

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MONICA URIO**

**VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS BOVINOS SUBMETIDOS A DIFERENTES  
ESTRATÉGIAS DE CRIOPRESERVAÇÃO**

**LAGES - SC**

**2012**

**MONICA URIO**

**VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS BOVINOS SUBMETIDOS A DIFERENTES  
ESTRATÉGIAS DE CRIOPRESERVAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Reprodução Animal/Criopreservação Celular, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Ubirajara Maciel da Costa

Co-orientador: Marcelo Bertolini

**LAGES, SC**

**2012**

**MONICA URIO**

**VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS BOVINOS SUBMETIDOS A DIFERENTES  
ESTRATÉGIAS DE CRIOPRESERVAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Reprodução Animal/Criopreservação Celular, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

**Banca Examinadora:**

**Orientador:**



---

Professor Dr. Ubirajara Maciel da Costa  
CAV/UDESC

**Membros:**



---

Dra. Fabiana Forell  
CAV/UDESC



---

Professor Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

**Lages, 24 de Fevereiro de 2012.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, criador de todas as coisas, pela vida e pela oportunidade de poder a cada dia aprender mais.

Agradeço aos meus pais, Dalcir e Eloí, pelo amor incondicional, pelos mais valiosos ensinamentos. À minha irmã, Camila, pelo seu amor, sua amizade e também a todos os meus familiares.

Agradeço em especial ao meu noivo, Marlon, por todos os momentos que passamos juntos, pelo crescimento, amadurecimento juntos, pela força nos momentos difíceis, pela paciência enorme e por fazer parte da minha vida.

Ao Professor Dr. Ubirajra Maciel da Costa pela orientação, ensino, oportunidade, apoio e amizade incondicionais, dispensadas a mim neste período.

Ao Professor Dr. Marcelo Bertolini, grande incentivador e pelo apoio conferido para a realização deste trabalho.

A Dra. Fabiana Forell, pelo auxílio, pela amizade e em não medir esforços para me ajudar, na época mais complicada da execução do experimento, meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Alceu Mezzalira, aos mestrandos, estagiários e bolsistas do Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem, pelo aprendizado e auxílio na parte inicial do projeto.

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Virologia Animal – CEDIMA, Cláudia, Maria Luisa, Flávia, Denize que não mediram esforços em me auxiliar e se tornaram indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

A UDESC pela oportunidade única a mim dispensada e a CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço de coração a todos que direta o indiretamente torceram por mim... muito obrigada por tudo.

## RESUMO

URIO, Monica. **Viabilidade de fibroblastos bovinos submetidos a diferentes estratégias de criopreservação**. 2012, 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de Concentração: Cultivo Celular. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2012.

