

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CRIOPRESERVADAS ADVINDAS DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS WISTAR

Emerson Alex Oliveira Souza, Thaís Gonçalves Tavares, Márcio Phillip Andrade
Correia, Luisa Demoner Vicentini, Leonardo Oliveira Trivilin, Jankerle Neves
Boeloni.

Universidade Federal do Espírito Santo/ Departamento de Medicina Veterinária/CCAUE/UFES, Alto
Universitário, S/N - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, emersonsouza.medvet@gmail.com,
thastavares@yahoo.com.br, phillipandrader@outlook.com, luisa.vicentini@edu.ufes.br,
leotrivilin@gmail.com, jankerle@gmail.com

Resumo

O estudo teve o objetivo de avaliar a viabilidade de células-tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea de ratas *Wistar* após diferentes métodos de criopreservação. As células foram extraídas de quatro ratas jovens com posterior cultivo. Os métodos de criopreservação foram: armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) e/ou em ultra-freezer (-80°C); os tempos de avaliação foram: 24 horas, 7 dias e 14 dias após a criopreservação e os recipientes utilizados foram: palhetas ou criotubos. Os resultados mostraram que as CTMs criopreservadas em nitrogênio líquido usando palhetas apresentaram diminuição na viabilidade, sem diferença entre os tempos estudados. No entanto, as células criopreservadas em ultra-freezer usando criotubos tiveram uma viabilidade maior as 24 horas e 14 dias em comparação aos 7 dias. Independentemente do método de criopreservação e dos intervalos de tempo estudados, houve uma diminuição na viabilidade das CTMs após a criopreservação. Conclui-se que, no contexto deste estudo, as CTMs de ratas apresentam menor viabilidade após criopreservação, independentemente do método e do tempo adotados.

Palavras-chave: Criopreservação. Cultivo celular. Medula óssea

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária

Introdução

A terapia celular consiste na utilização de células com o propósito de aliviar ou eliminar os efeitos das doenças e quando essa terapia utiliza células-tronco, ela se mostra especialmente promissora, pois essas células são não especializadas e tem a capacidade de se transformarem em diversos tipos celulares quando estimuladas. Essas células têm sido aplicadas tanto na medicina humana quanto na veterinária para tratar condições como doenças cardiovasculares, osteoarticulares, dermatológicas e neoplásicas. Recentemente, houve uma crescente utilização da terapia com células-tronco em animais de estimação (BORGES; CALVET, 2014; SOUSA *et al.*, 2014; MENDONÇA *et al.*, 2022).

Dentre as células-tronco, as células-tronco mesenquimais (CTMs) são as mais utilizadas, sendo encontradas em muitos tecidos adultos, como medula óssea, tecido adiposo e placenta, e não estão sujeitas às condições éticas das células-tronco embrionárias (STERODIMAS *et al.*, 2010; MORONI; FORNASARI, 2013).

Dado os benefícios da terapia celular com CTMs, a técnica de criopreservação ganhou destaque. Essa técnica envolve congelar as células para que possam ser armazenadas por períodos prolongados, formando assim um banco de células viáveis para uso futuro em tratamentos regenerativos, tanto em humanos quanto em animais (GINANI *et al.*, 2012).

Apesar das pesquisas existentes para estabelecer protocolos de criopreservação, ainda não há um consenso sobre o melhor método para CTMs de ratos. Portanto, sugere-se mais estudos sobre criopreservação de CTMs da medula óssea (CTM-MO) de ratas para entender os mecanismos associados às mudanças físicas das células e reações químicas que causam danos durante a criopreservação, para que seja mais fácil anulá-los. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratas *Wistar* em diferentes formas, com armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) e congelamento gradativo com armazenamento

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

tanto em ultra-freezer (-80°C) quanto em nitrogênio líquido (-196°C), nos tempos 24 horas, 7 dias e 14 dias de criopreservação.

