

ESPECTROSCOPIA NIR E ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADAS À IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS ESPECTRAIS DE CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DO FLUIDO AMNIÓTICO DE CAPRINOS

(NIR spectroscopy and multivariate analysis applied to the identification of spectrum groups of trunk cells derived from goats amniotic fluid)

Alessandra Façanha BEZERRA^{1*}; Guilherme Araújo KUBOTA¹; Denilson Pires FERNANDES²; Assis Rubens MONTENEGRO²; Rafael ROSSETTO¹; Davide RONDINA¹

¹Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária (UECE), Av. Dr Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP: +60.740-000; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV – UECE). *E-mail: alessandra.facanha@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo preditivo através de técnica multivariada para diferenciar meios de cultivo de células-tronco cultivadas *in vitro* e criopreservadas de acordo com os perfis de absorvância obtidas por NIR. Para tanto, foram coletados meios de cultivo de células-tronco oriundo do fluido amniótico de fetos caprinos, antes e após o processo de criopreservação por vitrificação, e submetidos à análise pelo NIR. Foi possível estimar com alta acurácia o tratamento empregado nas amostras, gerando uma impressão digital dos meios de cultivo *in vitro* de células criopreservadas ou não.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, espectros, modelo preditivo.

SUMMARY

The objective of this work was to develop a predictive model through a multivariate technique to differentiate culture media from stem cells cultured *in vitro* and cryopreserved according to the absorbance profiles obtained by NIR. For this purpose, culture media were collected from stem cells from the amniotic fluid of goat fetuses, before and after cryopreservation by vitrification, and submitted to NIR analysis. It was possible to estimate with high accuracy the treatment used in the samples, generating a fingerprint of *in vitro* culture media of cryopreserved cells or not.

Key words: *In vitro* culture, spectra, predictive model.

INTRODUÇÃO

Devido as suas inúmeras possibilidades terapêuticas, as células-tronco são amplamente aplicadas em diversas áreas da medicina humana e veterinária. As pesquisas vigentes demonstram que a sua utilização consiste numa ferramenta promissora, principalmente, para a engenharia de tecidos, formação de bancos de germoplasma e terapia regenerativa (KOLAPARTHY *et al.*, 2015). Adicionalmente, as mesmas se destacam por estarem presentes em diversos tecidos, serem indiferenciadas com elevada

*Endereço para correspondência:
alessandra.facanha@hotmail.com

capacidade de proliferação e auto-renovação, e apresentarem características imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam sua utilização terapêutica (FAVARON *et al.*, 2015; MARTINELLI *et al.*, 2016). Por ser considerado um tipo celular extra-embriônico, naturalmente descartado e de acesso relativamente fácil para coleta, o líquido amniótico (LA) torna-se uma importante fonte alternativa de células tronco, podendo ser criopreservadas para que possam, posteriormente, ser processadas, isoladas e/ou expandidas (DE COPPI *et al.*, 2007; PRUSA *et al.*, 2003).

Dessa maneira, se faz necessária a utilização de técnicas que permitam estabilizar e manter as características originais inalteradas destas células em temperaturas criogênicas com o uso de protocolos eficientes de criopreservação, mantendo a sua viabilidade e potencial de expansão em cultivo *in vitro* após descongelamento (HENNES, 2015). Contudo, apesar dos avanços possibilitados com a utilização das células tronco e sua conservação, ainda é observada uma carência de dados referentes à predição da qualidade quando cultivadas *in vitro* e criopreservadas.

A tecnologia de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), por sua vez, vem emergindo como uma tecnologia analítica automatizada de alto rendimento na investigação de perfis metabólicos de forma rápida, não invasiva e sem uso de reagentes. A técnica juntamente com o uso de métodos estatísticos multivariados, permite extrair informações quantitativas e quimicamente significativas de diferentes amostras, sendo aplicada, por exemplo, no monitoramento da composição de meios de cultivo celulares *in vitro* (LI *et al.*, 2015).

Diante disso, no presente estudo objetivou-se avaliar os meios de cultivo *in vitro* de células-tronco oriundos do LA criopreservadas (Tratamento) e não criopreservadas (Controle) pela análise no NIR e desenvolver um modelo preditivo capaz de diferenciar os grupos avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização, condições e adaptação animal: Foram utilizadas 9 cabras Anglo-Nubianas prenhes, com idade entre 2 e 3 anos, pesos e escore da condição corporal homogêneos, oriundos do mesmo rebanho. Os animais foram mantidos na Fazenda de Experimentação Agropecuária Dr. Esaú Accioly Vasconcelos, Guaiúba, Ceará, pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, e submetidos previamente a um período de adaptação de 30-45 dias as condições ambientais e alimentares antes da indução ao estro e inseminação.

