



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIAS**

**CÉLULAS MADRE COMO ADITIVO PARA EL AUMENTO DE VIABILIDAD DE
CONCENTRADOS SANGUINEOS CANINOS EN TRANSFUSIONES**

LUIS ALBERTO BELTRÁN MÁRMOL

Foz de Iguaçu, Estado de Paraná
2023

**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIAS**

**CÉLULAS MADRE COMO ADITIVO PARA EL AUMENTO DE VIABILIDAD DE
CONCENTRADOS SANGUÍNEOS CANINOS PARA TRANSFUSIONES**

LUIS ALBERTO BELTRÁN MÁRMOL

Disertación de maestría presentada al Programa de Posgraduación en Biociencias, del Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza, de la Universidad Federal de Integración Latino-Americana, como requisito parcial a la obtención del título de Mestre en Ciencias.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz

Coorientadora: Msc. Roberta Tognareli Ruiz

Foz do Iguaçu, Estado de Paraná
2023

LUIS ALBERTO BELTRÁN MÁRMOL

**CÉLULAS MADRE COMO ADITIVO PARA EL AUMENTO DE VIABILIDAD DE
CONCENTRADOS SANGUÍNEOS CANINOS PARA TRANSFUSIONES**

Disertación de maestría presentada al Programa de Posgraduación en Biociencias, del Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza, de la Universidad Federal de Integración Latino-Americana, como requisito parcial a la obtención del título de Mestre en Ciencias.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Jorge Luis María Ruiz
Orientador(a)
UNILA

Dr. Kelvinson Fernandes Viana
Examinador(a)
UNILA

Dr. Fernando Cezar dos Santos
Examinador(a)
UNILA

Foz do Iguaçu, Estado de Paraná, 31 de agosto de 2023

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

B453

Beltrán Mármol, Luis Alberto.

Células madre como aditivo para el aumento de viabilidad de concentrados sanguíneos caninos en transfusiones / Luis Alberto Beltrán Mármol. - Foz do Iguaçu, 2023.

44 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e Natureza. Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu-PR.

Orientador: Dr. Jorge Luis María Ruiz.

Coorientador: Msc. Roberta Tognarel.

1. Eritrocitos. 2. Células-tronco - animais. 3. CPDA-1. 4. Sangue. 5. Hemoglobina. I. Ruiz, Jorge Luis María. II. Tognarel, Roberta. III. Título.

CDU 602.9:59

AGRADECIMIENTO

Este trabajo cuenta con el apoyo de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana - Brasil (UNILA), beca PROBIU (Programa de Bolsa Institucional).

MÁRMOL, Luis Alberto Beltrán. 2023. **Células madre como aditivo para el aumento de viabilidad de concentrados sanguíneos caninos para transfusiones**. Asesores: RUIZ, Jorge Luis Maria (asesor); RUIZ, Roberta Tognareli (co-asesora). 44 h. Disertación (Maestría) - PPG-BC (Programa de Postgrado en Biociencias), UNILA (Universidad Federal de la Integración Latinoamericana), Foz do Iguazú.

RESUMEN

Durante el almacenamiento de la sangre en los bancos de sangre, los glóbulos rojos se encuentran en una condición “artificial”, la que conlleva a variaciones metabólicas y mecánicas que resultan en una disminución de la capacidad de entrega de oxígeno. En algunos estudios se ha demostrado que células madre mesenquimales (MSCs) pueden rescatar casos de anemia y reconstituir la hematopoyesis. También se ha demostrado su alta capacidad de regulación celular en el ambiente en el que están inmersas; basándonos en estos datos y considerando las funciones de las MSCs; usamos MSCs como aditivo en una relación 1000:1 en concentrados sanguíneos caninos para evaluar si logran disminuir el daño que sufren los glóbulos rojos durante el almacenamiento; al final de este estudio observamos que no se encontró evidencia que en esa proporción hubo variación en cuanto a la vida media de los glóbulos rojos. Sin embargo, logramos aislar, expandir y congelar MSCs a partir de tejido adiposo canino, así como validarlas.

Palabras clave: eritrocitos; células madre mesenquimales (MSCs); CPDA-1; sangre; hemoglobina.

MÁRMOL, Luis Alberto Beltrán. 2023. **Células-tronco como aditivo para aumentar a viabilidade de concentrados de sangue canino para transfusões**. Orientadores: RUIZ, Jorge Luis Maria (*orientador*); RUIZ, Roberta Tognareli (*coorientadora*). 44 f. *Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.*

RESUMO

Durante o armazenamento do sangue nos bancos de sangue, as hemácias ficam em condição “artificial”, o que leva a variações metabólicas e mecânicas que resultam na diminuição da capacidade de fornecimento de oxigênio. Em alguns estudos foi demonstrado que as células-tronco mesenquimais (CTMs) podem resgatar casos de anemia e reconstituir a hematopoiese. Também foi demonstrada sua alta capacidade de regulação celular no ambiente em que estão imersos; com base nestes dados e considerando as funções dos MSCs; utilizamos MSCs como aditivo na proporção de 1000:1 em concentrados de sangue canino para avaliar se reduzem os danos sofridos pelas hemácias durante o armazenamento; ao final deste estudo observamos que não foram encontradas evidências de que nesta proporção houvesse variação na meia-vida das hemácias. No entanto, conseguimos isolar, expandir e congelar MSCs do tecido adiposo canino, bem como validá-las.

Palavras-chave: eritrócitos; células-tronco mesenquimais (MCSs); CPDA-1; sangue; hemoglobina.

MÁRMOL, Luis Alberto Beltrán. 2023. ***Stem cells as an additive to increase the viability of canine blood concentrates for transfusions***. Advisors: RUIZ, Jorge Luis Maria (advisor); RUIZ, Roberta Tognareli (co-advisor). 44 s. *Master's thesis (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu.*

ABSTRACT

During blood storage in blood banks, red blood cells are in an "artificial" condition, which leads to metabolic and mechanical variations that result in decreased oxygen delivery capacity. In some studies, it has been shown that mesenchymal stem cells (MSCs) can rescue cases of anemia and reconstitute hematopoiesis. Their high capacity for cellular regulation in the environment in which they are immersed has also been demonstrated; based on these data and considering the functions of MSCs; we used MSCs as an additive in a 1000:1 ratio in canine blood concentrates to evaluate if they reduce the damage suffered by red blood cells during storage; At the end of this study we observed that no evidence was found that in this proportion there was variation in terms of the half-life of red blood cells. However, we were able to isolate, expand and freeze MSCs from canine adipose tissue as well as validate them.

Keywords: *red blood cells; Mesenchymal Stem Cells (MSCs); CPDA-1; blood; hemoglobin.*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de disociación de la oxihemoglobina.....	13
Figura 2. Frotis sanguíneo normal.....	14
Figura 3. Formación de células sanguíneas a partir de una célula precursora hematopoyética pluripotencial (PHSC).....	15
Figura 4. Génesis de los eritrocitos.....	16
Figura 5. Mecanismo eritropoyetico para regulación de eritrocitos.....	17
Figura 6. Diagrama de flujo de separación de sangre fresca canina en diferentes componentes.....	19
Figura 7. Soluciones preservativas anticoagulantes (APS) y soluciones aditivas (AS) para concentrados sanguíneos caninos disponibles comercialmente asociadas a el tiempo de vida.....	20
Figura 8. Anemias clasificadas según la intensidad de la eritropoyesis.....	22
Figura 9. Diagrama de flujo para la clasificación de eritrocitosis.....	23
Figura 10. Diferenciación in vitro de MSCs.....	24
Figura 11. Muestra de tejido adiposo.....	27
Figura 12. Lavado, transferencia y fragmentación de las muestras de tejido adiposo.....	28
Figura 13. Tejido fraccionado junto con colagenasa I.....	28
Figura 14. Tubo después del proceso de centrifugación.....	29
Figura 15. Plaquetamiento de células en frascos de cultivo.....	30
Figura 16. Verificación de adherencia de células.....	30
Figura 17. Células aisladas del tejido adiposo (posibles MSCs) vistas en microscopio invertido a 4X, en diferentes días después de ser cultivadas.....	32
Figura 18. Adipogénesis.....	33
Figura 19. Osteogenesis.....	33
Figura 20. Condrogenesis.....	34
Figura 21. Marcación por inmunofluorescencia de MSCs.....	34
Figura 22. Resultados estadísticos de las muestras analizadas de RBCs almacenados con o sin MSCs a 4 ± 2 °C.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura del sistema de grupos sanguíneos caninos.....	18
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AS	Solución aditiva
ASP	Solución preservativa-anticoagulante
CO ₂	Dióxido de carbono
CPDA-1	Citrato-fosfato-dextrosa-adenina 1
DEA	Sistema de antígenos eritrocitarios de perros
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EBV	Volumen de sangre estimado
fL	Femtolitros
H ₂ CO ₃	Ácido carbónico
H ₂ CO ₃ ⁻	Ion bicarbonato
Hb	Hemoglobina
HSCs	Células madre hematopoyéticas
MSCs	Células madre mesenquimales
O ₂	Oxígeno
OEC	Curva de equilibrio de oxígeno
pg	Picogramos
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampón fosfato salino)
RBCs	Red blood cell

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCION	12
1.1 Eritrocitos	12
1.1.1 Descripción de los eritrocitos y su importancia en el transporte de oxígeno.....	12
1.1.2. Informaciones generales de los Eritrocitos.....	13
1.1.3. Desarrollo embrionario y pós-embrionario de los eritrocitos.....	14
1.1.4 Regulación de la producción de eritrocitos.....	16
1.2 Antígenos de glóbulos rojos y grupos sanguíneos en caninos	18
1.3 Bancos de sangre canino	19
1.3.1 Anemia.....	21
1.3.2 Eritrocitosis y Policitemia.....	23
1.4 Células madre mesenquimales	24
1.5 Justificativa	25
1.6 Pregunta norteadora	25
2 OBJETIVOS	26
2.1 General	26
2.2 Específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Concentrados sanguíneos	27
3.2 Aislamiento y caracterización de células tronco	27
3.2.1 <i>Procesamiento de muestra de tejido adiposo para aislamiento de MSCs</i>	27
3.2.2 <i>Ensayo de diferenciación</i>	29
3.2.3 Marcación por inmunofluorescencia.....	31
3.3 Delineamiento experimental de MSC como aditivo	31
3.4 Pruebas laboratoriales	31
3.5 Análisis estadístico	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Aislamiento y expansión de MSCs extraídas de tejido adiposo canino	32
4.2 Diferenciación MSCs utilizando kits de Osteogenesis, Adipogenesis y Condrogenesis	32
4.3 Resultado experimental de tratamiento de MSC como aditivo vs Control	34
5 DISCUSIÓN	36
6 CONSIDERACIONES FINALES Y FUTURAS	38
7 REFERENCIAS	39
8 APÉNDICES	44
8.1 Apéndice A – Opinión favorable del CEUA (Comité de Ética en el uso de Animales)	44

1 INTRODUCCION

1.1 Eritrocitos

1.1.1 Descripción de los eritrocitos y su importancia en el transporte de oxígeno

Los glóbulos rojos o hematíes son un componente importante en la sangre, cuya función principal es transportar hemoglobina (Hb), la cual transporta oxígeno desde los pulmones a los tejidos; otra de las funciones de los hematíes es transportar la enzima anhidrasa carbónica, la cual actúa como catalizador aumentando la reacción reversible varios miles de veces entre el dióxido de carbono (CO_2) y el agua para formar el ácido carbónico (H_2CO_3). Esta alta velocidad de la reacción es indispensable, ya que posibilita que el agua de la sangre transporte el CO_2 en forma de ion bicarbonato (HCO_3^-) desde los tejidos a los pulmones, donde es convertido nuevamente a CO_2 y es expulsado como producto de desecho del organismo a la atmósfera. La proteína hemoglobina presente en los hematíes, también actúa como amortiguador ácido-base, por lo que, los hematíes funcionan como amortiguadores del pH de la sangre completa. (GUYTON, 2011).