A avaliação da viabilidade de células animais submetidas à criopreservação é importante para estudos em cultivo celular, aplicação em clonagem animal e para o estabelecimento e manutenção de bancos genéticos. O objetivo do trabalho é otimizar uma metodologia de criopreservação de células somáticas bovinas utilizando diferentes recipientes e crioprotetores. Para tanto, três experimentos foram conduzidos utilizando células fibroblásticas de origem cutânea foram obtidas por meio de biópsia auricular de uma fêmea da raça Flamenga. No primeiro experimento, as células foram criopreservadas em criotubos na concentração fixa de  $1 \times 10^6$  células/mL em três soluções de congelamento (1) meio de cultivo +10% de DMSO; (2) meio de cultivo + 10% de Propileno glicol; (3) meio de cultivo + 10% de Etileno glicol. No segundo experimento, o congelamento foi realizado com as mesmas soluções crioprotetoras utilizadas no experimento um, porém as células foram criopreservadas em palhetas de 0,25 mL e 0,5 mL. No terceiro experimento, foram testadas diferentes concentrações celulares, ( $0,33 \times 10^6$  cel/mL,  $1 \times 10^6$  cel/mL,  $3 \times 10^6$  cel/mL e  $5 \times 10^6$  cel/mL) que foram criopreservadas em palheta de 0,5 mL utilizando-se meio de cultivo + 10% propileno glicol. Em todos os experimentos, as células foram descongeladas em banho maria a 37 °C para avaliação da sobrevivência celular pelo método de azul de Tripán e avaliação da curva de crescimento celular após 72 h de cultivo, além disso, no primeiro experimento foi realizado o teste de *population doubling time (PDT)* e no segundo e terceiro experimento o grupo controle foi realizado com células criopreservadas em criotubo utilizando a solução de congelamento composta meio de cultivo +10% de DMSO. Os dados foram analisados através da análise de variância com comparações pareadas entre grupos pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. No primeiro experimento, não houve diferença significativa entre os grupos utilizando diferentes crioprotetores e o tempo de divisão celular estimado pelo PDT variou de 15,9 a 16,5 horas. No segundo experimento, a taxa de sobrevivência pós descongelamento, considerando as palhetas de 0,25 e 0,5 mL, não apresentou diferença significativa entre os grupos, independente do crioprotetor utilizado. Já na curva de crescimento, a sobrevivência das células criopreservadas em palhetas de 0,25 mL apresentou um desempenho estatisticamente inferior às congeladas em palhetas de 0,5 mL e criotubos. Neste experimento todos os grupos apresentaram resultados de sobrevivência significativamente inferiores ao grupo controle. No terceiro experimento as concentrações celulares que apresentaram melhores resultados de sobrevivência após o descongelamento foram de  $0,33 \times 10^6$  cel/mL e  $1 \times 10^6$  cel/mL. Com base nos resultados obtidos conclui-se que é possível utilizar palhetas para o congelamento de células e que as palhetas de 0,5 mL apresentaram resultados compatíveis aos obtidos com criotubos. Da mesma forma o uso de PG pode ser uma alternativa viável para o congelamento de células somáticas.

**Palavras – chave:** cultivo celular, fibroblasto, criopreservação, crioprotetores.

## ABSTRACT

URIO, Monica. **Bovine fibroblast viability after cryopreservation using distinct protocols.** 2012, 54f. Dissertation (Masters in Animal Science – Area: Cell Culture). Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Animal Science. Lages, 2012.

The viability evaluation of animal cells subjected to different cryopreservation strategies is important for studies in cell culture, application in animal cloning and the establishment and maintenance of gene banks. The aim of this study is optimize a method for cryopreservation of bovine somatic cells in different containers using different cryoprotectants. For this purpose, three experiments were conducted using bovine skin fibroblast cells obtained by ear biopsy explantation by ear biopsy of a female Flemish breed. In the first experiment the cells were cryopreserved in cryotubes at fixed concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL and in three freezing culture medium (1) culture medium +10% DMSO, (2) culture medium + 10% propylene glycol, (3) culture medium + 10% ethylene glycol. In the second experiment the freezing was performed with the same solutions used in experiment 1, however, the cells were cryopreserved in 0.25 mL and 0.5 mL straws. In the third experiment cells in different concentrations, ( $0.33 \times 10^6$  cells/mL,  $1 \times 10^6$  cells/mL,  $3 \times 10^6$  cells/mL and  $5 \times 10^6$  cells/mL) were cryopreserved in 0.5 mL straws with culture medium + 10% propylene glycol. In all experiments, the cells were thawed in waterbath at 37 °C for evaluation of cell survival by trypan blue method and by the cell growth curve after 72 h in culture, moreover, in the first experiment was carried out the population doubling time test (PDT). The data were analyzed by analysis of variance with pairwise comparisons between groups by the Tukey test, with significance level of 5%. In first experiment there was no significant difference between groups using different cryoprotectants and the time of cell division, estimated by PDT, ranged from 15.9 to 16.5 hours. In the second experiment no significant difference in the survival rate between groups was observed, regardless of the cryoprotectant used, and considering the 0.25 and 0.5 mL straws. In the growth curve, the survival performance of cells cryopreserved in 0.25 ml straws was statistically inferior to that frozen in 0.5 mL straws and cryovials. In this experiment all groups had significantly lower survival results compared to the control group. In the third experiment, the cell concentrations that presented a better survival rate after thawing were  $0.33 \times 10^6$  cells/mL and  $1 \times 10^6$  cells/mL. Based on the results obtained it follows that straws can be used for freezing cells and the straws of 0.5 mL showed results consistent with those obtained by cryotubes. Likewise the use of PG can be a viable alternative for the freezing somatic cells.