Coleta do fluido amniótico, Isolamento e Cultivo *in vitro*: Foi realizada aminocentese com seringa e agulha estéril para a coleta de 10 ml do LA de fetos entre o 70-80 dias de gestação. Após a colheita, todas as amostras foram centrifugadas 4000 rpm por 10 min. O *pellet* de células obtido foi ressuspensão em meio MEM + 15% SFB + 2% penicilina/estreptomicina + 1% anfotericina transferido para tubos cônicos de 15 mL estéreis, armazenados e transportados a 15 °C até o laboratório localizado na cidade de

*Endereço para correspondência:
alessandra.facanha@hotmail.com

Fortaleza/CE. No laboratório, as amostras foram lavadas duas vezes por centrifugação a 1750 rpm/10 min, no qual o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspense em meio contendo DMEM + 15% SFB. As células-tronco mesenquimais (CTMs) procedentes de cada animal foram cultivadas imediatamente após o isolamento em placas de 24 poços (DMEM + 15% SFB+ 2% pen/estrep + 1% Anfotericina) para a expansão celular. Após a adesão das células, os meios foram trocados a cada 48-72 horas e duas passagens (P2) foram realizadas quando observada uma confluência de 80%. Após a confirmação de que a dissociação entre as células havia ocorrido (tripsinização), as amostras foram centrifugadas e lavadas duas vezes no meio citado para completa remoção da tripsina. Os *pellets* foram então ressuspensos em 1 mL de meio e divididos em duas alíquotas e recolocados em duas placas de petri de 30 mm.

Criopreservação e Descongelamento: As CTMs derivado do LA em P2 foram centrifugadas, e 20.000 células foram ressuspensas em meio DMSO (45% DMEM + 45% SFB + 10% DMSO), envasadas em palhetas de 0,25 mL e vitrificadas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente descongelados para avaliação da viabilidade. Para o descongelamento, as palhetas de CTMs foram retiradas do botijão de nitrogênio líquido e aquecidas em banhomaria a 37°C. Em seguida, seu conteúdo foi transferido para um tubo cônico de 15 mL contendo 2 mL de meio de cultivo (DMEM acrescido de 15% SFB). O tubo, então, foi centrifugado a 342 g por 10 min e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspense em 1 mL de meio de cultivo e avaliado quanto a viabilidade por azul de trypan.

Análise no NIR e Estatística: Para a análise no NIR (DA 7200 Perten[®]), foram coletados os meios de cultivo *in vitro* de CTMs antes e após o processo de vitrificação, utilizando o comprimento de onda entre 955 a 1650 nm. Os dados obtidos foram utilizados para calibração e validação do método, sendo os espectros avaliados por análise multivariada quanto ao efeito do tratamento nas amostras. Os espectros foram avaliados por análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), utilizando o pacote mixOmics (ROHART *et al.*, 2017) no ambiente de programação R (R CORE TEAM, 2017). No total foram realizadas 100 rotinas de simulação utilizando diferentes grupos de treinamento e teste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após avaliação dos espectros pela PCA, foi observado que o primeiro componente (PC1) e o segundo componente (PC2) retiveram 63% e 30% da variância total dos dados, respectivamente. Ademais, através da avaliação dos escores do PC1 e PC2 das unidades experimentais, pode-se constatar uma separação entre os dois grupos experimentais, em que as observações do grupo controle apresentaram escores positivos para o PC1, enquanto o grupo tratamento apresentaram valores negativos (Fig. 1A). A análise dos espectros do NIR, apresentados na Fig. 1B, revela que na região de comprimentos de ondas entre 1.000 e 1.250 nm tiveram as maiores cargas (loadings) para o

*Endereço para correspondência:
alessandra.facanha@hotmail.com

PC1, sendo que para o PC2, os comprimentos de ondas com maiores cargas foram entre 1.520 e 1.650 nm. Contudo, no estudo não foi possível investigar quais os metabólitos essas regiões são atribuídas.

