

ESTRATÉGIAS PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO BOVINO

Ubirajara Maciel da Costa¹, Raquel Silva Alves², Fabiana Forell³, Camila Yamaguchi Lenoch⁴

¹Orientador, Professor do Departamento de Medicina Veterinária, CAV - bira@cav.udesc.br

² Acadêmica do Curso de Medicina, CAV - PROBIC/UDESC

³ Professora participante do Departamento de Agronomia, CAV

⁴ Mestranda em Ciência Animal, CAV.

Palavras-chave: células tronco mesenquimais, criopreservação, diferenciação.

As células tronco mesenquimais representam uma grande promessa para o tratamento de inúmeras doenças tanto congênitas quanto adquiridas. Porém, quando cultivadas por longos períodos em laboratório, os riscos de contaminações e de mutações genéticas aumentam, sendo necessário então mantê-las em temperaturas criogênicas. Para isso, faz-se necessário o uso de substâncias crioprotetoras. O DMSO é o crioprotetor de eleição, porém alguns trabalhos afirmam que este crioprotetor pode induzir a diferenciação das células tronco em células neuronais, além de apresentar alta toxicidade em temperatura ambiente. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar crioprotetores alternativos ao DMSO para a criopreservação das células tronco mesenquimais e comparar a eficiência dos mesmos. Para tanto, estas células foram isoladas, a partir de tecido adiposo bovino, através da digestão enzimática com colagenase a 0,075% e colocadas em meio de cultivo DMEM + 10% SFB a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram congeladas na concentração de 10⁶ células/mL em DMEM + 10% SFB com três tratamentos diferentes: (1) 10% Etilenoglicol, (2) 10% Propilenoglicol e (3) 10% DMSO. Uma parte das células tronco mesenquimais foi mantida em cultivo para ser utilizada como controle nos testes realizados. Após permanecerem por, pelo menos, 48 horas em botijão de nitrogênio, foram descongeladas em banho-maria e determinada a sobrevivência celular imediata através do método de exclusão de células mortas por coloração com azul de Tripán a 0,4%, realizados a curva de crescimento celular e o teste de *Population Doubling Time* (PDT). Também foi feito o teste de viabilidade celular através do reagente WST-1 e determinada a capacidade de diferenciação destas células em células dos tecidos ósseo e adiposo. Os resultados foram analisados pelo pacote estatístico SAS, por meio do procedimento GLM, adotando-se um nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os tratamentos com EG (72,9%) e PG (71,7%) quanto a sobrevivência celular imediata, entretanto o DMSO (86,4%) apresentou um resultado significativamente superior em relação aos demais. Os três crioprotetores não demonstraram diferença estatística entre si na formação da curva de crescimento celular, porém, todos foram inferiores ao controle não criopreservado. Quanto ao PDT, também não houve diferença significativa entre os três tratamentos (EG: 28 h; PG: 26,7 h; DMSO: 27,2 h), mas todos apresentaram um tempo de duplicação de suas populações estatisticamente maior do que o controle (21,3 h). A viabilidade celular, através do reagente WST-1, das células criopreservadas com EG, PG e DMSO foram, respectivamente, 66,65%, 71,42% e 83,62%. O PG não diferiu estatisticamente dos demais crioprotetores, mas o DMSO apresentou diferença significativa em relação ao EG. E tanto as células submetidas aos três tratamentos como as utilizadas como controle

conseguiram se diferenciar em células dos tecidos ósseo e adiposo. Conclui-se, portanto, que a criopreservação influencia na sobrevivência, na taxa de multiplicação e na viabilidade celular, mas mesmo assim pode ser utilizada para armazenar as células tronco mesenquimais, já que os danos causados não inviabilizam as mesmas. E tanto o EG como o PG podem ser utilizados como uma alternativa ao DMSO na criopreservação destas células, pois durante os experimentos realizados apresentaram resultados tecnicamente viáveis.