**Keywords:** cell culture, fibroblast, cryopreservation, cryoprotectants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do Dimetil sulfoxido (DMSO).....	10
Figura 2 - Fórmula estrutural do Etileno glicol (EG).....	11
Figura 3 - Fórmula estrutural do Propileno glicol (PG).....	11
<u>Figuras Artigo</u>	
Figura 1 - Aparato de congelamento celular <i>Mr. Frosty</i> .....	20
Figura 2 - Método alternativo de congelamento celular em palhetas plásticas de 0,5 mL e 0,25 mL.....	21
Figura 3 - Fragmento tecidual auricular obtido pela técnica de explantação de uma fêmea bovina da raça Flamenga denominada de FLA661 colocado em cultivo <i>in vitro</i> ....	24
Figura 4 - Fragmento tecidual FLA661 apresentando desprendimento de células.....	24
Figura 5 - Tapete celular da célula FLA661 utilizada no trabalho. (a) tapete celular com 100 % de confluência; (b) tapete celular com 50% de confluência.....	25
Figura 6 - Curva de crescimento celular, contagem do número de células após criopreservação, reaquecimento e cultivo, utilizando diferentes crioprotetores (DMSO, PG e EG).....	26



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Sobrevivência celular e curva de crescimento das células criopreservadas com DMSO ou PG ou EG.....	25
Tabela 2 - Sobrevivência das células criopreservadas em palhetas de 0,25 mL e palheta de 0,5 mL com a utilização DMSO ou PG ou EG e do grupo controle criotubo.....	27
Tabela 3 - Curva de crescimento das células FLA 661 criopreservadas em palheta de 0,25 ml ou palheta de 0,5 mL utilizando os crioprotetores DMSO ou PG ou EG e controle criopreservado em criotubo.....	27
Tabela 4 - Sobrevivência das diferentes concentrações celulares, criopreservadas em palhetas de 0,5 mL com crioprotetor PG após descongelamento.....	28

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CPAs	agentes crioprotetores
Cel	Células
cel/mL	células por mililitros
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Médium
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered saline
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EG	etileno glicol
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina
FLA	fibroblasto bovina da raça Flamengo
GLY	Glicerol
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sódio
N <sub>2</sub> L	nitrogênio líquido
PDT	Population Doubling Time
PG	propileno glicol
Pm	peso molecular
SFB	soro fetal bovino
TNCS	transferência nuclear de células somáticas
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina

**LISTA DE SÍMBOLOS**

g	força gravitacional
gr	Grama
h	Hora
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milímetro
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Militro
°C	grau Celsius
°GL	Gay-Lussac
s	Segundo
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1 CULTIVO CELULAR .....	4
2.2 CONSERVAÇÃO ANIMAL .....	4
2.3 CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR .....	6
2.3.1 Velocidade de resfriamento e aquecimento.....	7
2.3.2 Métodos de Criopreservação .....	9
2.3.3 Agente Crioprotetor.....	10
2.3.3 Recipiente de Envase.....	13
<b>3 CAPÍTULO ÚNICO – ARTIGO .....</b>	<b>15</b>
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
3.1 INTRODUÇÃO.....	16
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.2.1 Preparo de Meios.....	18
3.2.2 Obtenção e manutenção das células .....	18
3.2.3 Criopreservação das células .....	19
3.2.4 Delineamento experimental .....	22
3.2.5 Experimento 1: Congelamento de células somáticas bovinas em tubos criogênicos comparando distintos crioprotetores.....	23
3.2.6 Experimento 2: Criopreservação de células somáticas bovinas utilizando distintos crioprotetores e recipientes de congelamento.....	23
3.2.7 Experimento 3: Criopreservação de células somáticas bovina comparando diferentes concentrações celulares.....	23
3.2.8 Análise Estatística dos Dados .....	24