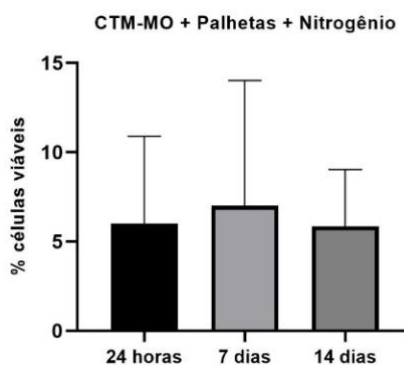
Metodologia

Todos os procedimentos experimentais foram executados segundo as recomendações e a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo sob protocolo nº 015/2020. Foram utilizadas quatro ratas Wistar com dois meses de idade eutanasiadas com sobredose de anestesia (Xilazina [0,15 mg/kg] + Quetamina [0,2 mg/kg] intramuscular) para extração das células da medula óssea de ossos longos (fêmures e tíbias) de forma asséptica. Após a extração, as células foram cultivadas em meio de cultura (DMEM enriquecido) com 10% de soro fetal bovino (SFB) em garrafas T75 a 37°C e 5% de CO₂ até atingirem 80% de confluência, por pelo menos quatro passagens. Antes da criopreservação, as células-tronco foram avaliadas quanto à viabilidade usando o teste de azul de Tripán. As células foram então submetidas ao processo de criopreservação em ultra-freezer (-80°C) e/ou nitrogênio líquido (-196°C), com meio de preservação (10% DMSO [dimetilsulfóxido] + 90% SFB). Os períodos de criopreservação foram: 24 horas, 7 dias e 14 dias, utilizando palhetas ou criotubos em diferentes combinações. Após a criopreservação, as células foram descongeladas em banho maria a 37°C por cerca de 1 minuto e avaliadas quanto à viabilidade novamente pelo teste de azul de Tripán. Para análise da viabilidade, as células foram centrifugadas, ressuspensas em meio, coradas e contadas. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de SNK (*Student Newman Keuls*).

Resultados

Com relação a análise de viabilidade de CTM-MO colocadas em palhetas e criopreservadas em nitrogênio líquido, observou-se que, independente do tempo de criopreservação, não houve diferença entre os grupos avaliados ($p>0,05$) (Figura 1).

Figura 1 - Viabilidade de CTM-MO colocadas em palhetas e criopreservadas em nitrogênio líquido durante 24 horas, 7 dias e 14 dias.



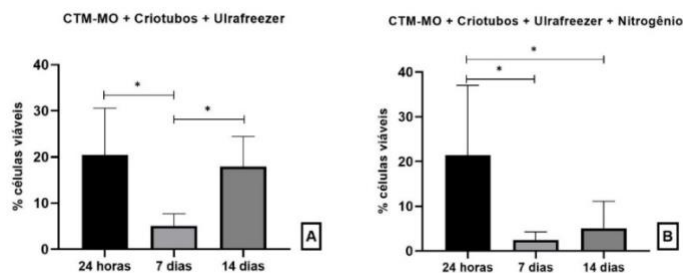
Fonte: o autor.

Quando foi avaliado a viabilidade das CTM-MO colocadas em criotubos e criopreservadas em ultra-freezer, observou-se que os tempos 24 horas e 14 dias foram semelhantes e apresentaram maior viabilidade em comparação aos 7 dias de avaliação ($p<0,05$) (Figura 2A). Enquanto ao se avaliar a viabilidade CTM-MO colocadas em criotubos e criopreservadas em ultra-freezer e nitrogênio líquido, observou-se que no tempo 24 horas houve maior viabilidade em comparação a 7 dias e 14 dias ($p<0,05$) (Figura 2B), sendo que 7 dias e 14 dias foram semelhantes entre si ($p>0,05$) (Figura 2B).

Ao se analisar a viabilidade de CTM-MO colocadas em criotubos e comparar as duas formas de criopreservação (ultra-freezer e ultra-freezer associado ao nitrogênio líquido), observou-se que, independentemente do tempo de criopreservação estudado e da forma de criopreservação adotada, não houve diferença entre os grupos avaliados ($p>0,05$) (Figura 3A, B e C).

