

EFEITO DO DMSO E GLICEROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO DE FETOS CAPRINOS

*(Effect of DMSO and glycerol in cryopreservation of mesenchymal
trunk cells derived from amniotic fluid of caprine fetus)*

Yvyna Byanca Simões de LIMA¹; Juliana Gomes VASCONCELOS¹; Juliana
Paula Martins ALVES²; César Carneiro Linhares FERNANDES¹;
Davide RONDINA¹; Rafael ROSSETTO¹

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

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade e taxa de proliferação de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas do líquido amniótico (LA) após cultivo *in vitro*, e o efeito de dois agentes crioprotetores. Foram utilizadas 9 cabras prenhes. As amostras foram colhidas de fetos caprinos por laparotomia, e delas obtidos as (CTMs) e submetidas ao cultivo *in vitro*. Posteriormente, uma fração das células foi criopreservada em meio DMSO (dimetilsulfóxido) ou glicerol e vitrificadas para posterior avaliação da viabilidade. O meio DMSO promoveu melhores taxas de sobrevivência celular preservando as características de pluripotencialidade e de replicação *in vitro*.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, criopreservação, líquido amniótico.

SUMMARY

The objective of the study was to evaluate the viability and proliferation rate of mesenchymal stem cells (MTCs) derived from amniotic fluid (LA) after *in vitro* culture, and the effect of two cryoprotective agents. 9 pregnant goats were used. The samples were collected from goat fetuses by laparotomy, and from them (CTMs) were obtained and cultured *in vitro*. Subsequently, a fraction of the cells were cryopreserved in DMSO (dimethylsulfoxide) or glycerol medium and vitrified for further evaluation of viability. The DMSO medium promoted better cell survival rates while preserving the characteristics of pluripotency and replication *in vitro*.

Key words: Mesenchymal stem cells, cryopreservation, amniotic fluid.

INTRODUÇÃO

A pesquisa com célula tronco cresceu muito nos últimos anos devido ao seu potencial na regeneração de tecidos e órgãos lesados e aplicação no campo terapêutico (DE VITA, 2011; PRATHEESH *et al.*, 2017). Desta forma, têm surgido inúmeras possibilidades para obtenção de células tronco, com destaque para as células estaminais

*Endereço para correspondência:

yvynabyanca@gmail.com

extra-embrionárias derivadas dos anexos fetais, que emergiram como uma alternativa eficiente para obtenção de células-tronco a partir de tecidos anteriormente descartados, como o líquido amniótico (LA) (PRATHEESH *et al.*, 2013).

Suas propriedades fetais, potencial de desenvolvimento e falta de tumorigenicidade tornam essas células uma opção atrativa para terapia celular regenerativa e estudos de engenharia de tecidos (MARCUS e WOODBURY, 2008). O LA torna-se uma importante fonte alternativa de células-tronco com potencial utilização em terapia celular podendo ser criopreservadas para que possam, posteriormente, serem processadas, isoladas e/ou expandidas para o uso terapêutico (DE COPPI *et al.*, 2015).

Para isso, é necessário o uso de técnicas que permitam estabilizar e manter as características originais inalteradas destas células em temperaturas criogênicas com o uso de protocolos eficientes de criopreservação, no intuito de manter sua viabilidade e potencial de expansão em cultivo *in vitro* após descongelação (HENNES, 2015). Para o armazenamento prolongado, as células são normalmente congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido, o que pode resultar na formação de gelo intra e extracelular acarretando efeitos deletérios na membrana celular (MOON *et al.*, 2008). Para minimizar os danos causados pela criopreservação, é necessário a definição de uma taxa ideal de resfriamento baseada no congelamento lento (LEIBO, 1977) ou vitrificação (SANTOS *et al.*, 2010), aliado ao uso de crioprotetores, que são substâncias químicas que agem interna ou externamente protegendo a célula da formação de cristais de gelo (CÓRDOVA-CABALLERO *et al.*, 2002).