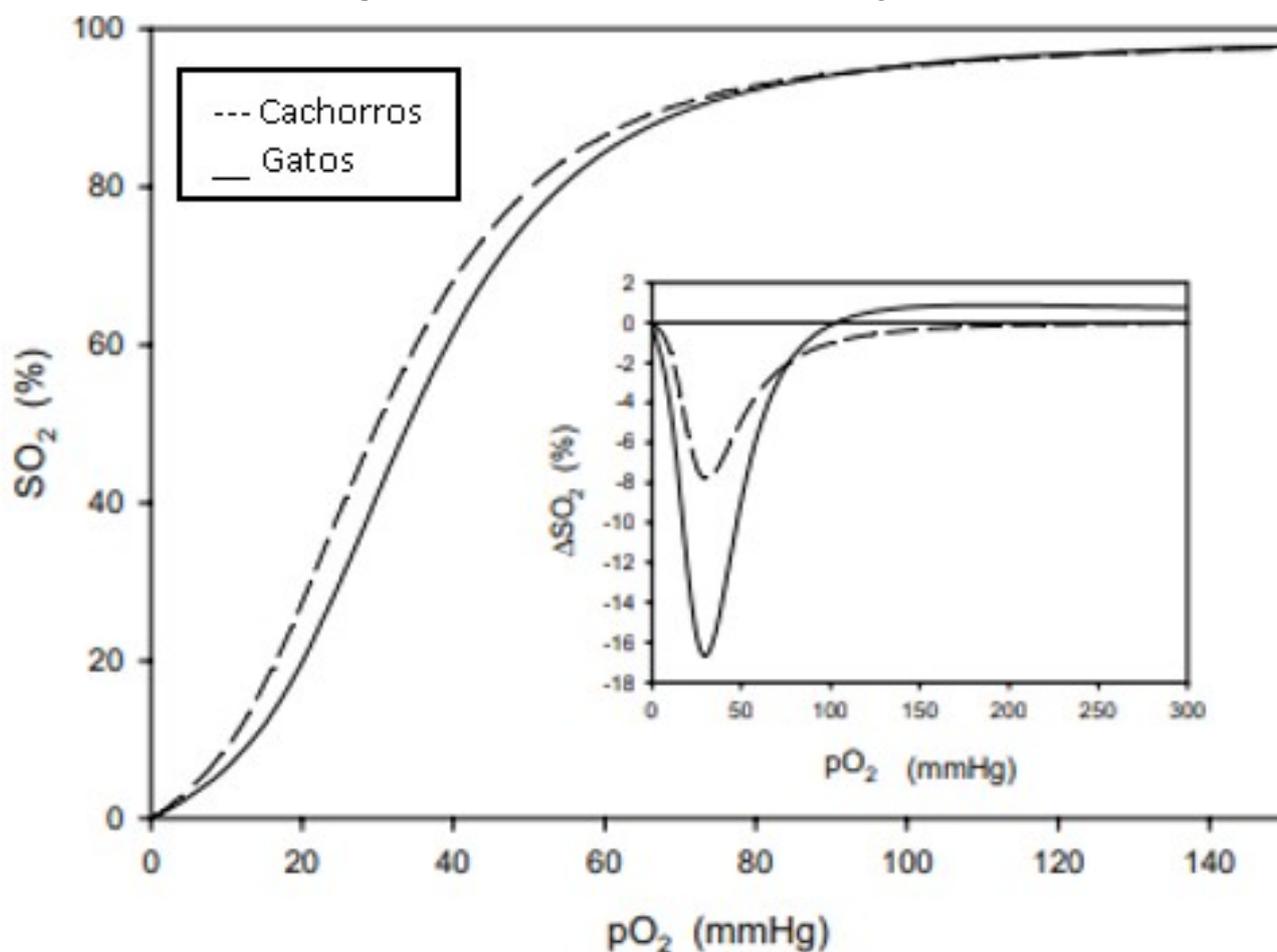
La molécula de hemoglobina es un tetrámero de 2 cadenas polipeptídicas α y 2 β . Un grupo prostético hemo que contiene hierro está enterrado en un bolsillo en cada cadena y es capaz de transportar una molécula de oxígeno por hemo (1g de Hb une 1.39 mL de O_2) (ALAYASH, 2004). El peso molecular del tetrámero de Hb es ~ 64 kDa. En desoxi-Hb (la forma que no transporta O_2), las fuerzas electrostáticas de la globina mantienen unidas las cuatro subunidades.

Esta forma también se conoce como conformación tensa (T) y tiene una afinidad relativamente baja por el O_2 . Cuando el O_2 se une al primer grupo hemo, desencadena cambios conformacionales que debilitan los puentes electrostáticos. Esto aumenta progresivamente la afinidad de la Hb por el O_2 adicional, lo que da como resultado la conformación oxiHb o relajada (R). (R. E. DICKERSON AND I. GEIS, 1983).

La afinidad de la Hb por el oxígeno (P_{50}), es una medida de la tensión del O_2 cuando los sitios de unión de la Hb están saturados en un 50%. Los valores normales de P_{50} intraeritrocitarios de la Hb es entre 28-29 mmHg (Figura 1) (CAMBIER *et al.*, 2004). Cuando la Hb está libre en solución fuera de los eritrocitos, la curva de equilibrio de oxígeno (OEC), se encuentra desplazada a la izquierda y el valor de la P_{50} disminuye a valores entre los 14-16 mmHg, descargando poco O_2 bajo condiciones fisiológicas (R. E. DICKERSON AND I. GEIS, 1983). Algunos factores adicionales como la temperatura, pH y CO_2 , pueden alterar la OEC de la Hb. Otro de los factores que afecta esta curva es el 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG); el cual es un metabolito de los eritrocitos y que afecta

directamente la unión entre el O_2 y la Hb. El 2,3-DPG tiene una carga muy negativa e interactúa electrostáticamente con algunos aminoácidos cargados positivamente dentro de las dos subunidades β en la configuración desoxi de la Hb (R. E. DICKERSON AND 1. GEIS, 1983).

Figura 1. Curva de disociación de la oxihemoglobina



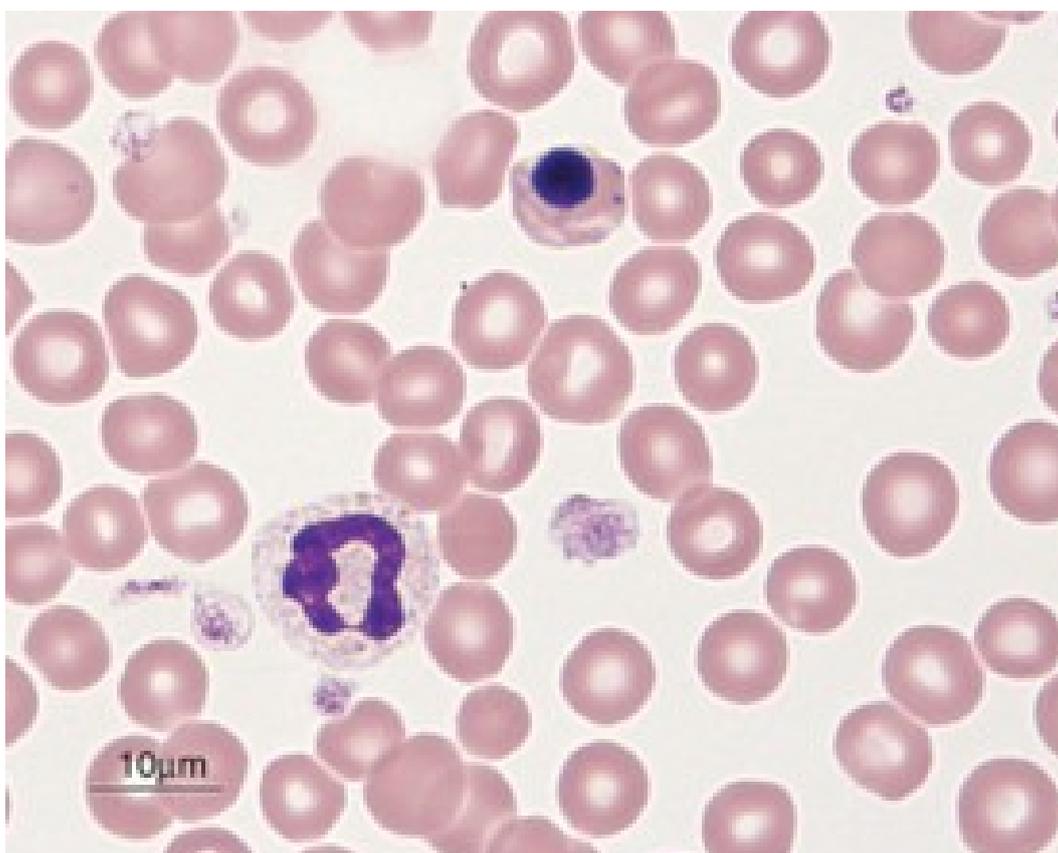
Fuente: adaptado de C. Cambier; *et al.* (2004).

1.1.2. Informaciones generales de los Eritrocitos

Así como todos los mamíferos, a excepción de los camélidos, los eritrocitos caninos normales son discos bicóncavos anucleados. En sus características fisiológicas presentan un diámetro aproximado de $7 \mu m$ y un espesor de $2 \mu m$ con volumen corpuscular medio (VCM) de 64-75 fentolitros (fL). Al ser evaluados en un extendido fino, como observado en la figura 2, hay evidencia de una zona pálida central, la cual es característica de los eritrocitos y que representa la zona bicóncava, la membrana de ambas caras en esta zona tienden a acercarse significativamente, esta morfología le

permite grandes deformaciones para pasar por los estrechos capilares, que pueden llegar a 7 μm de diámetro(MEDER; ADAGIO; LATTANZI, 2012).

Figura 2. Frotis sanguíneo normal



Fuente: Weiss, Douglas J.; *et al.*. **Schalm's veterinary hematology**. John Wiley & Sons, 2011.

En perros la concentración media de eritrocitos en sangre completa es $6,8 \cdot 10^6$ cel./ μL pudiendo tener valores normales entre $5,5-8,2 \times 10^6$ cel./ μL (DUKES, H. H.; REECE, 2017). Los valores normales de hemoglobina en sangre de caninos domésticos varían en el rango de los 12-18 gr/dL; otro aspecto importante a determinar es el hematocrito que varía entre el 37-55% con un valor promedio del 45%(MEDER; ADAGIO; LATTANZI, 2012).

1.1.3. Desarrollo embrionario y pós-embrionario de los eritrocitos

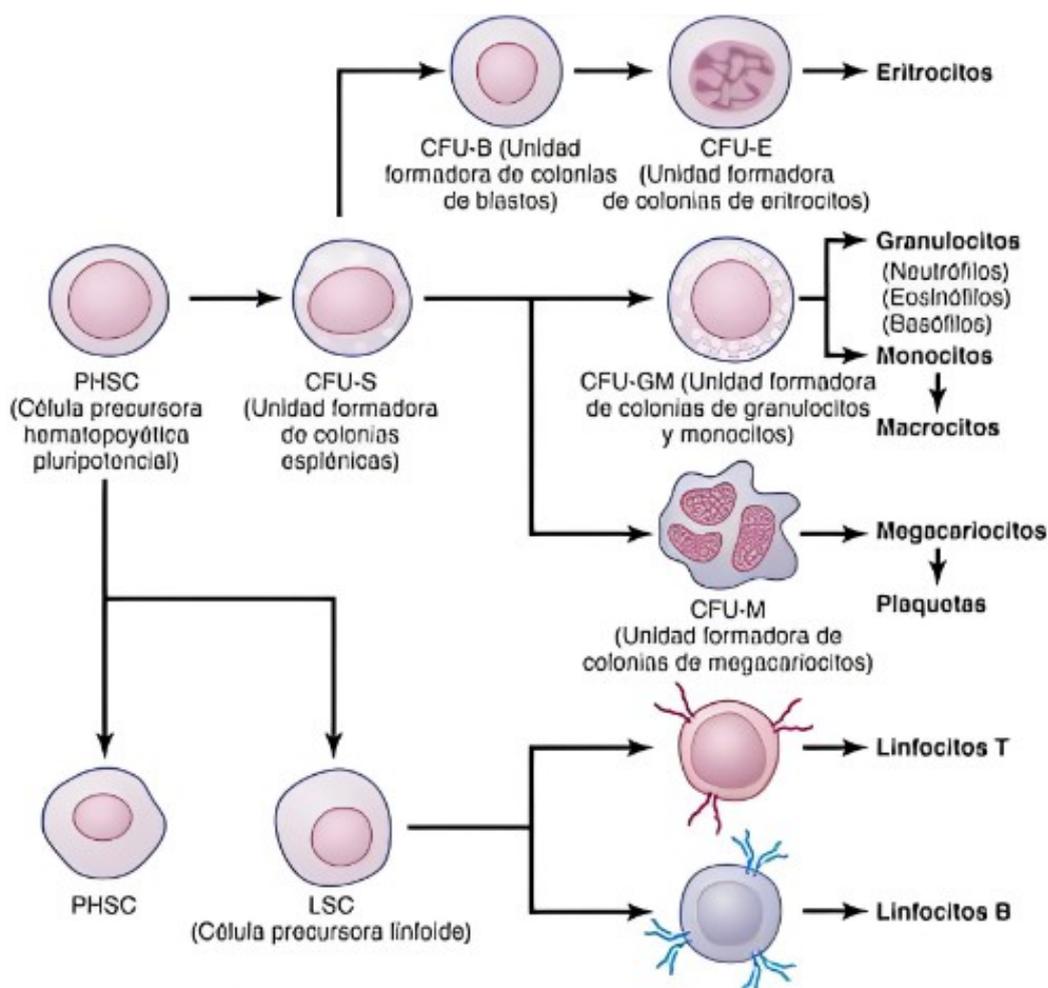
El desarrollo del sistema hematopoyético es complejo y se ha mantenido conservado en la evolución de los vertebrados; por eso, comprender el origen embrionario y fetal de la hematopoyesis provee información importante para su función en el sistema

hematopoyético adulto. Se han usado modelos animales para investigación de este proceso, rescatando información valiosa para entender cómo es su desarrollo.