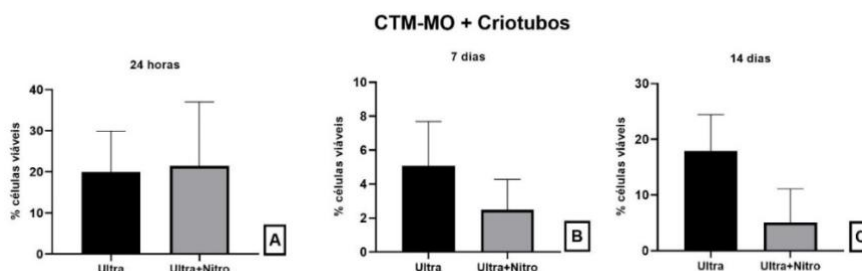
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 2 - Viabilidade de CTM-MO colocadas em criotubos e criopreservadas em ultra-freezer (A) e viabilidade de CTM-MO colocadas em criotubos e criopreservadas em ultra-freezer e nitrogênio líquido (B) durante 24 horas, 7 dias e 14 dias. * $p < 0,05$



Fonte: o autor.

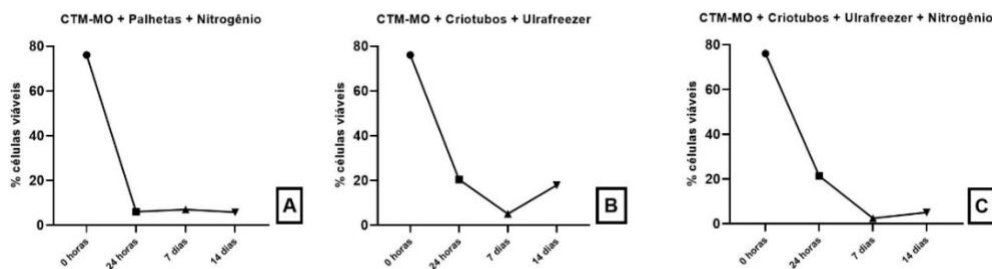
Figura 3 – Comparação da viabilidade de CTM-MO colocadas em criotubos e criopreservadas somente em ultra-freezer e em ultra-freezer e nitrogênio líquido no tempo de 24 horas (A), 7 dias (B) e 14 dias (C).



Fonte: o autor.

Com relação a análise da viabilidade de CTM-MO colocadas em palhetas e criopreservadas em nitrogênio líquido ao longo do tempo (0 horas, 24 horas, 7 dias e 14 dias), verificou-se que houve drástica diminuição da viabilidade do tempo 0 horas (76,11%) para 24 horas (6%) e que se manteve nos tempos 7 dias (7%) e 14 dias (5,84%) (Figura 4A). Quando analisada a viabilidade de CTM-MO colocadas em criotubos e criopreservadas em ultra-freezer ao longo do tempo constata-se a diminuição da viabilidade no tempo 24 horas (20,46%) e 7 dias (5,07%), mas depois ocorreu um pequeno aumento aos 14 dias (17,93%), mas ainda continuou bem inferior em comparação a antes da criopreservação (Figura 4B). Enquanto na viabilidade de CTM-MO colocadas em criotubos e criopreservadas em ultra-freezer e nitrogênio líquido ao longo do tempo houve diminuição da viabilidade no tempo 24 horas (21,44%) e 7 dias (2,49%), mas depois ocorreu discreto aumento aos 14 dias (5,07%), mas ainda continuou bem inferior em comparação a antes da criopreservação (Figura 4C).

Figura 4 - Comportamento ao longo do tempo (0 horas, 24 horas, 7 dias e 14 dias) da viabilidade das CTM-MO colocadas em palhetas e criopreservadas em nitrogênio líquido (A), colocadas em criotubos e criopreservadas em ultra-freezer (B) e colocadas em criotubos e criopreservadas em ultra-freezer e nitrogênio líquido (C).