Utilizando CTMs derivadas do LA (JANZ *et al.* 2010), testaram alguns crioprotetores, e demonstraram que o glicerol e o DMSO, mantém uma maior viabilidade, assim como as características de proliferação e marcadores específicos, quando criopreservadas por até 6 meses. Em caprinos poucos estudos foram realizados referentes aos procedimentos de coleta, processamento e armazenamento de amostras de LA para a obtenção das células-tronco. Desta forma, objetivou-se testar o efeito de diferentes crioprotetores (glicerol e DMSO) sobre a viabilidade e velocidade de multiplicação em cultivo *in vitro* de CTMs derivadas do LA obtidas a partir de fetos caprinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fazenda de Experimentação Agropecuária Dr. Esaú Accioly Vasconcelos, Guaiúba, Ceará, pertencente à Universidade Estadual do Ceará. Foram utilizadas 9 cabras Anglo-Nubianas prenhes, com idade entre 2 e 3 anos, pesos e escore corporal homogêneos. Todos os animais foram submetidos previamente a um período de adaptação de 30 - 45 dias as condições ambientais e alimentares antes da indução ao estro e inseminação. Os animais receberam uma dieta comum composta de capim elefante picado (*Pennisetum purpureum*) e concentrado a base de grãos (10,6% de proteína bruta e 66,8% de nutrientes digeríveis totais com base na matéria seca). A dieta foi fornecida duas vezes ao dia (07:00 e 15:00 h) e formulada para atender as exigências segundo NRC, 2007. Aproximadamente 10 mL de (LA) foi colhido de fetos caprinos com

*Endereço para correspondência:

yvynabyanca@gmail.com

3 meses de idade gestacional por laparotomia e aspiração com seringa e agulhas estéreis contendo 10 mL de PBS e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB).

As suspensões de cada animal contendo CTMs derivadas do LA foram transferidas para tubos cônicos de 15mL estéreis individualizados, centrifugados a 342G por 10 min e o sobrenadante descartado. Os pellets contendo as CTMs foram ressuspensos em meio contendo 1mL de DMEM + 10% SFB + 2% penicilina/estreptomicina e submetidas ao cultivo *in vitro*. As CTMs procedentes de cada animal foram cultivadas *in vitro* imediatamente após o isolamento em placas de petri, em incubadora à uma temperatura de 38,5°C, umidade saturada, 5% de CO₂ e a troca de meio realizada a cada 2 dias. O monitoramento das CTMs foi realizada diariamente em microscopia óptica para observação da morfologia, confluência e avaliação quanto à contaminação. Ao atingir 80% de confluência, as células nas passagens 0 (P0), 1 (P1) e 2 (P2), respectivamente nos dias 10, 15 e 17 de cultivo *in vitro*, foram tripsinizadas e quantificadas em câmara de Neubauer, com uma amostra avaliada quanto à viabilidade em 0,4% de coloração com azul de trypan.

As CTMs derivadas do LA em P2 foram centrifugadas, e 20.000 células foram ressuspensas em meio DMSO (45% DMEM + 45% SFB + 10% DMSO) ou glicerol (45% DMEM + 45% SFB + 10% glicerol), envasadas em palhetas de 0,25 mL e vitrificadas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente descongelados para avaliação de viabilidade. Para o descongelamento, as palhetas contendo as CTMs derivadas do LA foram retiradas do botijão de nitrogênio líquido e aquecidas em banhomaria a 37 °C. O pellet foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultivo, após centrifugação, e avaliado quanto a viabilidade por azul de trypan.

A análise do teste t pareado foi utilizada para avaliar as taxas de proliferação e viabilidade celular em P0, P1 e P2, com resultados expressos como média ± erro padrão da média. Os dados sobre a viabilidade celular após a criopreservação foram comparados por ANOVA, seguido de um teste post hoc de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado durante este processo que houve um aumento significativo na taxa de proliferação celular observado de P0 (13.000±2.800) para P1 (54.000±10.900), permanecendo semelhante a P1 em P2 (69.000±15.000). Após um log inicial de crescimento, as CTMs se dividem rapidamente. Durante seu crescimento inicial *in vitro*, adquirem características fibroblastóides e, apesar de não serem imortais, as CTMs têm a capacidade de se expandirem numerosas vezes em cultivo, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade, comum tempo de duplicação que depende do doador do qual as células foram obtidas e da densidade de plaqueamento inicial (PRUSA *et al.*, 2003). Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular (%) nas diferentes passagens de cultivo *in vitro* (P0: 94,2±1,5; P1: 91,6±2,0; P2: 94,4±0,8), o que demonstra que, apesar de serem submetidas à passagens, as CTMs tem a capacidade de preservar seu potencial de proliferação sem alterar sua viabilidade em poucas passagens (PRATHEESH *et al.*, 2013).