Los eritrocitos son producidos en diferentes etapas del desarrollo, durante las cuales varían su morfología y función; en la etapa fetal que es la más primitiva, estas células son producidas en el saco vitelino, mientras que las células definitivas son producidas por el hígado y luego en el bazo y la médula ósea (WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011). En eritroblastos murinos primitivos se encontraron diferencias en su tamaño primitivo al compararlos con el definitivo; se encontró en células primitivas que su volumen varía de 465 a 530 femtolitros (fL) unas seis veces mayor que su tamaño definitivo, también se encontró que el contenido de hemoglobina en las células primitivas es de 80 a 100 picogramos (pg)/célula siendo seis veces mayor al encontrado en las definitivas (PALIS; YODER, 2001).

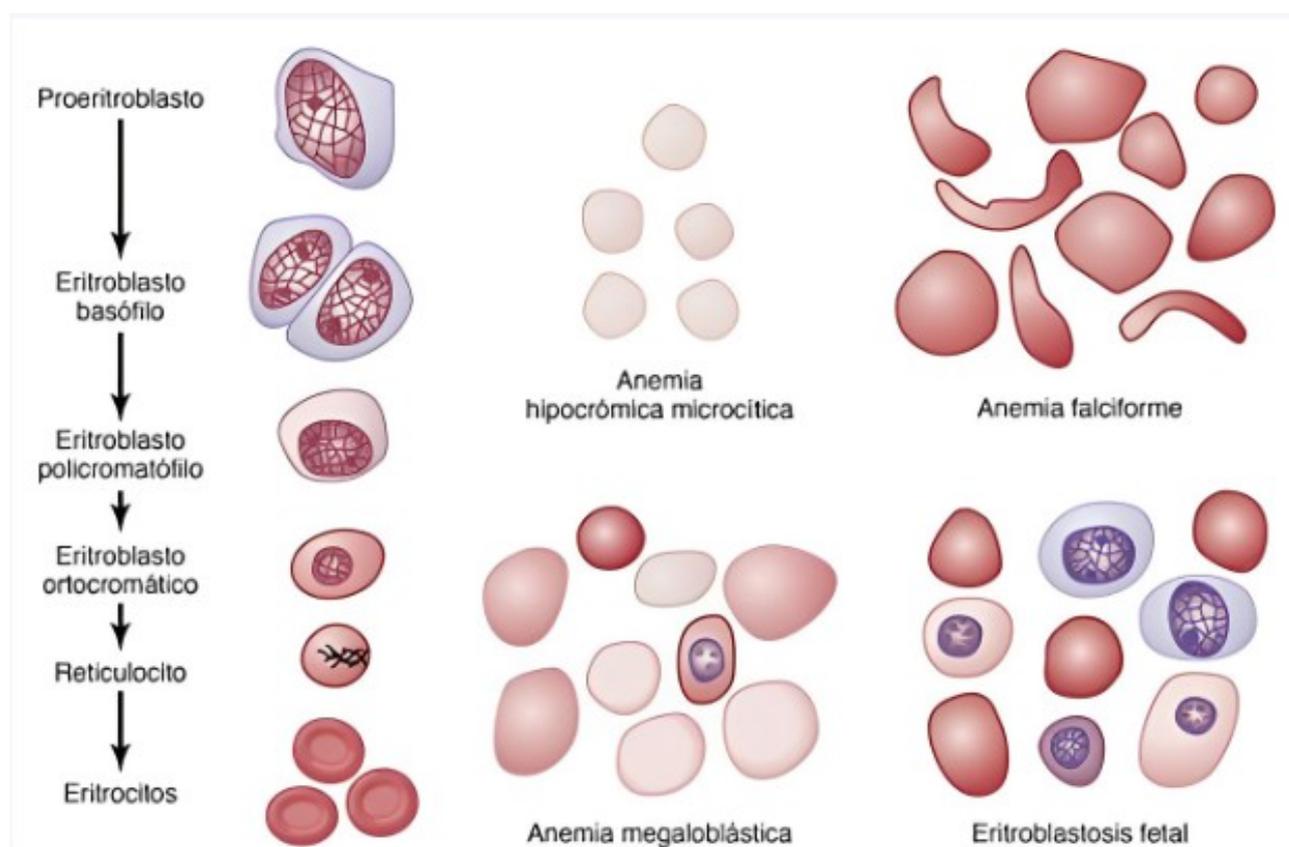
La figura 3 nos muestra como una célula precursora hematopoyética pluripotencial (PHSC) de la médula ósea da origen a diferentes linajes celulares sanguíneos.

Figura 3. Formación de células sanguíneas a partir de una célula precursora hematopoyética pluripotencial (PHSC)



En la figura 4, se observa la génesis de los eritrocitos, en ella se identifica a la primera célula de la serie eritrocitaria que es el pro-eritroblasto que bajo el estímulo adecuado se formar a partir de las células precursoras CFU-E. En las divisiones subsecuentes se van dando alteraciones morfológicas en las células que conllevan a perdida de material celular y aumento de la hemoglobina hasta alcanzar el estado de eritrocito maduro(GUYTON, 2011).

Figura 4. Génesis de los eritrocitos



Fuente: J. E. HALL; GUYTON & HALL. **Tratado de fisiología médica.** 2021, p. 415.

1.1.4 Regulación de la producción de eritrocitos

El sistema circulatorio está regulado dentro de límites estrechos, por eso, es controlada la cantidad de eritrocitos presentes en el torrente circulatorio de tal manera que se dispone de una cantidad adecuada de eritrocitos para transportar el oxígeno que necesitan los tejidos y para que esta cantidad no sobrepase una cantidad que impida el correcto flujo sanguíneo, este mecanismo es ilustrado en la figura 5 (GUYTON, 2011).

membrana de células de la mucosa del íleon y entrega la vitamina B12 que es transportada al torrente sanguíneo para ser almacenada en el hígado, el cual libera gradualmente según la necesidad (GUYTON, 2011).

1.2 Antígenos de glóbulos rojos y grupos sanguíneos en caninos

El descubrimiento del sistema de grupos ABO de los seres humanos en 1900 (TAN; GRAHAM, 2013), inició la búsqueda de los grupos sanguíneos en animales domésticos. Entre los primeros estudios en perros, los investigadores Von Dungern y Hirszfild en 1910, definieron 4 grupos sanguíneos basados en isoaglutinaciones (SWISHER; YOUNG, 1961). Tiempo después, entre 1961 y 1962, Swisher y sus colaboradores en la Universidad de Rochester, NY, en una serie de estudios describieron los antígenos A, B, C, D, E, F y G (SCOTT N. SWISHER, LAWRENCE E. YOUNG, 1962; SWISHER; YOUNG, 1961). El sistema de antígenos eritrocitarios de perros (DEA), corresponde a 4 fenotipos (DEA 1.1, 1.2, 1.3 equivalentes a Aa 1, Aa 2, Aa 3 y el nulo (SYMONS; BELL, 1991)). La tabla 1 muestra cómo ha ido variando con el tiempo la forma en que se describen los grupos sanguíneos caninos.

Tabla 1. Nomenclatura del sistema de grupos sanguíneos caninos

Grupo DEA	Clasificación "antigua"	Incidencia poblacional (%)	Presencia de anticuerpos ocurriendo de forma natural	Significancia de transfusión
1.1	A ₁	42	No	Reacción hemolítica aguda
1.2	A ₂	20	No	Reacción hemolítica aguda
3	B	6	Si	Retardada, remoción de células, sin hemolisis
4	C	98	No	Ninguna
5	D	23	Si	Retardada, remoción de células, sin hemolisis
6*	F	98-99	No	Desconocida
7	Tr	45	Si	Retardada, remoción de células, sin hemolisis
8*	He	40	No	Desconocida

Fuente: adaptado de A. S. HALE (1995).

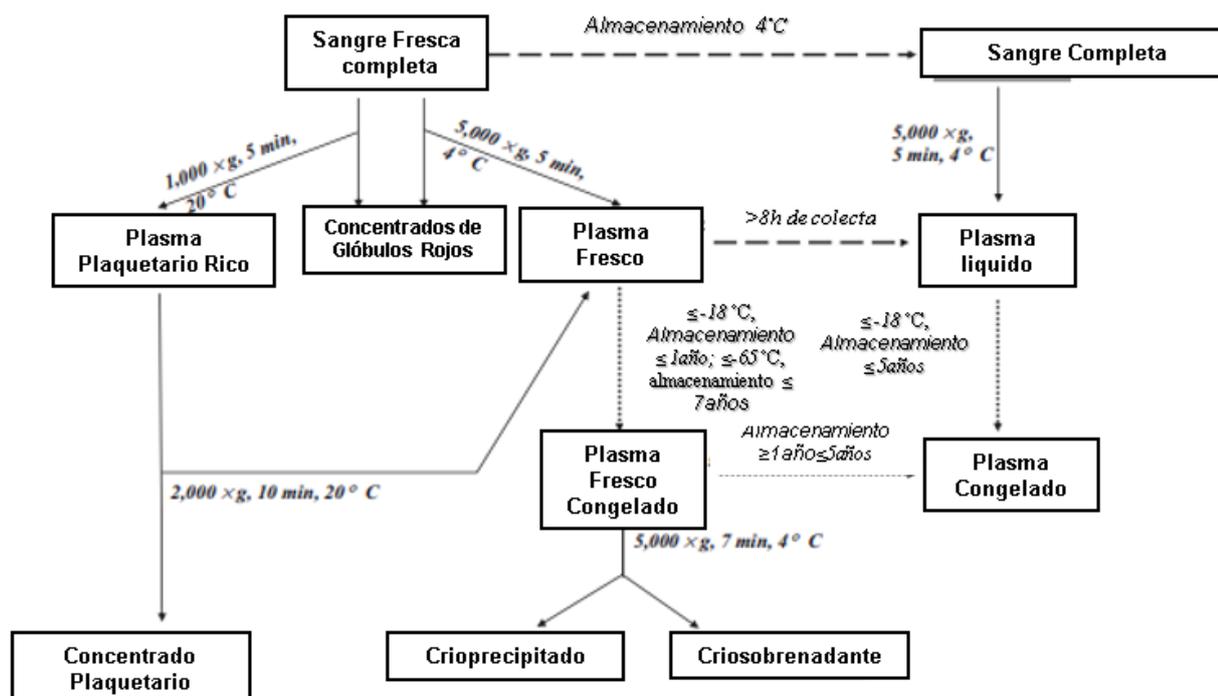
Estudios de reproducción animal sugieren un patrón de herencia autosómica dominante, siguiendo el orden g DEA 1.1, 1.2, 1.3 y nulo (COHEN, CARL; FULLER, 1953; SCOTT N. SWISHER, LAWRENCE E. YOUNG, 1962; SYMONS; BELL, 1991). individualmente los perros solo exhiben un fenotipo (WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011). En las reacciones de transfusión, el grupo A es el más importante en la práctica de

transfusión. En el caso de Anti-DEA 1.1, tiene una fuerte aglutinación y hemolisis in-vitro e in-vivo, en general en la primera transfusión, no se provocan reacciones hemolíticas, es de vital importancia para subsecuentes transfusiones, tener cuidado para no provocar incompatibilidades, que en la clínica producirían hemoglobinuria, hiperbilirrubinemia y remoción de los glóbulos rojos transfundidos en menos de 12 horas (GIGER, 1995) (YOUNG, LAWRENCE E.; ERVIN, DONALD M.; YUILE, CHARLES LINCOMPATIBLE *et al.*, 1948). En Estados unidos, la incidencia de DEA 1.1 y DEA 1.2 es de aproximadamente el 45% y 20% respectivamente (HALE, 1995)(SWISHER; YOUNG, 1961).

1.3 Bancos de sangre canino

Los bancos de sangre canino, cuando reciben la sangre completa del donador, mediante técnicas como la centrifugación o aféresis en algunos casos, pueden separar esa sangre en diferentes componentes, dependiendo de la necesidad del receptor. En la figura 6, se puede observar un diagrama de flujo mostrando los procedimientos empleados (WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011).

Figura 6. Diagrama de flujo de separación de sangre fresca canina en diferentes componentes



Fuente: adaptado de Weiss, Douglas J.; *et al.* *Schalm's veterinary hematology*. John Wiley & Sons, 2011.

En caninos el volumen para colección se basa en el volumen de sangre estimado (EBV) que se calcula como 85mL/kg peso corporal y se recomienda un 15-22% de EBV,

mientras tanto, el volumen para donación máximo es de aproximadamente 19mL/kg (LURIE, 2003)(COUTO; IAZBIK, 2005); con un ejemplo práctico, un canino de 10kg tendrá aproximadamente 850mL de EBV y podrá donar de 127.5-187mL y hasta un máximo de 190mL.