3.3 RESULTADOS .....	24
3.3.1 Cultivo Celular .....	24
3.3.2 Experimento 1 - Congelamento de células somáticas bovinas em tubos criogênicos comparando distintos crioprotetores.....	25
3.3.3 Experimento 2 - Criopreservação de células somáticas bovinas utilizando distintos crioprotetores e recipientes de congelamento.....	26
3.3.4 Experimento 3 - Criopreservação de células somáticas bovina comparando diferentes concentrações celulares.....	28
3.4 DISCUSSÃO .....	i
3.5 CONCLUSÕES .....	31
3.6 REFERÊNCIAS .....	31
<b>4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>34</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>41</b>
Anexo 1 - Dulbecco's Modified Eagle's Médium .....	41
Anexo 2 - Tripsina .....	42
Anexo 3 – DPBS .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de células tem sido utilizado para diversos fins como: produção e manutenção de células de origem hematopoiética, diagnóstico de agentes infecciosos, produção de reagentes, avaliação de fármacos, produção de vacinas, estudo com células tronco e atualmente têm sido empregados como uma forma de preservar material genético de diversas espécies ou raças animais (LEON-QUINTO *et al.*, 2009).

A criopreservação celular é uma importante ferramenta para a preservação do material genético de animais em extinção, visando sua utilização em longo prazo. A conservação das células somáticas (TÃO *et al.*, 2009) e a formação de bancos de germoplasma apresentam aplicações para estudos genéticos e utilização na transferência nuclear de células somáticas (TNCS), como doadores da genética individual de espécies ameaçadas de extinção (WHITE *et al.*, 1999; LEON-QUINTO *et al.*, 2009). A conservação de genótipos de raças locais (regionais) consideradas em risco de extinção, como a raça bovina Flamengo, é importante para o futuro da genética animal, visto que algumas características específicas pertencentes a um rebanho restrito podem ser resgatadas e expandidas em uma população mais abrangente (SPRITZE *et al.*, 2003).

Para a criopreservação celular com a manutenção do material genético é necessário o estabelecimento de um protocolo de congelamento celular adequado, que favoreça taxas elevadas de sobrevivência celular pós-descongelamento. Os protocolos empregados para criopreservação utilizam como crioprotetor o dimetil sulfoxido (DMSO), entretanto, este produto apresenta instabilidade química e um alto nível de toxicidade à célula (FRESHNEY, 2000). Por isso torna-se necessária a busca de protocolos de criopreservação que utilizem agentes crioprotetores estáveis e de alta permeabilidade celular como, por exemplo, o etileno glicol (EG) e o propileno glicol (PG).

Além disso, outro problema durante a criopreservação é o armazenamento das células, que é realizado em criotubos de um a dois mL, os quais ocupam um maior espaço nos tanques de nitrogênio líquido ou ultrafreezers para armazenamento. Para amenizar este problema, é preciso avaliar um tipo de recipiente mais versátil, econômico e de maior praticidade, como as palhetas plásticas de 0,5 mL e 0,25 mL, já utilizadas amplamente na criopreservação de sêmen e embriões bovinos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CULTIVO CELULAR

O cultivo de tecidos e células iniciou no ano de 1907 com Harrison, que cultivou *in vitro* fibras nervosas de um embrião de sapo. Posteriormente, outros pesquisadores realizaram experimentos com outros tipos de tecidos e com outras espécies animais. O objetivo dos primeiros trabalhos com cultivo celular foi estudar o comportamento das células, sem a presença de variações do organismo. Para estes estudos, eram utilizados fragmentos de tecido sem a individualização celular, somente 50 anos depois, iniciou o cultivo celular com células dispersas (FRESHNEY, 2000).

Os tipos de cultivos celulares mais utilizados são: cultivos primários obtidos diretamente de tecidos animais, onde a dispersão inicial das células pode ser realizada através de dissociação enzimática ou simplesmente por desprendimento celular do tecido através da técnica de explantação; cultivos secundários gerados a partir da dispersão dos cultivos primários e redistribuição das células em novos frascos de cultivo e os cultivos de linhagem ou imortalizados que são oriundos de tecidos tumorais ou mesmo de cultivos primários/secundários transformados *in vitro*.

