA, S.S., SOUSA, A.L.S., MESQUITA, C.T., ROSSI M.I.D.; CARVALHO, A.C., DUTRA, H.S., DOHMANN, H.J.F., SILVA, G.V., BELÉM, L., VIVACQUA, R., RANGEL, F.O.D., ESPORCATTE, R.E., GENG, Y.J., VAUGHN, W.K., ASSAD, J.A.R., MESQUITA, E.T.; WILLERSON, J.T. Transendocardial, autologous bone cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, 107:2294-2302, 2003.

RIBEIRO, G., MASSOCO, C.O., NETO, J.C.L. Viabilidade celular da fração mononuclear da medula óssea e fração vascular estromal do tecido adiposo de equinos após o processo de congelamento e descongelamento. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32:118-124, 2012.

ROCHE APPLIED SCIENCE. 2003. Cell proliferation and viability measurement. *Biochem*. 3:26-28.

SILVA, W.F. Comparação da viabilidade das células mononucleares totais da medula óssea de suínos

sob diferentes protocolos de congelamento. 2007, 85p. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.

SOARES, D.M.,GINANI, F., BARBOZA,C.A.G.Rendimento de células mesenquimais do ligamento periodontal humano submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. *Revista Odontologia, UNESP*, 41:415-419, 2012.

SOUZA, L.A. Enxerto osteocondral alógeno, associado a inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo de sulco troclear de coelhos. 2009.82p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG.