

CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO: REVISÃO DE LITERATURA

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, phillipandradec@outlook.com, luisa.vicentini@edu.ufes.br, leotrivilin@gmail.com, jankerle@gmail.com

Resumo

Devido ao aumento na produção de células-tronco em larga escala para utilização na terapêutica de enfermidades, faz-se necessário o uso da criopreservação para preservar as células por longos períodos, sem que haja comprometimento da sua viabilidade e funcionalidade após o congelamento. Entretanto, ainda existem impasses que devem ser enfrentados, como o desenvolvimento de protocolos de criopreservação eficientes para que seja viável criopreservar células-tronco, já que o efeito do congelamento sobre essas células ainda é pouco conhecido e necessita ser cada vez mais estudado. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica criteriosa a respeito da criopreservação de células-tronco por meio da coleta de informações em plataformas de dados, como Google Acadêmico, Periódicos Capes e Scielo, utilizando os descritores: “cryopreservation”, “mesenchymal stem cells” e “cryobanks”. Foram selecionadas 24 publicações para esta revisão bibliográfica e concluiu-se que a mesma está alinhada com os principais autores da área e poderá auxiliar na escolha do protocolo de criopreservação mais adequado para as células-tronco.

Palavras-chave: Criopreservação. Células-tronco mesenquimais. Criobancos

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária

Introdução

A terapia celular consiste, de maneira sucinta, na utilização de células na terapêutica e visa amenizar ou tratar os efeitos das doenças no organismo tanto de humanos quanto de animais. Essa terapia quando realizada com o uso de células-tronco é muito promissora, uma vez que essas são células indiferenciadas que a partir de um estímulo possuem a capacidade única de se diferenciarem em outros tipos celulares especializados. Ademais, podem ser empregadas tanto na medicina humana quanto na veterinária para o tratamento de inúmeras enfermidades, como neurológicas, cardiovasculares, osteoarticulares, dermatológicas, neoplásicas, e tem se notado uma expansão no uso da terapia celular com células-tronco em animais de estimação nos últimos anos (BORGES; CALVET, 2014; SOUSA *et al.*, 2014; MENDONÇA *et al.*, 2022).

Quando se refere a essa modalidade terapêutica, as células-tronco mesenquimais (CTMs) são as mais utilizadas em razão de serem encontradas na maioria dos tecidos adultos e poderem ser isoladas de diversos tecidos como medula óssea, tecido adiposo e placenta, além de não terem entraves bioéticos como ocorre com as células-tronco embrionárias (CTEs). Os efeitos terapêuticos das CTMs no tratamento de doenças se dá devido ao principal mecanismo de ação delas que é secretar citocinas e fatores de crescimento que possuem atividade parácrina e autócrina (GNECCHI *et al.*, 2008; STERODIMAS *et al.*, 2010; MORONI; FORNASARI, 2013; ALMEIDA JÚNIOR; BARBOZA, 2015; SANTOS, 2022).

Em virtude dos inúmeros benefícios que a terapia celular com CTMs proporciona, está em voga um método de conservação chamado criopreservação. Essa técnica consiste no congelamento celular e faz com que o uso das células-tronco possa ser prolongado, formando assim um banco de células viáveis para serem utilizadas no futuro para o tratamento de enfermidades, tanto em humanos quanto em animais, contribuindo para o avanço da medicina regenerativa (GINANI *et al.*, 2012; SANTOS, 2022).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Diante do exposto e devido a produção de CTMs em larga escala, observou-se a necessidade de criar bancos onde se conservasse as células a temperaturas negativas por longos períodos, dando origem aos bancos de criopreservação e armazenamento celular (HUNT, 2019). Para isso, se tornou substancial pesquisar maneiras de criopreservar as células de forma eficiente, sem comprometer a sua viabilidade e função pós congelamento. Ademais, ainda existem impasses que devem ser enfrentados, como o desenvolvimento de mais protocolos de criopreservação eficazes, já que o efeito do congelamento sobre as células ainda é pouco conhecido e necessita ser cada vez mais estudado. Portanto, o presente estudo teve como objetivo realizar revisão bibliográfica a respeito da criopreservação de células-tronco por meio da coleta de informações em plataformas de dados.

Metodologia

Este trabalho baseou-se na coleta de dados a partir de uma revisão bibliográfica criteriosa sobre o assunto. Foram realizadas buscas em artigos científicos publicados entre 2006 e 2022, além do uso das plataformas de dados: Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br/?hl=pt>), Periódicos Capes (<https://www.periodicos.capes.gov.br/>), Scielo (<https://scielo.org/>) e utilizando os descritores: “cryopreservation”, “mesenchymal stem cells” e “cryobanks”. O critério de inclusão para seleção das publicações foram trabalhos que realizaram o procedimento de criopreservação em células-tronco mesenquimais e avaliaram a viabilidade celular após o descongelamento. Já o critério de exclusão foi utilizado em artigos que não tinham conteúdo na íntegra que se relacionavam diretamente com o objetivo do estudo.

Resultados

Foram encontrados 24 artigos científicos, e analisando todas as publicações em relação ao critério de inclusão definido, foram selecionados 6 artigos científicos. Os resultados apresentados em cada um dos artigos foram organizados de forma resumida na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1 - Visão geral de diferentes protocolos de criopreservação para células-tronco.

Autor	Origem das células-tronco	Solução crioprotetora	Forma de congelamento	Duração do congelamento	Resultados da viabilidade pós-descongelamento
Woods <i>et al.</i> (2009)	Polpa dentária de humano	0,5 M de etilenoglicol, 1 M de propilenoglicol e 1,5 M DMSO	Resfriamento com taxa de 1°C/min em suspensão de isopropanol em freezer mecânico a -85°C por 24h e depois armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C	6 meses	Não afetada após criopreservação
Ginani <i>et al.</i> (2012)	Tecido adiposo de camundongo	90% SFB + 10% DMSO	Ultrafreezer (-80°C)	30 dias	Não afetada após criopreservação
Davies <i>et al.</i> (2014)	Tecido adiposo, medula óssea e polpa dentária de ratos	90% SFB + 10% DMSO	4°C por 1h, depois a -20°C por 2h, -80°C durante a noite e -136°C em nitrogênio líquido	14 dias	Viabilidade ligeiramente reduzida (exceto em CTMs do tecido adiposo) e aumento na expressão de marcadores de superfície de CTMs
Duan e Lopez (2016)	Tecido adiposo subcutâneo e infrapatelar de cães	10% DMEM/F-12 + 10% DMSO + 80% SFB	Nitrogênio líquido (-196°C)	30 dias	Não houve diferença entre os tecidos, mas ambos tiveram alteração de ultraestrutura, imunofenótipo e expressão do fator de transcrição
Bahari <i>et al.</i> (2018)	Células Caco-2 intestinais humanas, células HeLa de câncer cervical humano, células IEC-18 intestinais de rato	90% DMEM (suplementado) + 10% DMSO	Congelamento lento utilizando freezer programável e armazenamento em ultrafreezer (-80°C)	24 horas	Aumento significativo da viabilidade celular
Raik <i>et al.</i> (2019)	Tecido dentário de humano	90% SFB + 10% DMSO	Ultrafreezer (-80°C)	5 anos	Não afetada após criopreservação

Fonte: o autor.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

De maneira geral, o processo de criopreservação consiste nas seguintes etapas: exposição das células a solução crioprotetora ideal; redução gradativa da temperatura (congelamento lento) ou súbita (vitrificação); armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) ou ultra-freezer (-80°C) por tempo indeterminado; descongelamento e diluição ou remoção do agente crioprotetor. Qualquer falha durante essas etapas pode comprometer o sucesso da criopreservação, principalmente na última fase, visto que em temperatura fisiológica ou mesmo ambiente ocorre a intensificação dos efeitos tóxicos do agente crioprotetor, isso acontece devido a produção de metabólitos secundários indesejáveis, como radicais livres, que causam lesão celular e influenciam diretamente na viabilidade de qualquer material biológico (FAHY, 2010).

A necessidade de melhoria nos protocolos de criopreservação de CTMs tem o objetivo de controlar os fatores que influenciam no processo. Por isso, é imprescindível para o sucesso da técnica analisar as diferenças entre os tipos celulares, uma vez que a resposta a criopreservação pode variar de acordo com as células de uma determinada espécie e/ou tecido. Isso ocorre em razão das disparidades quanto a composição biológica e física das mesmas, que contribuem para impasses relacionados as funções metabólicas e a viabilidade celular. Ademais, é fundamental a seleção adequada da solução crioprotetora ideal a depender do protocolo de criopreservação de escolha (HUNT, 2019; SANTOS, 2022).

Essa diferença nos resultados da criopreservação devido ao uso de CTMs de diferentes tecidos pode ser facilmente observada quando se analisa o estudo realizado por Davies e colaboradores (2014), onde eles avaliaram por 14 dias, utilizando DMSO a 10% como crioprotetor, o efeito da criopreservação na morfologia e viabilidade de células derivadas da medula óssea, polpa dentária e tecido adiposo de ratos, e verificaram uma redução significativa no número de células viáveis tanto da medula óssea quanto da polpa dentária, mas não observaram efeito sobre as células do tecido adiposo. Isso se deve a presença de uma população de células resistentes ao estresse nesse tecido, diferenciadoras de várias linhagens e que são capazes de suportar estresses extremos, dentre eles as baixas temperaturas (DAVIES *et al.*, 2014).

Em relação a utilização de CTMs do mesmo tecido, mas de regiões diferentes do corpo, tem-se a pesquisa feita por Duan e Lopez (2016) que estudou o efeito da criopreservação em CTMs caninas do tecido adiposo infrapatelar e subcutâneo durante 30 dias, utilizando como solução de preservação DMEM/F-12 a 10%, DMSO a 10% e SFB (soro fetal bovino) a 80%, e não obteve diferença na expansão e na multipotencialidade das células nos dois tecidos. No entanto, outro estudo feito por Ginani e colaboradores (2012), também realizado analisando CTMs do tecido adiposo, mas dessa vez de camundongos criopreservadas com SFB e 10% de DMSO por 30 dias, apresentou um padrão de crescimento celular crescente em ambos os grupos (não criopreservados e criopreservados). Entretanto, a viabilidade celular e os danos nucleares entre os grupos estudados não obtiveram diferença significativa.

Outro fator importante é a escolha dos agentes crioprotetores, que são essenciais no processo de criopreservação de células e tecidos, a ponto da prática de congelamento se tornar inviável caso não sejam utilizados, uma vez que atuam reduzindo os danos causados as células quando estão sendo criopreservadas. Os agentes crioprotetores são divididos em dois tipos: (1) intracelulares ou permeáveis, e (2) extracelulares ou não permeáveis. O primeiro tipo são os mais utilizados e eficientes e tem-se como exemplos o dimetilsulfóxido (DMSO) e o etilenoglicol (EG) (HUNT *et al.*, 2011; LEÓN-QUINTO *et al.*, 2014; SILVA; RODRIGUES; SILVA, 2017; HUNT, 2019). Entretanto, de acordo com estudos realizados por Bahari e colaboradores (2018) para se obter uma alta viabilidade celular pós descongelamento a concentração recomendada de DMSO é 10%, acima dessa concentração esse crioprotetor tem um efeito tóxico. Ademais, Ginani e colaboradores (2012) objetivaram em seu estudo avaliar a influência de um protocolo de criopreservação na proliferação das células-tronco derivadas do tecido adiposo de camundongos. O resultado obtido foi que o protocolo realizado, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% durante 30 dias, mostrou-se efetivo e manteve a integridade das células-tronco do tecido adiposo após a criopreservação, permitindo seu armazenamento para uso posterior.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Enquanto a pesquisa realizada por Santos e colaboradores (2022), avaliou os efeitos das diferentes soluções de congelamento sobre a criopreservação de células-tronco advindas do tecido adiposo de cães nos tempos 4, 12, 24, 48 e 96 horas e concluiu que todos os cinco tratamentos realizados com diferentes crioprotetores possibilitaram a retomada das funções normais das células após a descongelamento e recultivo. Esses resultados são importantes para o estabelecimento de protocolos de criopreservação de CTMs destinados a cada uma das espécies estudadas.

Hodiernamente, duas técnicas são empregadas para criopreservar células, o congelamento lento e o congelamento rápido (vitrificação), sendo métodos convencionais de crioconservação que utilizam a adição de crioprotetor. Em ambos, após o processo de solidificação o material biológico congelado deve permanecer em uma temperatura de criopreservação pelo período de tempo que for necessário até sua utilização em alguma terapia, por exemplo. Normalmente, as CTMs são armazenadas em ultra-freezers há -80°C ou nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C (RAIK *et al.*, 2019). Segundo pesquisa realizada por Woods e colaboradores (2009) utilizando CTMs isoladas da polpa dentária de humanos que foram criopreservadas por seis meses em ambos os métodos, tanto ultra-freezer quanto nitrogênio líquido, verificou-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.

Grande parte dos protocolos de criopreservação utilizam uma taxa de congelamento controlada, fazendo uso, geralmente, de ultra-freezer a -80°C para armazenar as células-tronco. Sob essa perspectiva, Kumar; Bhattacharyya; Rattan (2015) estudaram métodos de criopreservação a -80°C empregando DMSO para armazenamento de CTMs da polpa dentária de humano por um ano. Foram avaliados diferentes parâmetros biológicos e após o descongelamento, as células criopreservadas obtiveram capacidade de diferenciação em adipócitos, osteoblastos e células neurais. A partir dessas informações foi possível concluir que o congelamento rápido a uma temperatura de -80°C é tão eficaz quanto o congelamento lento. Ademais, Ginani e colaboradores (2016) pesquisaram o efeito de um método de criopreservação utilizando o congelamento lento na proliferação de CTMs de dentes decíduos esfoliados humanos mantidas em DMSO 10% diluído em SFB e submetidas ao protocolo de conservação a seguir: duas horas a 4°C , 18 horas a -20°C e depois a -80°C por dois intervalos de tempo de 30 e 180 dias, respectivamente. Como resultados, não foram observadas divergências relevantes entre os grupos de células-tronco criopreservadas e o grupo controle, sendo o protocolo utilizado considerado adequado para o armazenamento do tipo celular estudado.

Enquanto em relação a criopreservação em nitrogênio líquido, Ding e colaboradores (2010) verificaram que a criopreservação de CTMs da papila apical humana em nitrogênio líquido não afetou as propriedades biológicas e imunológicas das células, o que corrobora com a ideia de que esse método também é eficiente. Outro estudo realizado por Zhang e colaboradores (2006), analisou o efeito da criopreservação em nitrogênio líquido sobre CTMs da polpa dentária humana de terceiros molares, após 30 dias, em relação a capacidade de diferenciação após descongelamento. No final do experimento foi possível verificar que as células-tronco foram capazes de se diferenciarem em linhagens osteogênicas, odontogênicas, miogênicas, condrogênicas, adipogênicas e neurogênicas, após a criopreservação. Somado a isso, uma pesquisa realizada por Papaccio e colaboradores (2006) comparando a capacidade de diferenciação das CTMs pulpare de ratos após um período de dois anos de criopreservação em nitrogênio líquido, concluiu que as células criopreservadas foram capazes de se diferenciarem e produzirem tecido ósseo, mesmo após um maior período de tempo.

Conclusão

Conclui-se que a precaução empregada ao elaborar o procedimento de criopreservação é de extrema importância, visto que o objetivo ao criopreservar células-tronco para aplicação terapêutica é obter um produto final com boa viabilidade e capacidade de expansão após descongelamento. Por isso, é crucial conduzir a criopreservação das células-tronco com a devida diligência. Antes de realizar o transplante das células no receptor, é essencial realizar uma avaliação minuciosa da viabilidade e outras características celulares, a fim de prevenir quaisquer problemas que possam prejudicar a terapia, independentemente da espécie do paciente. Além disso, é evidente que são necessários estudos contínuos nesse campo. Afinal, é preciso desenvolver protocolos de criopreservação eficazes para permitir o armazenamento prolongado das células-tronco sem comprometer sua viabilidade e

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

funcionalidade. Isso é essencial para garantir sua futura aplicação bem-sucedida. Em resumo, apesar dos avanços alcançados na criopreservação de células-tronco, ainda existe a necessidade de explorar e aprimorar os métodos e protocolos existentes nessa área.

Referências

- ALMEIDA JÚNIOR, J. C.; BARBOSA, J. F. Células tronco e odontologia. **Revista UNINGÁ Review**, v.21, n.1, p.40-43, 2015. DOI: 10.46311/2178-2571.
- BAHARI, L.; BEIN, A.; YASHUNSKY, V.; BRASLAVSKY, I. Directional freezing for the cryopreservation of adherent mammalian cells on a substrate. **Plos One**, v.13, n.2, p.1-17, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0192265.
- 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.
- 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.
- DING, G. *et al.* Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. **Journal of Cellular Physiology**, v.223, n.2, p.415-422, 2010. DOI: 10.1002/jcp.22050.
- DUAN, W.; LOPEZ, M. J. Effects of cryopreservation on canine multipotent stromal cells from subcutaneous and infrapatellar adipose tissue. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.12, n.12, p.257-268, 2016. DOI: 10.1007/s12015-015-9634-4.
- FAHY, G. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v.60, n.3, p.545-553, 2010. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.05.005.
- GINANI, F. *et al.* Effect of a cryopreservation protocol on the proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.74, n.8, p.598-604, 2016. DOI: 10.1080/00016357.2016.1224919.
- 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.
- GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V. J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, v.103, n.11, p.1204-1219, 2008. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176826.
- HUNT, C. J. Technical considerations in the freezing, low-temperature storage and thawing of stem cells for cellular therapies. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v.46, n.3, p.134-150, 2019. DOI: 10.1159/000497289.
- HUNT, C. J. Cryopreservation of human stem cells for clinical application: a review. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v.38, n.2, p.107-123, 2011. DOI: 10.1159/000326623.
- KUMAR, A.; BHATTACHARYYA, S.; RATTAN, V. Effect of un-controlled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. **Cell and Tissue Banking**, v.16, n.4, p.513-522, 2015. DOI: 10.1007/s10561-015-9498-5.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

- LEÓN-QUINTO, T. *et al.* Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v.68, n.2, p.227-233, 2014. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.02.001.
- 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.
- PAPACCIO, G. *et al.* Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. **Journal of Cellular Physiology**, v.208, n.2, p.319-325, 2006. DOI: 10.1002/jcp.20667.
- RAIK, S. *et al.* Assessment of post-thaw quality of dental mesenchymal stromal cells after long-term cryopreservation by uncontrolled freezing. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v.191, n.2, p.728-743, 2019. DOI: 10.1007/s12010-019-03216-6.
- SANTOS, B.A. **Efeitos das diferentes soluções de congelação sobre a criopreservação de células-tronco mesenquimais caninas**. Orientadora: Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim. 2022. 88p. Defesa de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.
- SILVA, A. A. R.; RODRIGUES, C. G.; SILVA, M. B. Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular. **Revista da Biologia**, v.17, n.1, p.13-18, 2017.
- 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.
- 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.
- ZHANG, W. *et al.* Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. **Tissue Engineering**, v.12, n.10, p.2813-2823, 2006. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2813.