Cultivos secundários apresentam uma capacidade limitada de divisões celulares *in vitro* e, após um determinado número de passagens, as células entram em um processo conhecido como senescência (HAYFLICK e MOOREHEAD, 1961; HAYFLICK, 1965). A senescência é o processo natural de envelhecimento celular onde ocorre a perda da capacidade proliferativa, devido ao encurtamento dos telômeros, (FRESHNEY, 2000), o ciclo celular é cessado e as células permanecem paradas na fase G1 não passando para fase S, mesmo tendo condições adequadas para o crescimento e permanecendo metabolicamente ativas, podem resistir à morte por apoptose (DIMIRI *et al.*, 1995, CAMPISI e FAGAGNA, 2007).

### 2.2 CONSERVAÇÃO ANIMAL

A extinção de algumas espécies de mamíferos ocorreu como parte do processo natural da evolução (HOLT e PICKARD, 1999) em algumas espécies domésticas, e deve-se também à seleção intensiva de algumas raças (ANDRABI e MAXWELL, 2007, LI *et al.*, 2009b). A

introdução de raças especializadas é um fator importante para a perda da biodiversidade (LI *et al.*, 2009a), tanto para a extinção de raças tradicionais, como também a perda de diversidade genética dentro destas raças. Animais de uma mesma raça são selecionados para as mesmas características fenotípicas, ao longo das gerações, elevando a pressão de seleção sobre este rebanho (TABERLET *et al.*, 2008, 2011), o que pode promover a perda da variabilidade genética (LEON-QUINTO *et al.*, 2009).

O objetivo da conservação de animal de espécies ameaçadas de extinção é manter, e se possível, aumentar da biodiversidade (LEON-QUINTO *et al.*, 2009). A conservação *in situ* e *ex situ* visam a manutenção da biodiversidade animal. A conservação *in situ* visa manter os animais no ambiente em que estão adaptados, porém quando a população é muito pequena, diversidade genética não é garantida tornando a conservação *in situ* ineficiente (HOLT e PICKART, 1999). Já conservação *ex situ* envolve a criopreservação de recursos genéticos animais, como uma alternativa para manutenção da diversidade genética (ANDRABI e MAXWELL, 2007).

Os bancos de recursos genéticos ou também chamados de bancos de recursos biológicos podem ser definidos como repositórios de materiais coletados, processados e armazenados, e podem incluir gametas, embriões, células somáticas e DNA (HOLT e PICKART, 1999) e assim facilitar a criação de um *pool* genético de espécies ameaçadas de extinção (ANDRABI e MAXWELL, 2007; LEON-QUINTO *et al.*, 2009, 2011; TÃO *et al.*, 2009). O material biológico pode ser utilizado para diversos fins, como a clonagem e a transgênese (LEON-QUINTO *et al.*, 2009).

Os primeiros bancos de germoplasma eram constituídos apenas de sêmen, oócitos e embriões (HOLT e PICKART, 1999, LEON-QUINTO *et al.*, 2009). Atualmente, a formação de bancos de células, as quais são usadas associadas à técnica de clonagem, podem ser uma alternativa para a preservação, uma vez que a obtenção de fibroblastos é simples e precisa de apenas um pequeno fragmento de material (LEON-QUINTO *et al.*, 2009, 2011). Além disso, o cultivo de células fibroblásticas é considerado o mais apropriado para o uso na transferência nuclear de células somática (TNCS), além de ser um excelente recurso para a pesquisa (WU, *et al.*, 2008, LEON-QUINTO *et al.*, 2011).

Um crescente número de amostras vêm sendo coletadas atualmente, para a criopreservação do germoplasma (MAZUR, LEIBO e SEIDEL, 2008). Como por exemplo, os animais da raça Flamenga, que hoje apresentam um reduzido número de exemplares registrados no Brasil e na região de origem nos Flandres franceses, com uma forte possibilidade de extinção racial. A preservação desta raça tem sido realizada na nossa região



por métodos tradicionais, como a monta natural, inseminação artificial, e coleta e criopreservação de gametas (sêmen, oócitos) e embriões. Não obstante, a produção de um banco de células viáveis também se torna uma alternativa importante para uso em associação à clonagem animal.

