

EFEITO DE DIFERENTES SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA VIABILIDADE DE ADIPÓCITOS BOVINOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO

Winye Góes Silva¹, David Germano Gonçalves Schwarz², Carlos Thiago S. A. M. de Oliveira³, Renato Peixoto Brandão Bravo⁴, Luiz Gustavo Siqueira⁵, Fabiane Rodrigues Ferrão⁴, Carlos Frederico Martins⁵

¹Bolsista de Iniciação Científica-UniCEUB/Embrapa Cerrados, winnygoes@gmail.com

²Bolsista FAPDF/Embrapa Cerrados

³Bolsista CNPq/Embrapa Cerrados

⁴Bolsista Iniciação Científica FAPDF/Embrapa Cerrados

⁵Embrapa Cerrados, carlos.frederico@cpac.embrapa.br

Introdução

A transferência nuclear tem sido uma técnica importante para a conservação de germoplasma animal e também para a multiplicação de material genético (MIGLINO, 2004). A multipotencialidade das células adipócitas tem gerado interesse científico, pois estas células podem se diferenciar em diferentes tipos celulares (EDWARD et al., 2009). Estas células apresentam uma versatilidade de diferenciação e uma poderosa potencialidade, além de sua facilidade de cultivo *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2006). Devido a essa característica, as células adipócitas podem ser consideradas como células tronco, podendo ser utilizadas na clonagem animal.

Atualmente, diferentes protocolos vem sendo empregados para desenvolver técnicas envolvendo a criopreservação. Para criopreservar células vivas e tecidos é necessário utilizar temperaturas muito baixas (DE PEGG, 2007). Todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores que possuem a função de proteger as células da agressão ao frio e de reduzir a quantidade de gelo formado (DE PEGG, 2007).

Os objetivos deste estudo foram avaliar a possibilidade de isolar e cultivar adipócitos bovinos *in vitro* e determinar a solução crioprotetora mais eficiente em manter viabilidade destas células após a criopreservação.

Material e Métodos

A cultura primária de células adipócitas bovinas foi preparada por meio de metodologia modificada e simplificada descrita previamente por Y. Li e colaboradores (2006). Assim, o tecido adiposo removido foi lavado com soro fisiológico e DMEM com soro fetal bovino e antibióticos. Em seguida, o tecido foi cortado em pequenos fragmentos e depositado na placa de petri (Figuras 1 e 2), sendo recobertos com DMEM e transferida para estufa de CO₂. Após o cultivo por 7 dias, as biópsias foram retiradas, o meio trocado, e as células isoladas foram cultivadas por mais 7 dias nas mesmas condições. Após este período, as células foram tripsinizadas e depositadas em garrafas de cultivo (Figura 3) para aumentar seu número (Figura 4) e poderem ser criopreservadas.



Figura 1: Remoção do tecido adiposo.



Figura 2: Biópsias cobertas com DMEM.

As células ressuspensas foram divididas em três tratamentos de criopreservação: T1) DMEM, 10% de SFB e 10% de DMSO; T2) DMEM, 10% de SFB e 7% de PG e T3) DMEM, 10% de SFB e 5% de DMF. As soluções com as células foram envasadas em palhetas e em seguida foram equilibradas e refrigeradas para posteriormente serem armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C), onde permaneceram por 49 dias.

A taxa de viabilidade das células adipócitas foi verificada após a descongelação, onde as células foram incubadas com o corante *trypan blue* e então avaliadas em microscópio. Os tratamentos de criopreservação foram comparados pela análise de variância ANOVA. Ao identificar diferença na análise de variância, os tratamentos foram comparados utilizando o teste t. Diferenças foram consideradas significativas com P<0,05.



Figura 3: Cultivo dos adipócitos em garrafas de cultura.



Figura 4: Crescimento celular *in vitro*.

Resultados e Discussão

O presente trabalho estudou de forma inédita, o isolamento e criopreservação de células adipócitas bovinas em diferentes soluções de crioproteção, com o objetivo de determinar a melhor solução para ser utilizada na formação de um criobanco de células adipócitas.

As células que atingiram a confluência celular foram criopreservadas e avaliadas após a descongelação, sendo então possível calcular a taxa de concentração e a taxa de viabilidade celular. A média da concentração celular após criopreservação foi semelhante para os dois tratamentos com seus respectivos crioprotetores. Todas as soluções de criopreservação conseguiram manter células viáveis após a descongelação.

O resultado da viabilidade celular dos tratamentos está descrito na tabela 1 e Figura 5, onde o tratamento com 10% de DMSO manteve 38,6 ± 21,4% das células viáveis, sendo significativamente superior aos outros (P<0,05). Não foi verificada diferença estatística entre os tratamentos PG e DMF.

Tabela 1: Análise da taxa de viabilidade pós congelamento e descongelação das células adipócitas em diferentes soluções protetoras.

Animal	PG	DMSO	DMF
I	11,5%	39,5%	3,5%
II	5,5%	50,5%	5,0%
III	25,0%	18,6%	9,5%
IV	58,0%	72,5%	17,5%
V	4,0%	14,0%	2,5%
VI	8,0%	36,5%	3,0%
Média e Desvio Padrão	18,6±20,6%	38,6±21,4%	6,8±5,8%

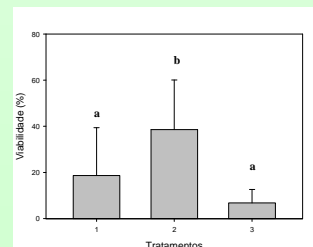


Figura 5: Diferenças de viabilidade celular entre os tratamentos T1 (PG), T2 (DMSO) e T3 (DMF) após a criopreservação. P<0,05.

Conclusões

Foi possível isolar, cultivar e criopreservar células adipócitas bovinas, bem como determinar que a melhor molécula crioprotetora foi o DMSO a 10%. No entanto, para aumentar a viabilidade celular é necessário realizar experimentos combinando outros crioprotetores ao DMSO.

Literatura Citada

- EDWARD, J., et al. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of lipid research*. Department of Cell and Molecular Physiology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599-7545, USA. Apr. 2009.
- MIGLINO, M.A. Clonagem animal e placentação. *Cienc. Cult.*, São Paulo, v. 56, n. 3, Sept. 2004.
- OLIVEIRA, L.A.C., et al. Conceitos e Aplicações de Células tronco em medicina regenerativa: uma revisão. *RUBS*, Curitiba, v.2, n.2, p.32-42, 2006.
- PEGG DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. Department of Biology, University of York, UK. Vol. 368, p.39-57, 2007.
- Y. LI, et al. Effects of different cryoprotectants on the viability and biological characteristics of porcine preadipocyte. *Cryobiology*. Vol 53, p. 240-247. Ago. 2006.