Son tomadas algunas medidas de seguridad para el donador y el receptor; inicialmente se hacen test clínicos en el donador: revisión de historia clínica, test físicos, así como también test laboratoriales como: hemograma, perfil bioquímico serológico y pruebas de enfermedades infecciosas (*Babesia canis* y *B. gibsoni*, *Leishmania spp.*, *Ehrlichia canis* y otras *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma* o *Neorickettsia spp.*, y *Brucella canis* (COUËTIL *et al.*, 2007)). Adicionalmente antes de cada transfusión se miden los niveles de hematocrito y hemoglobina, el cual debe estar al menos en 40% y 13g/dL respectivamente (WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011). Otro procedimiento necesario es buscar antígenos RBC extraños en caso de haber recibido alguna transfusión tanto en el donador como en el receptor (pudiendo provocar reacciones de histocompatibilidad) (WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011).

Después de la colecta de sangre, es agregada solución preservativa-anticoagulante (APS), luego se separa el plasma de los glóbulos rojos, los cuales son usados para formar las bolsas de concentrados sanguíneos que van a contener además una solución aditiva (AS). Varias AS están compuestas de solución salina, adenina y dextrosa ± manitol ± citrato - ácido cítrico, y están destinados a extender la vida útil de las bolsas de concentrados sanguíneos. Existen diversas APS y AS en el mercado actualmente, aumentando la viabilidad de estos productos hasta por 1 mes en la figura 7 se muestran algunas de las configuraciones.

Figura 7. Soluciones preservativas anticoagulantes (APS) y soluciones aditivas (AS) para concentrados sanguíneos caninos disponibles comercialmente asociadas a el tiempo de vida

Bolsas de colección APS ^a	Bolsa Satélite AS ^b	Vida útil de pRBCs caninos almacenados entre 1-6 °C (días)
Dextrosa-Acido-Citrato (ACD)	Ninguna	No reportado
Citrato-Fosfato-Dextrosa-Adenina-1 (CPDA-1)	Ninguna	20
Citrato-Fosfato-Dextrosa (CPD)	AS-1 (Adsol, Fenwal, Deerfield, IL)	37
	AS-5 (Optisol, Terumo, Somerset, NJ)	35
Citrato-Fosfato-2-Dextrosa (CP2D)	AS-3 (Nutricel, Medsep, Covenia, CA)	35

^aAPS, Solución preservativa-anticoagulante

^bAS, Solución aditiva

^cpRBCs, concentrados de glóbulos rojos

Fuente: adaptado Weiss, Douglas J.; *et al.*. **Schalm's veterinary hematology.** John Wiley & Sons, 2011.

En las transfusiones de glóbulos rojos se pueden administrar concentrados sanguíneos, sangre completa previamente almacenada o sangre completa fresca. Con el avance que ha tenido la ciencia recientemente en la clínica, actualmente se utilizan más los concentrados sanguíneos para tratar los casos de anemia, entre otras cosas para minimizar potenciales eventos adversos asociados a las transfusiones (CALLAN, 1996) (KERL, M. E.; HOHENHAUS, 1993)(WARDROP, 2003).

En la práctica las transfusiones están indicadas en el tratamiento de la anemia, la cual puede tener diferentes causas como: hemorragia, hemolisis o eritropoyesis inefectiva (WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011). La necesidad de estas transfusiones se debe a que el oxígeno necesario para las funciones de las células es transportado principalmente por la hemoglobina; por tanto, al hacer las transfusiones, se incrementan esos cargadores de oxígeno en los pacientes anémicos previniendo la hipoxia. En la mayoría de los casos clínicos de anemia (70%) se debe a hemorragias (agudas o crónicas)(CALLAN, 1996)(KERL, M. E.; HOHENHAUS, 1993).

1.3.1 Anemia

Entre los signos clínicos de la anemia, se destacan debilidad, falta de resistencia, mucosas pálidas, ictericia y hemoglobinuria. El primer paso es verificar la severidad de la anemia, para esto se toma como base de referencia el hematocrito (valores normales 37-55%); siendo leve (30-36%), moderada (20-29%), severa (13-19%) y muy severa (inferior a 13%)(WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011), otro de los parámetros es la hemoglobina (valores normales: 12-18 gr/dL).

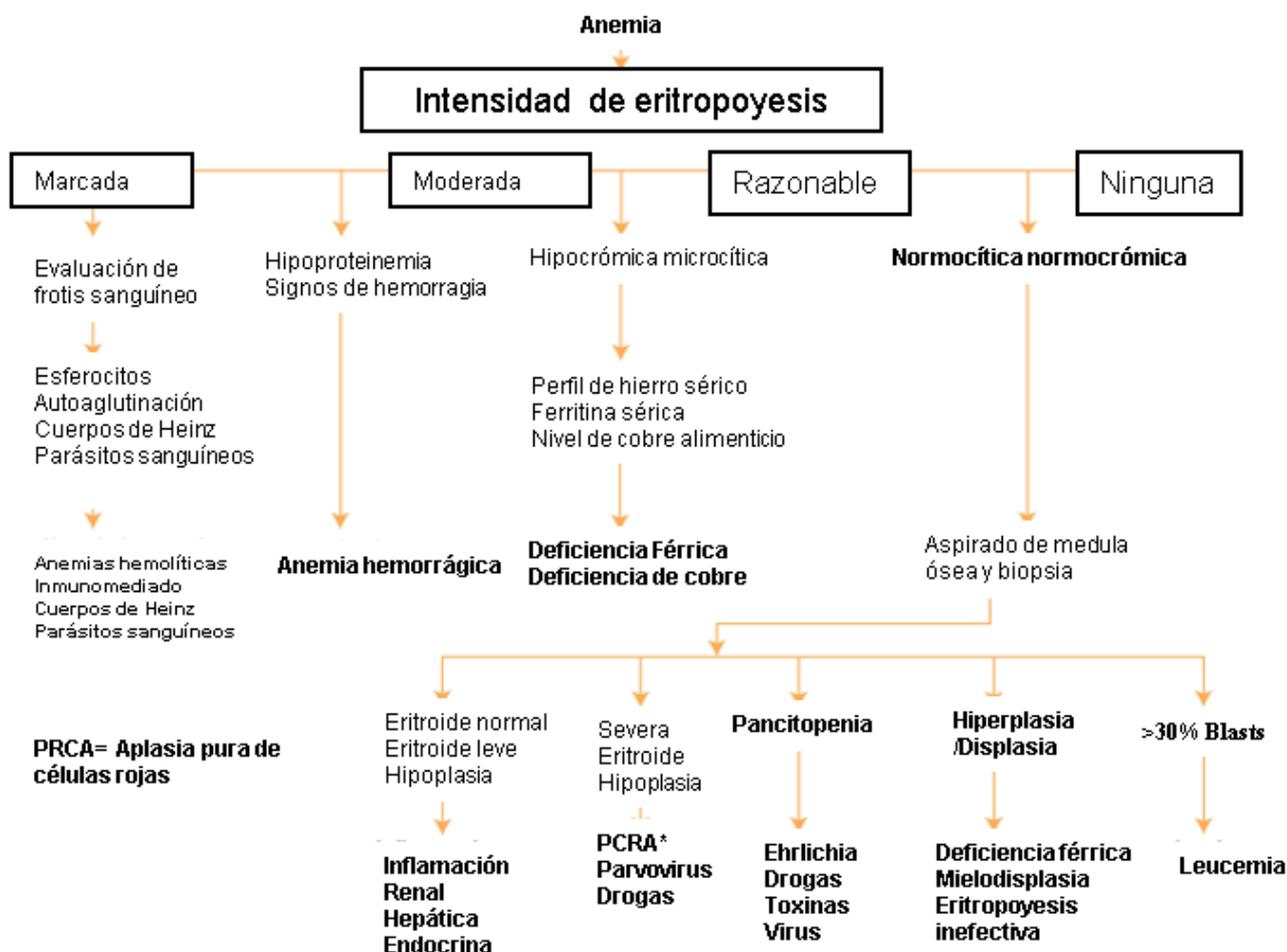
Son usados varios criterios de clasificación para la anemia entre ellos:

- clasificación según la intensidad de la eritropoyesis: la evaluación de la medula ósea divide las causas de anemia en No-regenerativa (eritropoyesis inefectiva) o regenerativa (eritropoyesis activa y efectiva), siendo estas últimas causadas por pérdida de glóbulos rojos al exterior o al interior (anemias hemolíticas y pérdida por sangrados internos), están representadas en la figura 8 dependiendo del grado de intensidad.

- clasificación por volumen eritrocitario y concentración de hemoglobina: dependiendo el tamaño del eritrocito, siendo normal (normocítico), en algunas condiciones patológicas se puede encontrar pequeño (microcítico) o grande (macrocítico); con respecto a la hemoglobina, pueden observarse los glóbulos rojos con color reducido (hipocrómico) o normal (normocrómico). Los diagnósticos más importantes en este caso son anémicas hipocrómicas macrocíticas (anemias regenerativas con glóbulos rojos

grandes y jóvenes que no están totalmente hemoglobinizados); anemia normocrómica normocítica (anemias no regenerativas con glóbulos rojos normales residuales) y anemias hipocrómicas microcíticas (usualmente por deficiencia de hierro) (WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011).

Figura 8. Anemias clasificadas según la intensidad de la eritropoyesis



Fuente: adaptado de Weiss, Douglas J.; et al.. *Schalm's veterinary hematology*. John Wiley & Sons, 2011.

- clasificación según morfología del frotis sanguíneo: es esencial para algunos tipos de diagnóstico tales como las anemias hemolíticas; algunas de las observaciones que se pueden realizar con el microscopio incluyen aglutinaciones, cuerpos de Heinz, hipocromía o fragmentación de glóbulos rojos (WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011).

- clasificación por etiología: algunas causas de anemias en animales pueden ser determinadas identificando la causa en la historia de la enfermedad; como ejemplo en gatos el acetaminofén por duce anemia de cuerpos de Heinz (WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011).

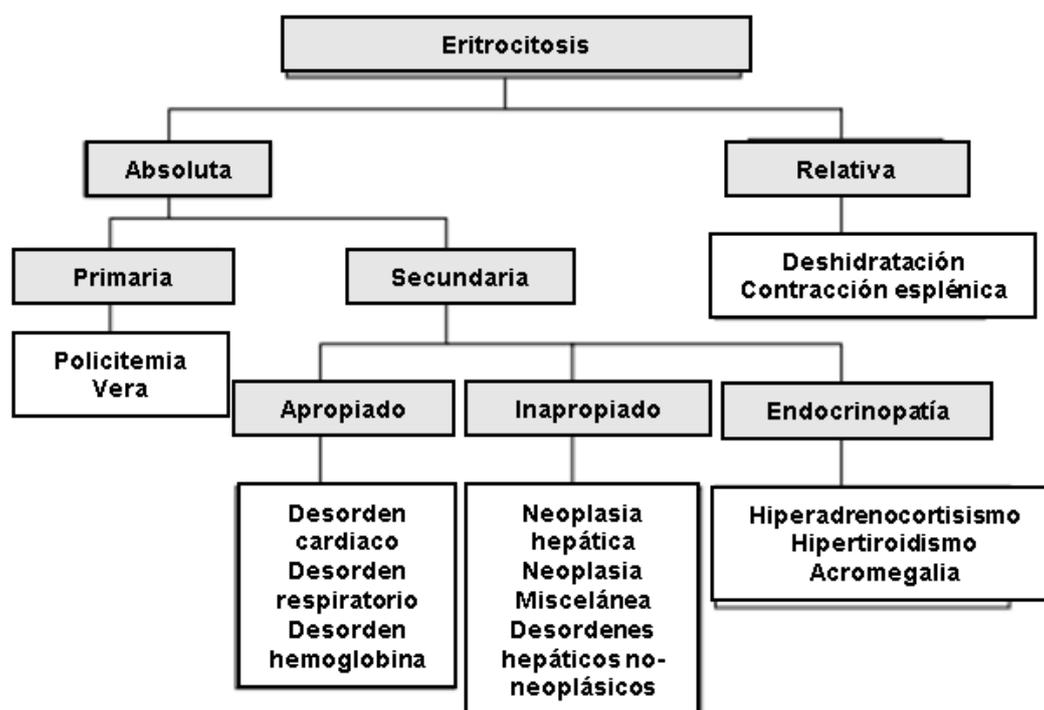
- anemias por pérdidas de sangre: En esta categoría pueden ser incluidas pérdidas internas o externas, en esta última, perdiendo proteínas plasmáticas y los glóbulos rojos;

lo cual hace necesaria la evaluación de estos. Las proteínas plasmáticas son reemplazadas más rápidamente que los glóbulos rojos, por lo que hipoproteinemias son más asociadas con una reciente y gran pérdida de sangre. Entre algunos ejemplos de desangramiento por trauma se encuentran accidentes con autos, heridas penetrantes, traumas quirúrgicos, ulceraciones gastrointestinales, quemaduras; en algunos casos ocasionadas por parásitos como anquilostomas, coccidios, pulgas o piojos (WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, 2011).