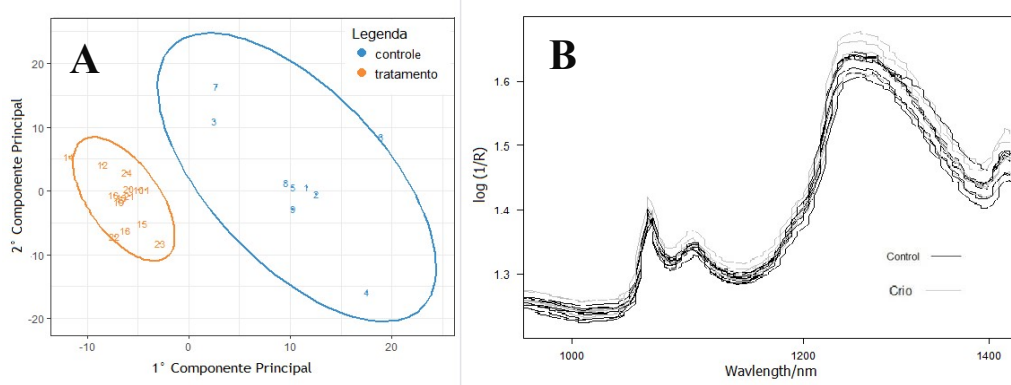


Figura 1: Escores dos componentes principais e espectros do NIR dos grupos de tratamento.

A. Escores do primeiro e segundo componentes principais do grupo tratamento (laranja) e controle (azul). B. Espectros do NIR dos grupos tratamento (cinza claro) e controle (cinza escuro).

Contudo, no estudo não foi possível investigar quais os metabólitos essas regiões identificadas são atribuídas. Nesse contexto, se faz necessária a realização de estudos complementares com objetivo de elucidar quais metabólitos ou alterações físico-químicas existem de diferente entre os grupos que refletiu em variações significativas na absorvância nesses comprimentos de ondas.

A capacidade preditiva de modelo é avaliada através das medidas de sensibilidade (falso negativo), especificidade (falso positivo) e acuracidade (todos os erros possíveis). No estudo, os valores de sensibilidade, especificidade e acuracidade obtidos foram de 99,5% (apenas uma predição errada), 100% e 99,8%, respectivamente.

Ademais, das 524 predições obtidas das 100 rotinas realizadas de simulação utilizando diferentes grupos de treinamento e teste, 523 observações tiveram seu grupo corretamente predito (controle ou tratamento).

CONCLUSÕES

Dessa maneira, o uso do NIR como ferramenta de análise química associado com a PLS-DA foi possível estimar com alta acurácia o tratamento empregado nas amostras de forma simples e rápida, gerando uma impressão digital dos meios de cultivo *in vitro* de células criopreservadas ou não.

REFERÊNCIAS

DE COPPI, P.; BARTSCH, G.; SIDDIQUI, M.M.; XU, T.; SANTOS, C.C.; PERIN, L.; MOSTOSLAVSKY, G.; SERRE, A.C.; SINYDER, E.Y.; YOO, J.J.; FURTH, M.E.; SOKER, S.;

*Endereço para correspondência:
alessandra.facanha@hotmail.com

ATALA, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, v.25, n.1, p.100–106, 2007.

FAVARON, P.; CARVALHO, R.C.; BORGHESI, J.; ANUNCIAÇÃO, A.R.; MIGLINO, M.A. The amniotic membrane: development and potential applications—a review. *Reproduction in Domestic Animal*, v.50, n.6, p.881-892, 2015.

HENNES, A; GUCCIARDO, L.; ZIA, S.; LESAGE, F.; LEVÈVRE, N.; LEWI, L.; VORSSELMANS, A.; COS, T.; LORIES, R.; DEPREST, J.; TOELEN, J. Safe and effective cryopreservation methods for long-term storage of human amniotic fluid-derived stem cells. *Prenatal Diagnosis*, v.35, n.5, p.456-462, 2015.

KOLAPARTHY, L.K.; SANIVARAPU, S.; MOOGLA, S.; KUTCHAM, R.S. Adipose tissue—adequate, accessible regenerative material. *International Journal of Stem Cells*, v.8, n.2, p.121-129, 2015.

LI, X.; XU, Y.; FU, J.; ZHANG, W.B.; LIU, S.Y.; SUN, X.X. Non-invasive metabolomic profiling of embryo culture media and morphology grading to predict implantation outcome in frozen-thawed embryo transfer cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.32, n.11, p.1597-1605, 2015.

MARTINELLI, D.; PEREIRA, R.C.; MOGNI, M.; BENELI, R.; MASTROGIACOMO, M.; COVIELLO, D.; CANCEDDA, R.; GENTILI, C. A humanized system to expand *in vitro* amniotic fluid-derived stem cells intended for clinical application. *Cytotherapy*, v.18, n.3, p.438-451, 2016.

PRUSA, A.R.; MARTON, E.; ROSNER, M.; BETTELHEIM, D.; LUBEC, G.; POLLAK, A.; BERNASCHEK, G.; HENGSTSCHLÄGER, M. Neurogenic cells in human amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, n.191, p.309-314, 2004.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017.

ROHART, F.; GAUTIER, B.; SINGH, A.; LÊ, CAO, K.A. mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Computational Biology*, v.13, n.11, p.1005752, 2017.