Dessa maneira, a utilização de células com doadoras de núcleo para produção de animais por clonagem, vem sendo vista como uma alternativa viável da recuperação de espécies. Dessa forma, o estabelecimento e a criopreservação de células somáticas é essencial, não apenas para preservar os recursos de germoplasma de espécies importantes, como também para fornecer dados do genoma (TÃO *et al.*, 2009).

### **2.3 CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR**

A criobiologia como uma ciência descreve os efeitos das temperaturas abaixo de zero sobre os organismos vivos. Para a manutenção da viabilidade celular em baixas temperaturas, ocorre a redução do metabolismo celular, para que estas células possam ser viáveis no futuro (MAZUR, 1996). Vários fatores; são essenciais para a sobrevivência celular: o agente crioprotetor (CAPs), a velocidade da curva de resfriamento, temperatura de estocagem, o procedimento de descongelamento e a remoção do crioprotetor (GORDON, 1994, KARLSSON e TONER, 1996).

A criopreservação é definida como a manutenção ao longo prazo de produtos biológicos em temperaturas abaixo de -80 °C (BAUST *et al.*, 2009). Proporciona benefícios para uma ampla variedade aplicações, incluindo embriologia reprodutiva, medicina, entre outros (MALPIQUE *et al.*, 2009). Além disso, a preservação dos recursos genéticos podem ser armazenados por tempo indeterminado.

No entanto, apenas algumas células são criopreservadas com sucesso, pois ainda há perda expressiva de viabilidade celular associadas à criopreservação. Isso ocorre devido ao processo de congelamento e descongelamento (BAUST *et al.*, 2009). Durante o congelamento a temperatura é reduzida de 37°C até -196°C, dessa forma, todas as reações químicas, processos físicos e biológicos intracelulares e atividades extracelulares estarão suspensos (BAKHACH, 2009).

O princípio da criopreservação baseia-se na redução da formação de gelo intracelular. Porém, uma vez iniciado o congelamento haverá o início da formação dos cristais de gelo.

Mazur (1963) publicou um modelo matemático com base em considerações físico-químicas que mostra que a probabilidade de formação de cristais de gelo no interior na célula, depende do grau de desidratação a que a célula foi submetida, durante o resfriamento, o que, por sua vez depende da permeabilidade da célula à água, da temperatura e da superfície (volume da célula).

### 2.3.1 Velocidade de resfriamento e aquecimento

A velocidade de resfriamento é um dos principais fatores para determinar se o congelamento das células será viável ou não. O resfriamento muito lento ou muito rápido a prejudicaria às células criopreservadas (MAZUR, 1963).

No resfriamento e no aquecimento celular ocorrem alterações da temperatura, estado físico da água, concentração dos solutos e também no ambiente intracelular e extracelular (MAZUR e SCHMIDT 1968).

Mazur (1966) relata que uma vez iniciada a formação dos cristais, a taxa de mudança de temperatura afeta as células pelo período de permanência das células acima do ponto eutético da solução, ocasionando uma maior ou menor exposição aos solutos ou devido ao início do congelamento intracelular.

Silvaes *et al.*, (1975); Mazur (1977) descrevem que no início da cristalização da suspensão celular, ocorre a formação dos cristais de gelo denominada de nucleação que geralmente ocorre à temperatura abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$ , primeiramente no ambiente extracelular, mantendo-se o equilíbrio entre a fase líquida e sólida até que o ponto eutético seja alcançado. O congelamento intracelular irá depender da taxa de desidratação celular e da velocidade de resfriamento (MAZUR, 1977), pois durante o congelamento é removido 95% da água intracelular sendo o restante transformada em cristais de gelo (BAKHACH, 2009).