1.3.2 Eritrocitosis y Policitemia

Los glóbulos rojos están regulados por la eritropoyetina, la cual es una hormona regulada por sensores localizados en la corteza renal, que, al estar hipóxica, estimula la producción de esta; lo siguiente que ocurre es que en la medula ósea se activan precursores de glóbulos rojos para aumentar los números y así mejorar el transporte de oxígeno. La eritrocitosis ocurre cuando los valores de hemoglobina, glóbulos rojos y hematocrito están por encima de sus valores normales. En la figura 9 se observa un diagrama de flujo para la clasificación de eritrocitosis.

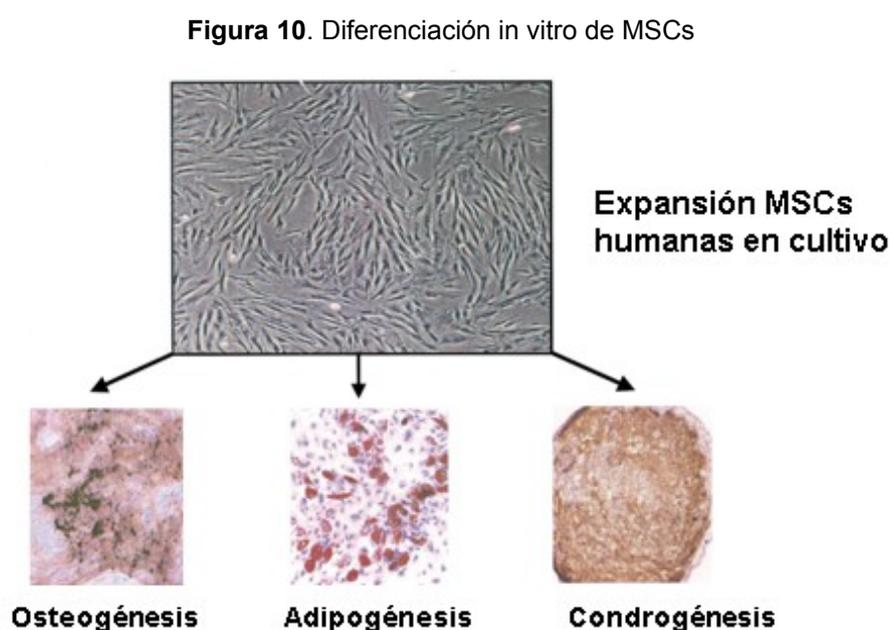
Figura 9. Diagrama de flujo para la clasificación de eritrocitosis



Fuente: adaptado de WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP (2011).

1.4 Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSCs) están definidas como una población celular con capacidad de formar colonias y la habilidad de tener in vitro una diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica (HU *et al.*, 2016) como puede ser observado en la figura 10.



Fuente: adaptado de P. C. Yelick and W. Zhang (2012).

El aislamiento de MSCs ha sido descrito en diferentes tipos de tejidos, que incluyen tejido adiposo, hígado, músculo, fluido amniótico, placenta, sangre del cordón umbilical y pulpa dental (BIANCO; ROBEY, 2000)(TOKCAER-KESKIN, Z., AKAR, A. R., AYALOGLU-BUTUN, F., TERZIOGLU-KARA, E., DURDU, S., OZYURDA, U., & AKCALI, 2009) (PITTENGER *et al.*, 1999) (JORI *et al.*, 2005).

MSCs pueden participar en protocolos de terapia celular por dos mecanismos; el primero contribuyendo en sitios de daño cuando son administradas localmente y el segundo como un rol de soporte a través de factores de secreción (NARDI; DA SILVA MEIRELLES, 2008). Entre ellos ha sido usada en Fibrosis (KOTTON *et al.*, 2001; ORTIZ *et al.*, 2003), cardiovascularogénesis (GOJO *et al.*, 2003), efectos arteriogenicos (KINNAIRD *et al.*, 2004), efectos inmunosupresores, ingeniería de tejido, entre otros (DJOUAD *et al.*, 2003) (KRAMPERA *et al.*, 2003).

Entre los aspectos farmacológicos de las MSCs está su capacidad de producir moléculas que pueden ser usadas como agentes terapéuticos secretados al medio donde

se encuentran, entre los cuales están interleucinas 6, 7, 8, 11, 12, 14, and 15, M-CSF, Flt-3 ligando, SCF, LIF, bFGF, VEGF, PlGF, and MCP-1 (MAJUMDAR *et al.*, 1998)(KINNAIRD *et al.*, 2004).

La evidencia actual que soporta el uso de MSCs para su uso terapéutico para diversas aplicaciones clínicas incluyen su fácil accesibilidad para aislamiento, potencial de expansión enorme en cultivo, plasticidad, propiedades inmunosupresoras, uso en trasplantes alogénicos, efectos paracrinos y su comportamiento de migración (*homming*) a sitios donde hay daño de tejidos (SALEM; THIEMERMANN, 2010).

Recientemente se ha identificado un progenitor estromal mesenquimal en el nicho hematopoyético de la médula ósea de ratones adultos, el cual es importante para el mantenimiento y auto regeneración de células madre hematopoyéticas (HSCs) (HU *et al.*, 2016). También se encontró que MSCs pueden rescatar pacientes de anemia (AN *et al.*, 2017) y además se demostró que en trasplantes de HSCs para reconstitución de hematopoyesis animal *in vivo* (HU *et al.*, 2016)(WEN *et al.*, 2015).

1.5 Justificativa

En la práctica, las transfusiones están indicadas en el tratamiento de la anemia, la cual puede tener diferentes causas como: hemorragia, hemólisis o eritropoyesis inefectiva. La necesidad de estas transfusiones se debe a que el oxígeno necesario para las funciones de las células es transportado principalmente por la hemoglobina; por tanto, al hacer las transfusiones, se incrementan esos cargadores de oxígeno en los pacientes anémicos previniendo la hipoxia. En la mayoría de los casos clínicos de anemia (70%) se debe a hemorragias (agudas o crónicas). Actualmente, el tiempo de vida media de bolsas de sangre caninas es de aproximadamente 20 días con la solución Citrato-fosfato-dextrosa-adenina 1 (CPDA-1), nuestra investigación busca usar como solución aditiva las células madre mesenquimales, explorando el potencial que tienen para interactuar con las células a su alrededor.

1.6 Pregunta norteadora

¿Es posible que las MSCs usadas como aditivos en concentrados sanguíneos logre mejorar la capacidad de entrega de oxígeno en pacientes que necesitan transfusiones?

2 OBJETIVOS

2.1 General

- evaluar los efectos de células madre mesenquimales (MSCs) como solución aditiva en los concentrados sanguíneos caninos, principalmente los relacionados a la vida útil y las variaciones en los niveles de hemoglobina durante un periodo de 28 días.

2.2 Específicos

- aislar y cultivar MSCs utilizando protocolo de extracción a partir de tejido adiposo;
- caracterizar las células obtenidas del protocolo de extracción, utilizando metodologías de diferenciación de MSCs y marcadores de inmunofluorescencia; y
- evaluar la variación de RBCs y Hb a lo largo del estudio al comparar el grupo tratado (MSCs como aditivo) con el grupo control.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Concentrados sanguíneos

La sangre fresca extraída de 3 cachorros fue disponibilizada por la CLINICA VETERINARIA VETQUALIS, ubicada en Foz de Iguazú-PR, las cuales contienen previamente solución de preservación CPDA-1.

En caninos el volumen para colección se basa en el volumen de sangre estimado (EBV) que se calcula como 85mL/kg peso corporal y se recomienda un 15-22% de EBV, mientras tanto, el volumen para donación máximo es de aproximadamente 19mL/k; con un ejemplo práctico, un canino de 10kg tendrá aproximadamente 850mL de EBV y podrá donar de 127.5-187mL y hasta un máximo de 190mL.

Luego de la extracción se procedió a centrifugar la sangre a 400g durante 5 minutos para separar el plasma de los glóbulos rojos y se procedió a cuantificar la cantidad de RBC/ μ L.

3.2 Aislamiento y caracterización de células tronco

3.2.1 Procesamiento de muestra de tejido adiposo para aislamiento de MSCs

Las MSCs, fueron obtenidas de tejido adiposo abdominal cedido por la clínica Veterinaria Familia Animal ubicada en Foz de Iguazú, las cuales fueron extraídas durante procesos de castración, como se muestra en la figura 11.

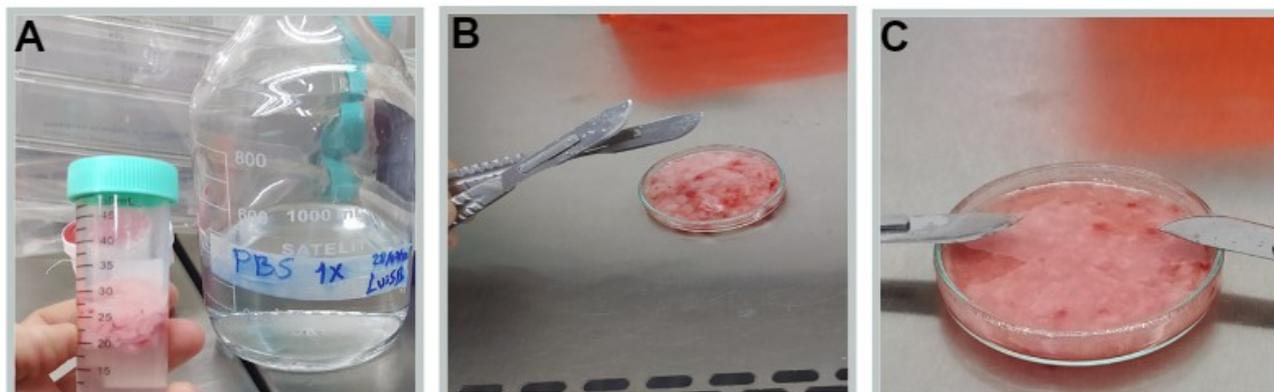
Figura 11. Muestra de tejido adiposo



Fuente: el autor, 2023.

En una cabina de seguridad biológica, fueron pesadas, lavadas con PBS y luego transferidas a placas de Petri para ser fragmentadas con auxilio de bisturíes como muestra la figura 12.

Figura 12. Lavado, transferencia y fragmentación de las muestras de tejido adiposo



Fuente: *el autor, 2023.*

Nota: **A.** Muestra lavada con PBD; **B.** Muestra transferida a placa de Petri dentro de cabina de bioseguridad; y **C.** Muestra de tejido adiposo fragmentada con auxilio de bisturíes.

Los fragmentos fueron colocados en tubos falcom de 50 mL, junto con 2000 u/mL de colagenasa I (Gibco, EUA), los tubos se incubaron a 37°C por 1h agitando la solución cada 20 minutos (usando Vortex) como se muestra en la figura 13.

Figura 13. Tejido fraccionado junto con colagenasa I

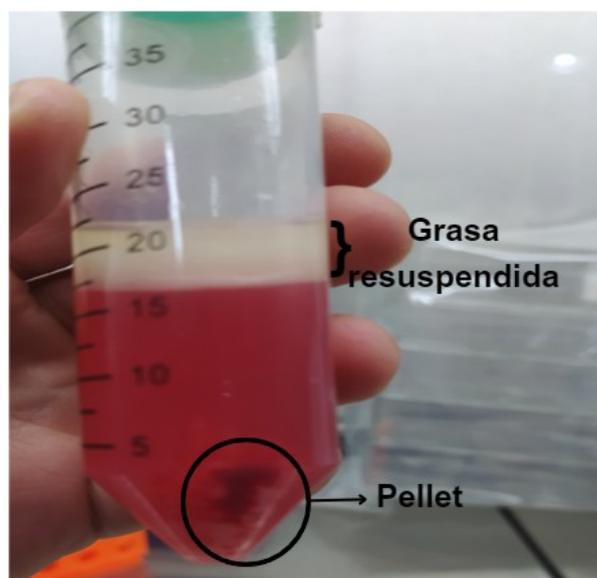


Fuente: *el autor, 2023.*

Posteriormente, la colagenasa fue inactivada con 20 mL de Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) completo (con adición de 10% suero fetal bovino) y la suspensión fue dividida en tubos de polipropileno de 15 mL y centrifugados a 200xg

durante 10 minutos; este procedimiento se repitió varias veces hasta retirar completamente la grasa de la suspensión el sobrenadante fue descartado y el pellet conteniendo las células fue retenido y después resuspendido en 10 mL de DMEM completo y centrifugado a 200xg durante 10 minutos, como mostrado en la figura 14.

Figura 14. Tubo después del proceso de centrifugación



Fuente: *el autor*, 2023.

Con ayuda de un hemocitómetro, se contó el número de células presentes usando una alícuota de 10 μL de la muestra. Las células luego fueron plaqueadas en frascos de cultivo de 75 cm^2 (BIOFIL, China) e incubados a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% CO_2 como observado en la figura 15, cambiando el medio 2 veces por semana.

Las inspecciones por microscopia fueron realizadas para verificar la adherencia de las células; se esperó tener una confluencia cercana entre el 70 y/o 80% para desagregarlas usando tripsina-EDTA (Vitrocell, Brasil) y plaqueadas para la realización de experimentos como observado en la figura 16.