Fonte: o autor.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

O presente trabalho observou, de maneira geral, que os métodos de criopreservação por vitrificação e congelamento gradual utilizados não foram eficientes para as CTM-MO de ratas *Wistar* com relação a viabilidade celular nos tempos 24 horas, 7 dias e 14 dias.

A viabilidade antes da criopreservação foi de 76,11% e isso foi realizado com o intuito de garantir que as células estivessem viáveis antes de iniciar o processo de criopreservação.

No presente estudo, para criopreservar as CTM-MO de ratas *Wistar*, um dos protocolos realizados foi o de congelamento rápido, também conhecido como vitrificação. Nesse método as células foram colocadas em palhetas com meio criogênico (10% de DMSO e 90% de SFB) e como forma de criopreservação foi utilizado o nitrogênio líquido, onde, imediatamente, as células foram imersas e armazenadas nos tempos 24 horas, 7 dias e 14 dias. Após o descongelamento e realizada a análise de viabilidade das CTM-MO, observou-se que, independente do tempo de criopreservação (24 horas, 7 dias e 14 dias), esse método de preservação celular não obteve resultado satisfatório, uma vez que o número de células viáveis diminuiu drasticamente desde as primeiras 24 horas. Neste sentido, o resultado da pesquisa realizada por Bahadori e colaboradores (2009) verificou que a criopreservação de CTM-MO de ratos utilizando o método de vitrificação em palhetas, foi promissor quando comparado ao presente estudo. Essa divergência de resultados provavelmente ocorreu, pois, os pesquisadores utilizaram uma quantidade maior de células que foram criopreservadas usando uma exposição em duas etapas as soluções de equilíbrio e vitrificação, a solução de equilíbrio foi composta de 20% de etilenoglicol e a solução de vitrificação por 40% de etilenoglicol, 18% de ficoll 70 e 0,3 M de sacarose. Em seguida, palhetas com as células foram imersas imediatamente em nitrogênio líquido onde ficaram armazenadas por dois meses. Após o descongelamento, as células passaram pelo teste de azul de Tripán e apresentaram viabilidade superior a 80%. Assim, acredita-se que essa diferença de resultados foi devido ao uso de meio de preservação distinto e a passagem das células em duas soluções de equilíbrio e vitrificação, o que não foi realizado no presente estudo.

Outro protocolo realizado na presente pesquisa para criopreservar CTM-MO de ratas *Wistar* foi o de congelamento lento, também chamado de gradativo. Nesse método foi utilizado criotubos com meio de preservação (10% de DMSO e 90% de SFB) e como forma de criopreservação foi utilizado o ultra-freezer ou ultra-freezer e nitrogênio líquido, onde as células foram armazenadas nos tempos 24 horas, 7 dias e 14 dias, depois de passarem pelo processo de resfriamento gradual. Após o descongelamento das células, quando foi avaliado a viabilidade de CTM-MO colocadas em criotubos e criopreservadas em ultra-freezer e ultra-freezer associado a nitrogênio líquido, observou-se que o tempo 24 horas em ambos os métodos foi o que apresentou maior viabilidade celular quando comparado a 7 dias e 14 dias. Demonstrando que a viabilidade celular diminuiu no decorrer dos tempos estudados e mesmo as poucas células que permaneceram viáveis nos tempos 7 dias e 14 dias, poderiam não sobreviver e talvez não pudessem ser recultivadas, porém mais estudos devem ser realizados.

Em outra pesquisa, realizada por Woods e colaboradores (2009), CTMs isoladas da polpa dentária de humanos foram criopreservadas por seis meses em ambos os métodos, tanto ultra-freezer quanto nitrogênio líquido, verificando-se que a capacidade de diferenciação celular pós-descongelamento foi idêntica nos dois grupos, apresentando-se de forma positiva já que não houve perda da funcionalidade das células. Acredita-se que os resultados foram diferentes do estudo em questão, pois foram utilizados CTMs de origem e espécie distintas, que por mais que tenham passado pelas mesmas formas de criopreservação, respondem de maneira diferente aos estresses sofridos no processo. Sendo assim, sugere-se que as CTMs isoladas da polpa dentária de humanos são mais resistentes ao processo de criopreservação do que as CTMs isoladas da medula óssea de ratas.