Mazur (1970) relata que até atingir a temperatura entre  $-10^{\circ}\text{C}$  e  $-15^{\circ}\text{C}$ , a sobrevivência celular não depende da curva de resfriamento e aquecimento. Embora o congelamento do citoplasma seja ao redor  $-1^{\circ}\text{C}$ , se a cristalização já se processou, a membrana celular irá prevenir a passagem dos cristais de gelo do ambiente extracelular para o intracelular. Mesmo na presença de gelo no ambiente extracelular, algumas células permanecem descongeladas, ficando superesfriadas e o congelamento ocorrerá entre  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$  abaixo de seu ponto de congelamento ( $-0,5^{\circ}\text{C}$  para células de mamíferos)(MAZUR, 1996).

O uso da taxa de resfriamento de  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por minuto é ótimo para muitas células, pois é rápido para minimizar as injúrias de solutos e ocasionar a desidratação celular, e lento o suficiente para minimizar o risco de congelamento intracelular (MAZUR, 1996).

Quando as células são submetidas a temperaturas abaixo de zero, a recuperação do equilíbrio depende principalmente da taxa na qual elas são resfriadas e da permeabilidade celular à água (MAZUR, 1970). A velocidade de congelamento deve ser lenta o suficiente para permitir a desidratação celular evitando dessa forma o congelamento intracelular, mas deve ser rápida, mas o suficiente para evitar a exposição excessiva da célula à solução de congelamento. Em contraste, com o resfriamento rápido, a difusão de água é relativamente baixa e a parte retida na célula torna-se superesfriada, ocorrendo à cristalização intracelular geralmente associada a danos celulares irreversíveis (MAZUR, 1970; COGER e TONER, 2000; BAKHACH, 2009).

Porém uma mudança rápida na temperatura durante o resfriamento pode causar lesões celulares, mesmo na ausência da formação de cristais de gelo intracelular, pois ocorre o choque térmico. O choque térmico ocorre basicamente entre as temperaturas de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mas também pode ocorrer nas temperaturas entre  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , devido a contração de vários componentes da membrana e também pela mudança na composição de anions no meio extracelular. Estas lesões celulares podem ser reduzidas pela adição de agentes crioprotetores durante a criopreservação. (BAKHACH, 2009).

A velocidade de resfriamento determina também o tamanho dos cristais de gelo formados, pois o tamanho dos cristais é inversamente relacionado à curva de congelamento. O rápido resfriamento determina a formação de cristais pequenos imperfeitos e instáveis; ao se utilizar uma velocidade de aquecimento lenta, os cristais tornam-se maiores e estáveis, ocorrendo o processo de recristalização, ou seja, se fundem para formar cristais maiores, podendo assim romper membranas celulares. Já o descongelamento rápido consegue resgatar as células congeladas rapidamente, as quais apresentam o citoplasma com gelo e assim evitar a recristalização. Dessa maneira, nas células que foram congeladas lentamente a produção de cristais de gelo é grande, porém este gelo está no ambiente extracelular, com isso são inócuos (MAZUR, 1970, 1977, 1996).

Durante o resfriamento, a membrana plasmática diminui sua área de superfície, mas a quantidade de água conduzida para fora da célula, depende da permeabilidade à água e da taxa de resfriamento. Se a permeabilidade à água é alta e taxa de resfriamento é baixa, água da célula será forçada a sair e o volume da célula diminui. Por outro lado, se a permeabilidade à água é baixa e a taxa de resfriamento rápida, a água não é capaz de sair com rapidez suficiente

para evitar o acúmulo de tensão na membrana, e conseqüente dano à membrana (MAZUR, LEIBO e SEIDEL, 2008).

O processo de congelamento de células descreve uma curva denominada “U” invertido, onde compara-se a curva de resfriamento com taxa de sobrevivência celular. O ápice da curva é atingido quando ocorre uma taxa ótima de congelamento, porém há diferenças nas taxas de sobrevivência e na curva de resfriamento, dependendo do tipo de célula utilizada (MAZUR, 1977, 1996).

O aquecimento adequado também é importante para garantir uma sobrevivência pós-descongelamento (MAZUR, 1996). Durante o aquecimento ocorre a exposição à temperatura ambiente ou banho-maria a 37 °C, para alcançar rápido aquecimento celular, que é mais benéfico que o lento, pois diminui a ocorrência da recristalização e a exposição excessiva aos solutos (MAZUR, 1977; MUKHERJEE, 2008).