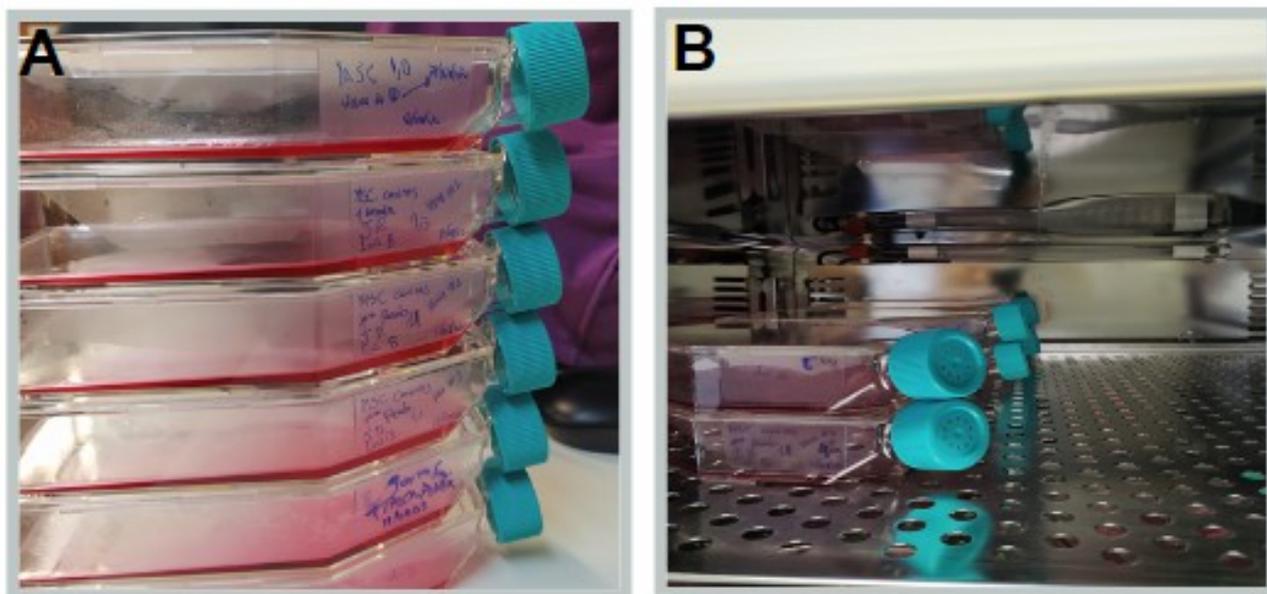
3.2.2 Ensayo de diferenciación

El proceso de diferenciación inducida es uno de los ensayos para caracterización de MSCs; este proceso permite no solo demostrar que la célula es indiferenciada, sino que también consigue dar origen a otros linajes celulares (potencia celular).

Para la realización de este ensayo, se adiciona el tratamiento a diferentes muestras para inducir adipogénesis, condrogénesis y osteogénesis, utilizando el StemPro™ Differentiation Kit (Gibco, EUA) específico para cada tipo de diferenciación.

Siguiendo el protocolo del fabricante, transcurrido el periodo de incubación, se procedió para adipogénesis a marcar lípidos (utilizando Oil Red O); en la osteogénesis cristales de calcio (utilizando fosfatasa alcalina) y en la condrogénesis glucosaminoglicanos (utilizando azul de alciano/alcian blue).

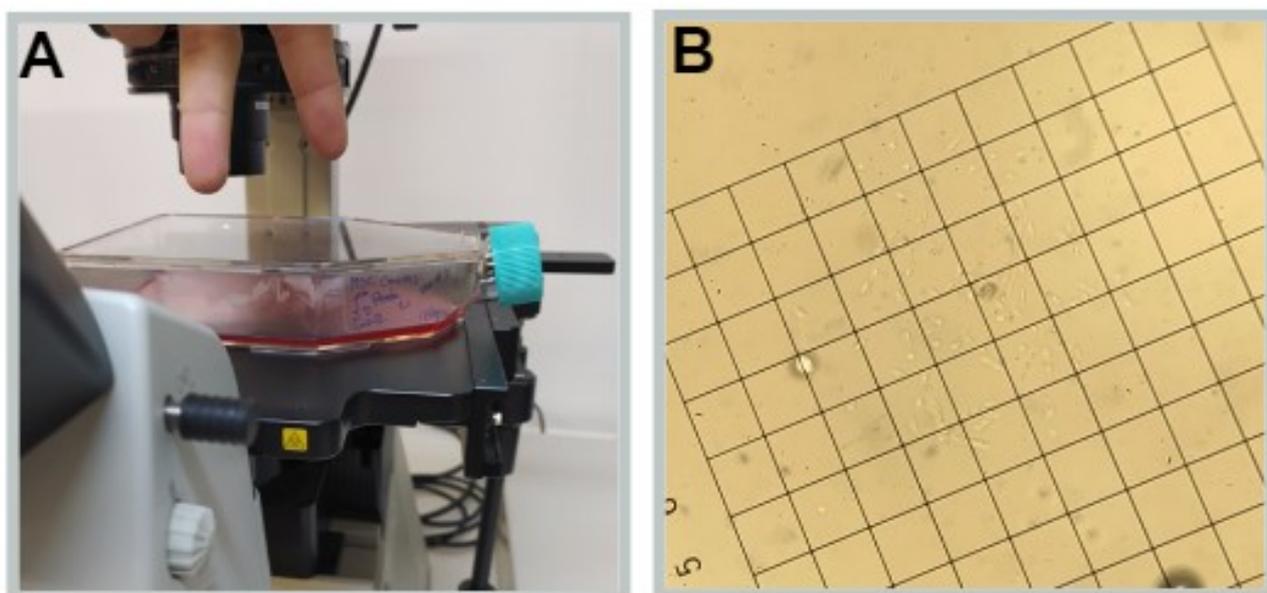
Figura 15. Plaquetamiento de células en frascos de cultivo



Fuente: el autor, 2023.

Nota: **A.** Células plaquetadas en botellas de cultivo; y **B.** Botellas colocadas en estufa de cultivo.

Figura 16. Verificación de adherencia de células



Fuente: el autor, 2023.

Nota: **A.** Botella de cultivo observada en el microscopio invertido; y **B.** Células adheridas observadas en el microscopio invertido.

3.2.3 Marcación por inmunofluorescencia

Según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), se propuso una serie de marcadores de superficie mínimo para la identificación de MSCs; de los cuales deben ser positivos para CD73, CD90 y CD105 y al mismo tiempo negativos para CD34, CD45, CD11b o CD14, CD19 o CD79 α yHLA-DR. Para nuestro análisis se realizaron marcaciones utilizando el Kit BD Stemflow™562245 (<https://lc.cx/NneP58>) y se usó el marcador de superficie CD105 siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3 Delineamiento experimental de MSC como aditivo

Para este proyecto se realizaron los experimentos en triplicadas; fueron utilizados 2 grupos que fueron divididos así: células sanguíneas + CPDA-1 (control) y células sanguíneas + CPDA-1 + MSCs (grupo experimental); mantenidos a 4 °C durante 28 días.

- grupo experimental: células sanguíneas + CPDA-1 + MSCs: se utilizó una relación de 1000:1 entre células sanguíneas y MSCs respectivamente y una cantidad de CPDA-1 en una cantidad de 5×10^{12} células/L para ofrecer a las células nutrientes y medio de preservación.
- grupo control: células sanguíneas + CPDA-1: se utilizó una cantidad de CPDA-1 de 5×10^{12} células/L junto con la correspondiente cantidad de RBC.

3.4 Pruebas laboratoriales

Test de hemoglobina y conteo de Glóbulos rojos (RBC) se analizaron automáticamente utilizando la Celltac Alpha/ MEK-6550 (<https://lc.cx/Upg6QN>) en los días 0, 4, 7, 14, 28 para obtener los parámetros encima mencionados para evaluar.

3.5 Análisis estadístico

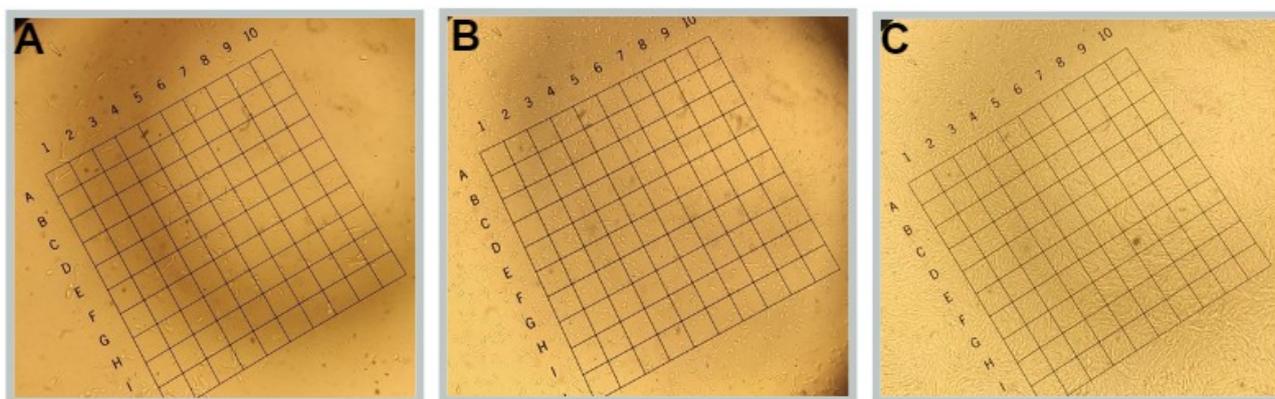
Utilizando el software GraphPad Prism 10.0.2., se realizó el test Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los datos y después de comprobado se realizó el test T de *Student* para muestras independiente, el cual nos sirvió para comprobar si existían diferencia entre los tratamientos, teniendo como base un P-value <0,05 para indicar significancia (datos en anexo).

4 RESULTADOS

4.1 Aislamiento y expansión de MSCs extraídas de tejido adiposo canino

Como parte del diseño experimental, se obtuvieron 6 linajes celulares aislados a partir del tejido adiposo de caninos. En la figura 17, se muestran las diferentes etapas del crecimiento celular en diferentes niveles de confluencia, teniendo una variación dependiendo del linaje celular aislado.

Figura 17. Células aisladas del tejido adiposo (posibles MSCs) vistas en microscopio invertido a 4X, en diferentes días después de ser cultivadas



Fuente: el autor, 2023.

Nota: **A.** 3 días después de ser cultivadas con confluencia de 10%. **B.** 8 días después de ser cultivadas con confluencia de 40%. **C.** 14 días después de ser cultivadas con confluencia de 90%.

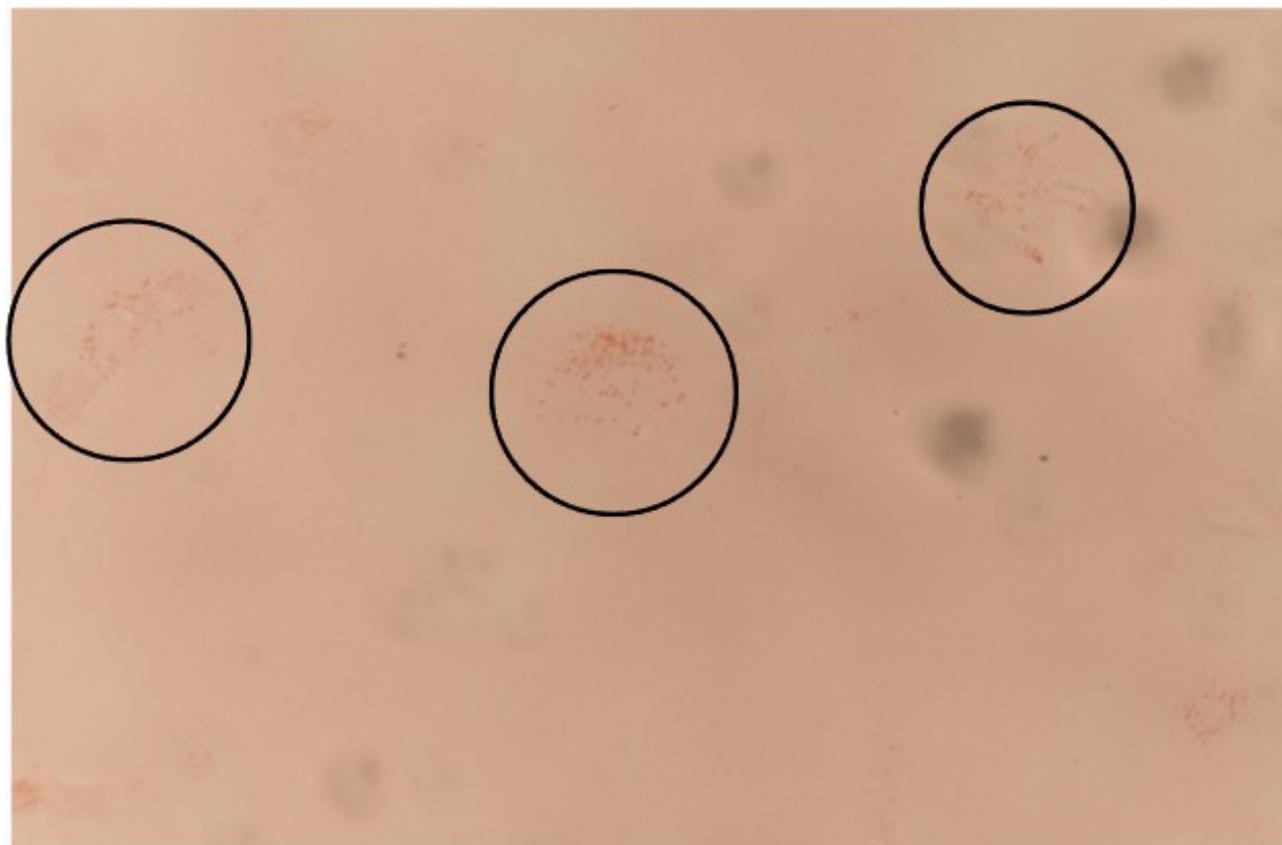
4.2 Diferenciación MSCs utilizando kits de Osteogenesis, Adipogenesis y Condrogenesis

MSC diferenciado a adipocito utilizando kit comercial (Gibco™ StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit), se observa marcación de lípidos por Oil Red O (Figuras 18 y 21).