Isso corrobora Davies e colaboradores (2014), que realizaram um estudo comparando os efeitos do congelamento gradativo (utilizando 10% de DMSO) em células-tronco da medula óssea, do tecido adiposo e da polpa dentária de rato. Assim, verificaram que a criopreservação reduziu significativamente o número de células viáveis na medula óssea quando comparado aos outros tecidos. O que demonstra que as CTM-MO provavelmente são mais sensíveis ao processo de criopreservação.

Ao se analisar a viabilidade de CTM-MO colocadas em criotubos e comparar as duas formas de criopreservação (ultra-freezer e ultra-freezer associado ao nitrogênio líquido), observou-se que, independente do tempo de criopreservação fixado (24 horas, 7 dias e 14 dias) e da forma de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

criopreservação adotada (ultra-freezer ou ultra-freezer e nitrogênio líquido), ambos tiveram uma queda acentuada da viabilidade celular e não houve diferença entre os grupos avaliados.

Nesse sentido, o estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2008) avaliou a eficácia do método de congelamento lento, utilizando DMSO a 5% como meio de preservação. Ao efetuar o armazenamento criogênico de amostras de CTM-MO de ratos em criotubos, verificou-se que as taxas de sobrevivência celular, avaliadas pelo teste azul de Tripan, foram de 94,76% antes da criopreservação e 90,58% após o descongelamento. Por outro lado, ao utilizar o método de citometria de fluxo com anexina V conjugada a 7-amino-actinomicina, que é mais sensível na análise da viabilidade celular, as taxas de sobrevivência foram de 85,52% antes da criopreservação e 66,25% após o descongelamento. Pode-se verificar que tanto na presente pesquisa quanto no estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2008) o procedimento padrão de criopreservação não foi eficiente para as CTM-MO de ratos.

De acordo com Bahsoun e colaboradores (2019) diversas alterações podem ocorrer com as células-tronco no processo de criopreservação e impedir elas de continuarem viáveis. Essas alterações podem ir desde mudanças bioquímicas ou moleculares, como diminuição da atividade metabólica e alteração na expressão gênica, até a ruptura celular devido a formação de cristais de gelo. Acredita-se que uma das possíveis causas da baixa viabilidade celular encontrada no presente estudo sejam essas alterações citadas anteriormente como mudanças bioquímicas e moleculares.

Segundo Whaley e colaboradores (2021), a técnica de congelamento rápido tem mostrado resultados mais favoráveis na criopreservação de oócitos, ilhotas pancreáticas e células-tronco embrionárias. Por outro lado, o congelamento lento é recomendado para a criopreservação de hepatócitos, células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais. Então, diante do resultado obtido na pesquisa comparando o dois métodos de congelamento, talvez seja mais interessante investir em aprimorar a técnica de congelamento gradativo que é mais indicada pelos autores para as CTM-MO. Além disso, a eficiência dos processos pode ser ainda maior com a inclusão de etapas prévias à criopreservação, como a pré-incubação com glicose e antioxidantes, o encapsulamento em alginato e a seleção de células dentro de uma faixa ideal de idade e capacidade funcional. Isso tudo poderia contribuir para uma melhor criopreservação de CTM-MO que são células mais sensíveis em comparação com os outros tipos de células-tronco mesenquimais, como as do tecido adiposo, por exemplo.

Ademais, Erol e colaboradores (2021) concordam que apesar do DMSO ser amplamente utilizado na criopreservação de linhagens celulares e células-tronco, sua aplicação tem sido relacionada a certos efeitos tóxicos, tanto diretamente nas células quanto durante a infusão do produto com células-tronco. Como consequência disso, muitos grupos têm se dedicado a encontrar substitutos adequados para o DMSO que sejam igualmente eficazes, porém menos tóxicos. Por isso, uma possibilidade para tentar reverter a baixa viabilidade das CTM-MO criopreservadas no presente estudo seria a adoção de outros crioprotetores.