*Endereço para correspondência:

yvynabyanca@gmail.com

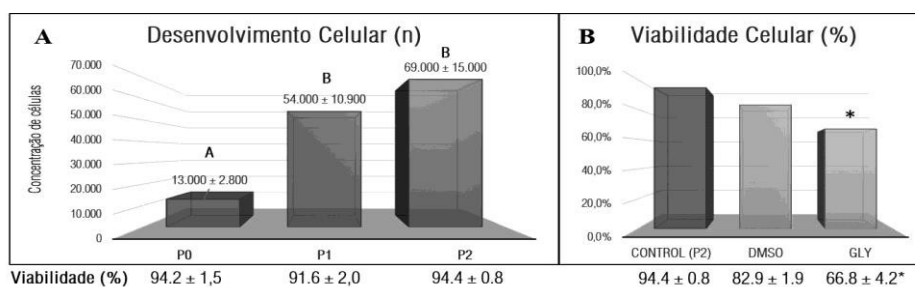


Figura 1: Concentração e viabilidade das CTMs no início do cultivo e após a vitrificação, respectivamente.

A) Concentração de CTMs derivadas do (LA) no início do cultivo *in vitro* (P0), primeira passagem (P1), segunda passagem (P2) e viabilidade celular em cada passagem.

B) Viabilidade das CTMs derivadas do (LA) após vitrificação usando DMSO e GLY (glicerol)^{A,B}: Significativas diferenças entre passagens. *Diferenças significativas entre o controle e o não criopreservado.

Neste estudo, após a criopreservação das CTMs derivadas do LA em P2 (94,4±0,8), observou-se redução significativa da viabilidade celular em meio DMSO (82,9±1,9), significativamente maior que no meio GLY (66,8±4,2). O DMSO, é o crioprotetor mais utilizado, promove uma alta taxa de sobrevivência celular após o descongelamento, mas alguns estudos já provaram que ele também pode influenciar na diferenciação de CTMs em linhagens neuronais e apresenta citotoxicidade em temperatura ambiente (NEUHUBER *et al.*, 2004; SYME *et al.*, 2004). Segundo (JANZ *et al.*, 2010), infelizmente não há muitos crioprotetores disponíveis atualmente, pois as outras substâncias como o glicerol, apesar de não apresentarem citotoxicidade, ainda precisam ser melhor estudadas quanto ao uso em CTMs, principalmente na espécie caprina. Desta forma, conclui-se que o meio DMSO promoveu melhores taxas de sobrevivência celular do que o uso do meio à base de glicerol preservando as características de pluripotencialidade e de replicação *in vitro*.

CONCLUSÕES

Na espécie caprina há poucos estudos realizados referentes ao cultivo *in vitro* das CTMs derivadas do LA de fetos caprinos e de agentes crioprotetores. Por se tratar de uma espécie com grande potencial para utilização em teste pré-clínicos, os caprinos se destacam como uma boa fonte para a aplicação biotecnológica e estudos com células-tronco. Além disso, avaliar o potencial de proliferação dessas células sob diferentes agentes crioprotetores evidencia a atuação de mecanismos metabólicos que podem ou não influenciar nos padrões de desenvolvimento e criopreservação desse tipo celular e interferir em futuras aplicações terapêuticas e farmacológicas.

REFERÊNCIAS

CÓRDOVA-CABALLERO, M. S. *et al.* Transplantes de células progenitoras hematopoyéticas. Gaceta Médica de México, Cidade del México, v. 138, n. 1, mar./abr. 2002.

*Endereço para correspondência:

yvynabyanca@gmail.com

DE VITA, B. Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de anexos fetais equinos. 2011. 74 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2011. Pratheeshet *et al.*, 2011

DE COPPI, P.; BARTSCH, G.JR.; SIDDIQUI, M.M.; XU, T.; SANTOS, C.C.;

PERIN, L.; MOSTOSLAVSKY, G.; SERREM, A.; SNYDER, E.Y.; YOO, J.J.; HENNES A. *et al.* Safe and effective cryopreservation methods for long-term storage of human amniotic fluid-derived stem cells. *Prenatal Diagnosis* 2015; 10.1002/pd.4556.

LEIBO, S.P. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In *The Freezing of Mammalian Embryos* (Ciba Fdn Symp. No. 52) 1977, pp. 69-92. Eds K. Elliott & J. Whelan. Elsevier, Amsterdam.

MARCUS AJ, WOODBURY D. Fetal stem cells from extra embryonic tissues: do not discard. *J Cell Mol Med* 2008;12:730–42.

MOON JH, LEE JR, JEE BC, SUH CS, KIM SH, LIM HJ, KIM HK. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum Reprod.* 2008; 23:1760–1770.

PRUSA, A.R.; MARTON, E.; ROSNER, M.; BETTELHEIN, D. LUBEC, G. POLLACK, A.; BERNASCHEK, G.; HENGSTSCHLÄGER, M. Neurogenic cells in human amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, n.191, p.309-314, 2003.

SANTOS, R.R., *et al.* Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Anim. Reprod. Sci.* (2010), doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.010. Janz *et al.* (2010)