MSC diferenciado a osteocito utilizando kit comercial (Gibco™ StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit), se observa marcación de cristales de calcio por fosfatasa alcalina (Figuras 19 y 21).

MSC diferenciado a condrocito utilizando kit comercial (Gibco™ StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit), se observa coloración de glucosaminoglicanos por Azul de Alciano (Alcian blue) (Figura 20 y 21).

Figura 18. Adipogénesis



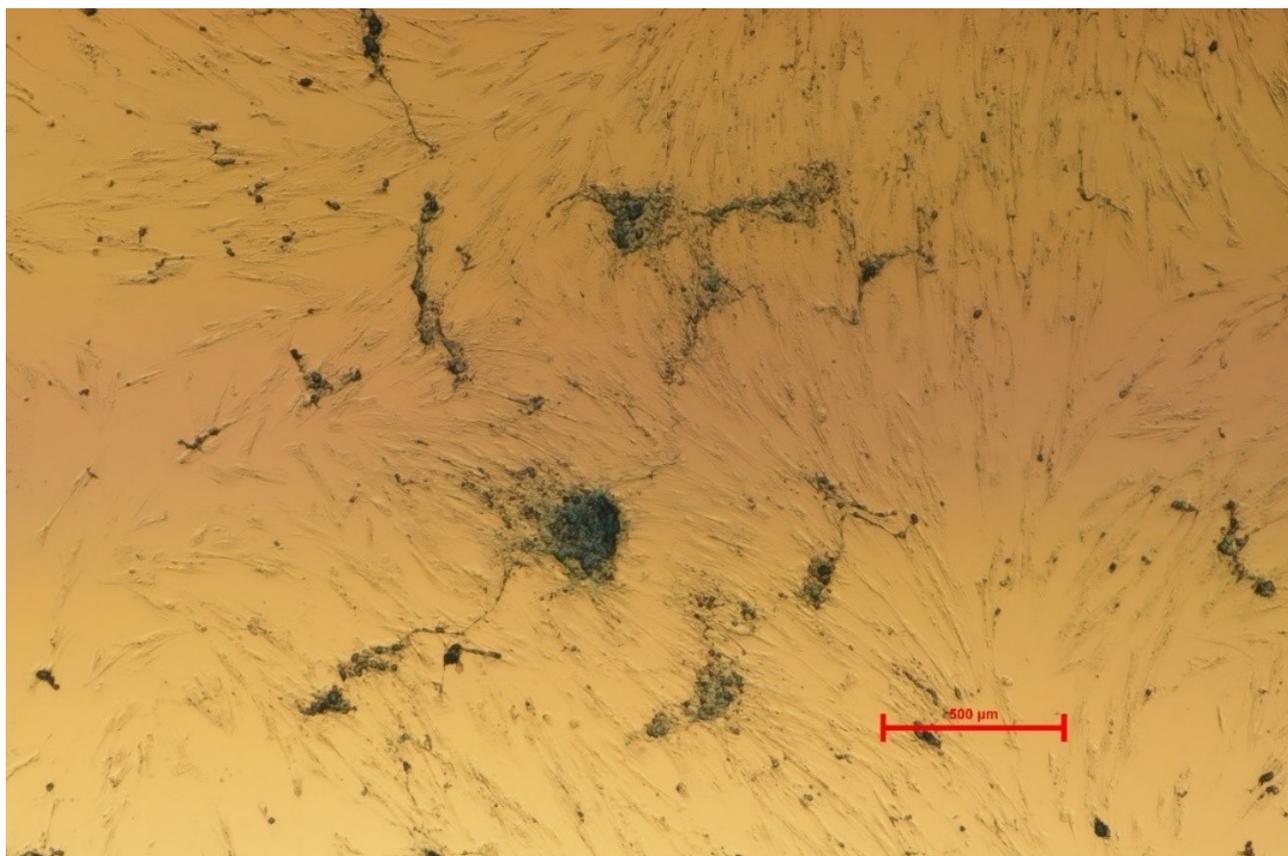
Fuente: el autor, 2023.

Figura 19. Osteogénesis



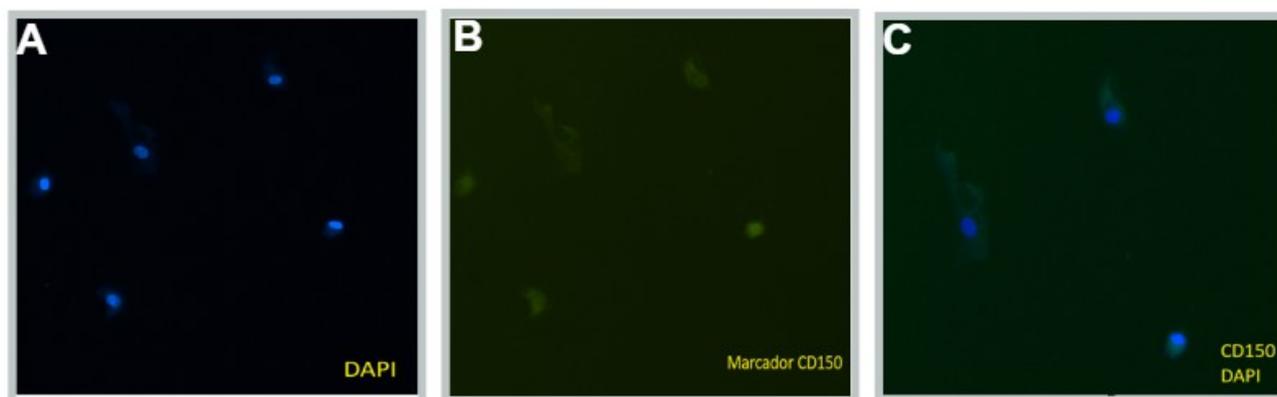
Fuente: el autor, 2023.

Figura 20. Condrogenesis



Fuente: el autor, 2023.

Figura 21. Marcación por inmunofluorescencia de MSCs



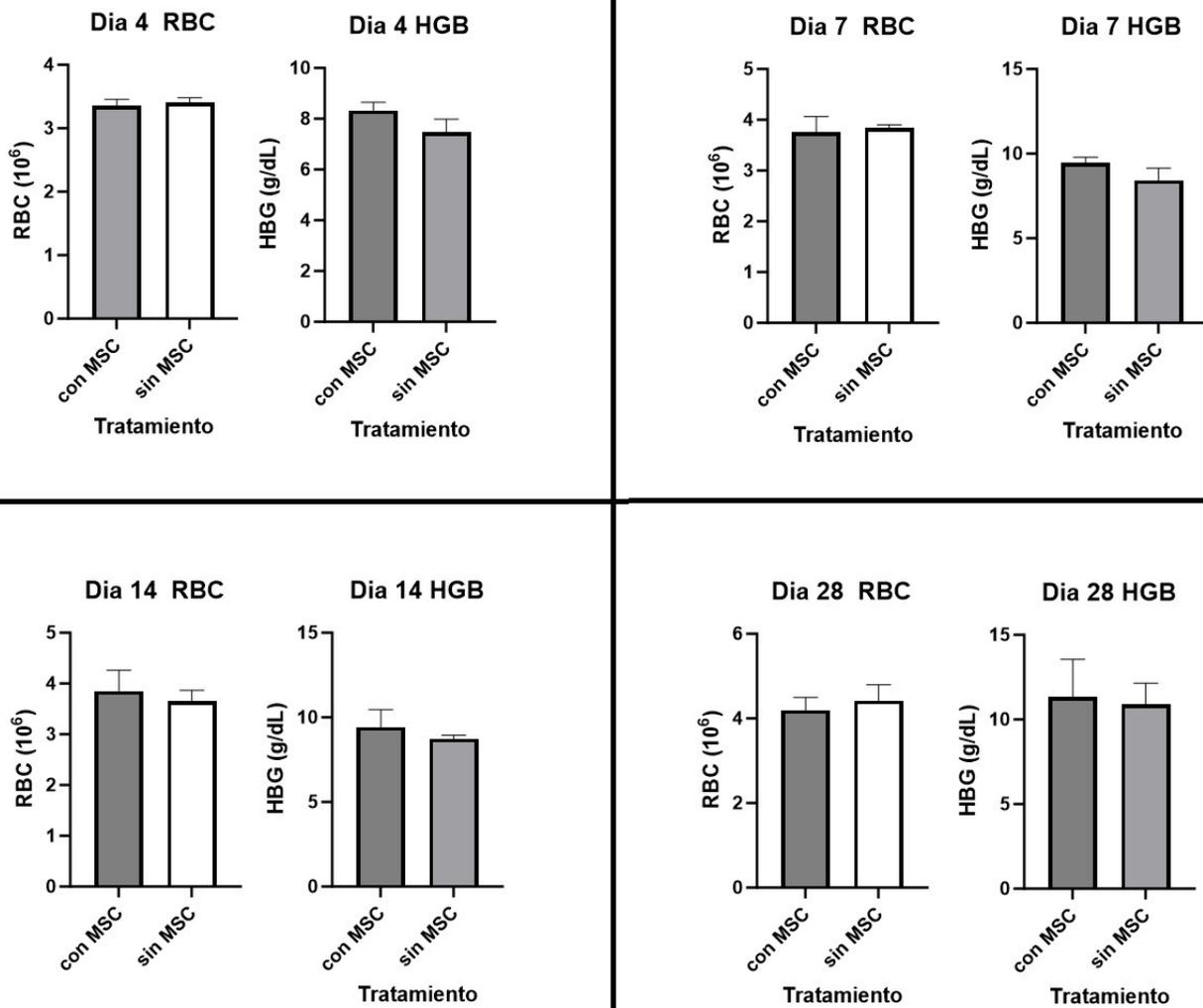
Fuente: el autor, 2023.

Nota: **A.** marcación positiva con DAPI para núcleo celular en azul; **B.** marcación CD150 positivo en MSCs en color verde; y **C.** marcación positiva con CD150 y DAPI.

4.3 Resultado experimental de tratamiento de MSC como aditivo vs Control

Los resultados obtenidos utilizando el test T de Student para variables independientes, demostró que no existe diferencia significativa en cuanto a la variación de RBCs o Hb en los grupos experimental y control, en la figura 22 se observan los datos condensados de los parámetros analizados. Datos estadísticos en el anexo.

Figura 22. Resultados estadísticos de las muestras analizadas de RBCs almacenados con o sin MSCs a 4 ± 2 °C



Fuente: el autor, 2023.

5 DISCUSIÓN

El tejido adiposo se muestra como una fuente muy atractiva para la extracción de MSCs. Durante mucho tiempo se han utilizado las MSCs provenientes de medula ósea para terapia celular (SEO; SHIN; KIM, 2019), sin embargo, se ha demostrado que las MSCs están presentes en diferentes tipos de tejido. El tejido adiposo se presenta como una opción rica en cantidad de MSCs, sin problemas éticos y con unas técnicas de colecta poco invasivas como liposucción (BAER; GEIGER, 2012). Se demostró que las MSCs se comportan de manera diferente dependiendo del local donde fueron extraídas, teniendo variaciones en su senescencia o proliferación, demostrando que, al ser extraídas de tejido adiposo, no tienen efectos negativos relacionados (BEANE *et al.*, 2014); así como también presentan mejor potencial inmunomodulador (STRIOGA, 2012), también se observó que presentan un mayor potencial de diferenciación, ciclo celular y análisis de actividad de telomerasa (PENG *et al.*, 2008).

Existen varios estudios intentando elucidar que tejido adiposo es el más adecuado para la extracción de MSCs (ZHONG *et al.*, 2020); en nuestro estudio se utilizó tejido adiposo de la zona abdominal de cachorros durante el proceso de castración.