Diante desse cenário, é evidente a necessidade de realizar investigações adicionais no que diz respeito à criopreservação das células-tronco da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar*. O objetivo é compreender de maneira mais profunda os mecanismos subjacentes às alterações físicas das células e às reações químicas desencadeadas durante o processo de criopreservação, visando uma melhor capacidade de mitigação desses efeitos prejudiciais. Além disso, há a intenção de formular um protocolo de criopreservação eficaz, específico para a espécie estudada, que possa ser empregado de maneira prática.

Conclusão

Conclui-se, nas condições experimentais realizadas, que as CTM-MO de ratas apresentam menor viabilidade celular após a criopreservação, independente das formas, vitrificação com armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) e congelamento gradativo com armazenamento tanto em ultra-freezer (-80°C) quanto em nitrogênio líquido (-196°C), e dos tempos 24 horas, 7 dias e 14 dias de criopreservação adotados.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Referências

- BAHADORI, M. H. *et al.* Cryopreservation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells by two conventional and open-pulled straw vitrification methods. **Yakhteh Medical Journal**, v.11, n.3, p.317-326, 2009.
- BAHSOUN, S.; COOPMAN, K.; AKAM, E. C. The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review. **Journal of Translational Medicine**, v.17, n.1, p.1-29, 2019. DOI: 10.1186/s12967-019-02136-7.
- BORGES, J. F. P.; CALVET, C. O. A aplicação de células-tronco na odontologia. **Revista de Investigação Biomédica**, v.6, n.1, p.103-113, 2014. DOI: 10.24863/rib.v6i1.12.
- CARVALHO, K. A. T. *et al.* Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency. **Elsevier**, v.40, n.3, p.839-841, 2008. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.03.004.
- DAVIES, O. G. *et al.* The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. **Cryobiology**, v.69, n.2, p.342-347, 2014. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.08.003.
- EROL, O. D. *et al.* Efeitos de meios de armazenamento, suplementos e métodos de criopreservação na qualidade de células-tronco. **World Journal of Stem Cells**, v.13, n.9, p.1197, 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v13.i9.1197>.
- GINANI, F.; SOARES, D. M.; BARBOZA, C. A. G. Influência de um protocolo de criopreservação no rendimento in vitro de células-tronco derivadas do tecido adiposo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.27, n.3, p.359-363, 2012. DOI: 10.1590/S1983-51752012000300004.
- MENDONÇA, P. P. *et al.* Tópicos Especiais em Ciências Veterinárias. In: MENDONÇA, P. P. *et al.* **Tópicos Especiais em Ciências Veterinárias: Tratamento com células tronco na medicina veterinária**. XI. ed. Alegre - ES: CAUFES, 2022. v. 1, cap. Tratamento com células tronco na medicina veterinária, p. 374-391. ISBN 978-65-86981-36-0. Disponível em: <http://www.cienciasveterinarias.ufes.br/topicos-especiais-em-ciencia-animal-teca>. Acesso em: 11 fev. 2023.
- MORONI, L.; FORNASARI, P. M. Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. **Journal of Cellular Physiology**, v.228, n.4, p.680-687, 2013. DOI: 10.1002/jcp.24223.
- SOUSA, W. B. *et al.* Criopreservação de células tronco e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, v.1, n.1, p.45-56, 2014. DOI: 10.18554/rbcti.v1i1.737.
- STERODIMAS, A.; FARIA, J.; NICARETTA, B.; PITANGUY, I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v.63, n.11, p.1886-1892, 2010. DOI: 10.1016/j.bjps.2009.10.028.
- WHALEY, D. *et al.* Criopreservação: uma visão geral de princípios e considerações específicas de células. **Transplante de células**, v. 30, p.1-12, 2021. DOI: 10.1177/0963689721999617.
- WOODS, E. J. *et al.* Optimized cryopreservation method for human dental pulp derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. **Cryobiology**, v.59, n.2, p.150-157, 2009. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.06.005.