Algunos estudios han mostrado que al utilizar MSCs expandidas en el laboratorio, tienen un mayor potencial terapéutico, debido a la mayor cantidad de células utilizadas en el tratamiento, así como también por su mayor potencial trófico (relacionado con sus funciones paracrinas y autocrinas en los procesos vitales, tales como proliferación, diferenciación y regeneración) (DOMERGUE *et al.*, 2016; PAK *et al.*, 2018).

Actualmente existen muchos debates relacionados sobre el local óptimo para extracción de MSCs provenientes de tejido adiposo y como las células extraídas varían en su capacidad o función.

En el presente estudio se logró realizar y optimizar protocolos de extracción de MSCs a partir de muestras de tejido adiposo para cultivo, expansión, congelamiento, descongelamiento y realización de experimentos relacionados con MSCs.

Para caracterizar estas células fue necesario realizar procesos de diferenciación celular y marcación con inmunofluorescencia; con los cuales pudimos hacer la validación de las células extraídas tras lo cual se procedió a realizar los experimentos.

Este estudio surgió por la necesidad de obtener mejores resultados en las transfusiones de pacientes críticos, mejorando la capacidad de entrega de oxígeno por los glóbulos rojos transfundidos, así como también minimizar los riesgos de que, a la hora de hacer las transfusiones, estas tengan menos acumulación de sustancias bioactivas que

puedan ser nocivas durante periodos prolongados de almacenamiento; lo cual normalmente ocurre y se ha reportado (HEDDLE *et al.*, 2016; LACROIX *et al.*, 2015).

Actualmente se han diseñado muchas estrategias y sustancias aditivas para intentar maximizar la eficiencia y periodos de conservación de las bolsas/concentrados sanguíneos, nuestro estudio, buscó un enfoque diferente para este fin, aunque no se obtuvo una diferencia significativa en los resultados; se podría aumentar la relación entre MSCs/RBCs y así evaluar si existe o no una variación que pueda mejorar tanto el tiempo de almacenamiento como reducir acumulados que puedan ser nocivos a la hora de hacer las transfusiones.

En este estudio queda claro que los costos asociados para este producto son altos; hacer el proceso para obtener las MSCs es alto y además requiere laboratorios que tengan exclusiva dedicación para cultivo celular de MSCs; por eso, en caso de desarrollar un producto que sea eficiente y mejore las características de bolsas de sangre, sería orientado para pacientes críticos, donde además de obtener las RBCs se obtenga las MSCs como tratamiento efectivo, potenciando así el tratamiento.

En futuros proyectos relacionados con este tema de investigación, relacionado con cultivo celular en la UNILA, sería indispensable tener una zona aislada para la cabina de seguridad y la estufa de cultivo, debido a esta falta ocurrían frecuentemente 42 contaminaciones en nuestras botellas de cultivo, lo que nos llevó a un atraso en la realización de nuestro proyecto. Sería interesante observar cual sería el resultado al aumentar la proporción de MSCs:RBCs en 100:1; debido a estas limitaciones de producción de MSCs, nos vimos en la obligación de reducir la cantidad de numero de muestras de sangre a 3; como perspectiva futura sería ideal ampliar el número de muestras a analizar para tener más datos y obtener una estadística más robusta.

6 CONSIDERACIONES FINALES Y FUTURAS

El proceso de aislamiento y expansión de MSCs es relativamente simple y fácil de conducir, el mayor problema que tuvimos al realizar este proceso fue relacionado a la contaminación de nuestras botellas, lo ideal para laboratorios de cultivo, es tener una zona aislada del flujo de personas y del ambiente para evitar cualquier vía de contaminación.

El uso de MSCs como aditivo para bolsas de sangre/concentrados sanguíneos; es una alternativa diferente a las metodologías utilizadas comúnmente hoy en día para preservación; no sólo desde el punto de vista práctico de transferir glóbulos rojos, sino también que al estar presentes MSCs, éstas podrían dar un soporte adicional a los pacientes que reciban las transfusiones. Sería interesante evaluar el efecto de esta interacción en modelos animales.

7 REFERENCIAS

ALAYASH, A. I.. *Oxygen therapeutics: can we tame haemoglobin?*. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 152-159, 2004.

AN, N.; *et al.*. *Melanoma-Induced Anemia Could be Rescued by Sca-1+ Mesenchymal Stromal Cells in Mice*. **Stem cells and development**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 495-502, 2017.

BAER, P. C.; GEIGER, H.. **Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity**. [S. l.: s. n.], 2012.

BEANE, O. S.; *et al.*. *Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 12, 2014.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.. *Marrow stromal stem cells*. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 105, n. 12, p. 1663-1668, 2000.

CALLAN, M. B.; *et al.*. *Canine red blood cell transfusion practice*. **Journal of the American Animal Hospital Association**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 303-311, 1996.

CAMBIER, C.; *et al.*. *Haemoglobin oxygen affinity and regulating factors of the blood oxygen transport in canine and feline blood*. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 83-88, 2004.

COHEN, CARL; FULLER, J. L.. *The inheritance of blood types in the dog*. **Journal of Heredity**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 225-228, 1953.

COUËTIL, L.; *et al.*. *ACVIM Consensus Statement*. **J Vet Intern Med**, [s. l.], v. 21, p. 356-361, 2007.

COUTO, C. G.; IAZBIK, M. C.. *Effects of blood donation on arterial blood pressure in retired racing greyhounds*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 845-848, 2005.

DJOUAD, F.; *et al.* *Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals.* **Blood**, [s. l.], v. 102, n. 10, p. 3837-3844, 2003.

DOMERGUE, S.; *et al.* *Comparison between stromal vascular fraction and adipose mesenchymal stem cells in remodeling hypertrophic scars.* **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2016.

DUKES, H. H.; REECE, W. O.. **Fisiologia dos animais domésticos**. 13. ed. [S. l.: s. n.], 2017.

GIGER, U.; *et al.* *An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog.* **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 206, n. 9, p. 1358-1362, 1995.

GOJO, S.; *et al.* *In vivo cardiogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells.* **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 288, n. 1, p. 51-59, 2003.

GUYTON, A.. **Tratado de Fisiología Médica**. 12. ed. [S. l.]: Elsevier, 2011.

HALE, A. S.. *Canine blood groups and their importance in veterinary transfusion medicine.* **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1323-1332, 1995.

HEDDLE, N. M.; *et al.* *Effect of Short-Term vs. Long-Term Blood Storage on Mortality after Transfusion.* **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 375, n. 20, p. 1937-1945, 2016.

HU, X.; *et al.* *Identification of a common mesenchymal stromal progenitor for the adult haematopoietic niche.* **Nature Communications**, [s. l.], v. 7, p. 01-14, 2016.

JORI, F. P.; *et al.* *Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells.* **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 645-655, 2005.

KERL, M. E.; HOHENHAUS, A. E.. *Packed red blood cell transfusions in dogs: 131 cases. Journal of the American Veterinary Medical Association*, [s. l.], v. 202, n. 09, p. 1495-1499, 1993.

KINNAIRD, T.; *et al.* *Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms. Circulation*, [s. l.], v. 109, n. 12, p. 1543-1549, 2004.

KOTTON, D. N.; *et al.* *Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. Development*, [s. l.], v. 128, n. 24, p. 5181-5188, 2001.

KRAMPERA, M.; *et al.* *Krampera*. [s. l.], v. 101, n. 9, p. 3722-3729, 2003.

LACROIX, J.; *et al.* *Age of Transfused Blood in Critically Ill Adults. New England Journal of Medicine*, [s. l.], v. 372, n. 15, p. 1410-1418, 2015.

LURIE, F.; *et al.* *Measuring circulating blood volume using infused hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC, Oxyglobin®) as an indicator: validation in a canine hypovolemia model. Anesthesiology*, [s. l.], v. 99, p. A729, 2003.

MAJUMDAR, M. K.; *et al.* *Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. Journal of Cellular Physiology*, [s. l.], v. 176, n. 1, p. 57-66, 1998.

MEDER, A.; ADAGIO, L.; LATTANZI, L.. *El hemograma en animales pequeños. Universidad Nacional de la Pampa*, [s. l.], p. 25-34, 2012.

NARDI, N. B.; DA SILVA MEIRELLES, L.. *Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. Handb Exp Pharmacology*, p. 249-282, 2008.

ORTIZ, L. A.; *et al.* *Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s. l.], v. 100, n. 14, p. 8407-8411, 2003.

PAK, J.; *et al.* *Cartilage regeneration in humans with adipose tissue-derived stem cells and adipose stromal vascular fraction cells: updated status*. **MDPI AG**, 2018.

PALIS, J.; YODER, M. C.. *Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man*. ***Experimental Hematology***, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 927-936, 2001.

PENG, L.; *et al.* *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue*. ***Stem Cells and Development***, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 761-773, 2008.

PITTENGER, M. F.; *et al.* *Multilineage potential of adult human Mesenchymal Stem Cells*. ***Science***, [s. l.], v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2899157>>. Acesso em: 15 mar. 2023.

DICKERSON AND GEIS, R. E.. ***Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology***. [s. l.], may, p. 1984, 1983.

SALEM, H. K.; THIEMERMANN, C.. *Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status*. ***Stem Cells***, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 585-596, 2010.

SCOTT N.; SWISHER, L. E.; YOUNG; N. T. *In vitro and in vivo studies of the behavior of canine erythrocyte-isoantibody systems*. ***Annals of the New York Academy of Sciences***, [s. l.], 1962.

SEO, Y.; SHIN, T. H.; KIM, H. S.. *Current strategies to enhance adipose stem cell function: An update*. **MDPI AG**, 2019.

STRIOGA, M.; *et al.* *Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells*. ***Stem Cells Dev.***, v. 21, n. 14, p. 2724-2752, 2012.

SWISHER, S. N.; YOUNG, L. E.. *The blood grouping systems of dogs*. ***Physiological reviews***, [s. l.], v. 41, p. 495-520, 1961.

SYMONS, M.; BELL, K.. *Expansion of the canine A blood group system. **Animal Genetics***, [s. l.], v. 22, n. 03, p. 227-235, 1991.

TAN, S. Y.; GRAHAM, C.. *Karl Landsteiner (1868-1943): originator of ABO blood classification. **Singapore Medical Journal***, [s. l.], v. 54, n. 05, p. 243-244, 2013.

TOKCAER-KESKIN, Z.; AKAR, A. R.; AYALOGLU-BUTUN, F.; TERZIOGLU-KARA, E.; DURDU, S.; OZYURDA, U.; AKCALI, K. C.. *Timing of induction of cardiomyocyte differentiation for in vitro cultured mesenchymal stem cells: a perspective for emergencies. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology***, [s. l.], v. 87, n. 2, p. 143-150, 2009.

WALDROP, J. E.. *et al. Packed red blood cell transfusions in dogs with gastrointestinal hemorrhage: 55 cases (1999-2001). **Journal of the American Animal Hospital Association***, [s. l.], v. 39, n. 06, p. 523-527, 2003.

WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, K. J. (Ed.). ***Schalm's veterinary hematology***. 6. ed. [S. l.]: *Wiley-Blackwell*, 2011.

WEN, F.; *et al.. Sca1+ mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease in mice after bone marrow transplantation. **International Immunopharmacology***, [s. l.], v. 26, n. 01, p. 50-57, 2015.

YOUNG, L. E.; ERVIN, D. M.; YUILE, C. L., R.; *et al.. Hemolytic reactions produced in dogs by transfusion of incompatible dog blood and plasma. **Blood***, [s. l.], v. 04, n. 11, p. 1218-1231, 1949.

ZHONG, Y. C.; *et al.. **Recent advance in source, property, differentiation, and applications of infrapatellar fat pad adipose-derived stem cells***. [S. l.]: *Hindawi Limited*, 2020.

8 APÉNDICES

8.1 Apêndice A – Opinião favorável del CEUA (Comité de Ética en el uso de Animales)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO Nº 7 / 2023 / CEUA (10.01.05.19.05)

Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO

Foz Do Iguaçu-PR, 31 de julho de 2023.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - UNILA

Certificamos que a proposta intitulada "*Evaluación de viabilidad de células madre mesenquimales como aditivo en bolsas de sangre caninas*" - protocolada com o número 23422.013404/2023-01, sob a responsabilidade do docente **Jorge Luis Maria Ruiz**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Integração Latinoamericana (UNILA), na reunião do dia 19 de julho de 2023.

Vigência do projeto	Agosto de 2023 a julho de 2025
Espécie/Linhagem	Canina / Raças diversas
Número de animais	9
Peso/Idade	Variados
Sexo	Machos - Fêmeas
Origem	Tutores

(Assinado digitalmente em 31/07/2023 11:19)
FLAVIO LUIZ TAVARES
PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR
ILACVN (10.01.06.03.04)
Matrícula: 1655845

Processo Associado: 23422.013404/2023-01

Visualize o documento original em <https://sig.unila.edu.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **7**, ano: **2023**, tipo: **CERTIFICADO**, data de emissão: **31/07/2023** e o código de verificação: **60afb2f13**