### **2.3.2 Métodos de Criopreservação**

#### **- Congelamento Lento**

O congelamento lento é o principal método aplicado na criopreservação de embriões e células. Durante a fase inicial, as células são expostas à solução crioprotetora e submetidas e então, são submetidos ao resfriamento.

A taxa de resfriamento é importante uma vez que afeta a taxa de formação e tamanho dos cristais de gelo, bem como os efeitos de solução que ocorrem durante o congelamento. Porém, para conseguir uniformes, taxas de resfriamento controlados, os criotubos deve ser colocado em recipientes projetados como o aparato como o “Mr. Frosty” que fornece taxa de resfriamento perto de 1 ° C por minuto. Realizando a curva de congelamento em freezer – 80 °C, permanecendo por 12 h, posteriormente os criotubos podem ser colocados no nitrogênio líquido (SIMONI, 1998).

#### **- Congelamento rápido**

O congelamento rápido inclui o período de equilíbrio entre a célula e o crioprotetor, seguido pela manutenção da palheta plástica de 0,25 mL ou 0,5 mL, no vapor de nitrogênio por 15 min antes de serem imergidas no nitrogênio líquido.

### - Vitrificação

A vitrificação é obtida com o aumento extremo da viscosidade, que requer grande velocidade de resfriamento e o uso de soluções crioprotetoras que impeçam a formação de cristais de gelo e aumentem a viscosidade em baixas temperaturas. É definida como a solidificação de uma solução em baixas temperaturas, sem a formação de cristais de gelo (VAJTA, 2000).

O sucesso da vitrificação é relacionado com a capacidade de permeação, a concentração, o tempo de exposição e o volume do crioprotetor, que devem ser adequados para impedir a formação de cristais de gelo intracelular (RALL e FAHY, 1985).

A vitrificação é diferente do congelamento lento, uma vez que no congelamento lento a taxa de resfriamento possibilita manter um equilíbrio entre os vários fatores que podem resultar em injúrias, como a formação de cristais de gelo (DOBRINSKY, 1996). Na vitrificação, se elimina totalmente a formação de cristais de gelo intracelular, porém como consequência existe uma probabilidade de ocorrer quase todos os danos, com exceção dos causados pela cristalização de gelo.

### 2.3.3 Agente Crioprotetor

Os crioprotetores são essenciais para a sobrevivência celular durante o congelamento e descongelamento (FAHY, 1986), pois as células mamíferas não sobrevivem ao congelamento abaixo dos -20 °C em fluidos teciduais ou soluções salinas, sem a presença de agentes crioprotetores (CPAs) (MAZUR, 1970). As propriedades dos CPAs foram descobertas por Polge, Smith e Parkes (1949) quando utilizaram o glicerol na criopreservação do sêmen. Em 1959 os pesquisadores Lovelock e Bishop descobriram que o dimetil sulfóxido (DMSO) também poderia ser usado como solução crioprotetora. A partir da década de 80, estudos já consideravam o efeito tóxico dos crioprotetores como um obstáculo para o sucesso da criopreservação (FAHY, 1986). Desde então outras substâncias com propriedades semelhantes têm sido utilizadas. Deste modo, independente da velocidade de resfriamento, a adição de um crioprotetor é fundamental para a sobrevivência de células criopreservadas.

Atualmente sabe-se que a exposição aos CPAs pode causar danos às células, e esses efeitos estão relacionado com o crioprotetor utilizado e sua concentração (FAHY, 1986; WUSTEMAN *et al.*, 2008). Concentrações de crioprotetor entre 5% e 15% podem ser usadas, entretanto as mais são de 7,5% ou 10% (FRESHNEY, 2000). Alguns trabalhos demonstram

que o aumento da concentração de crioprotetor, até 4 M para DMSO e PG, não altera os resultados de criopreservação (EBERTZ e McGANN, 2004).

Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos, levando-se em consideração a permeabilidade à membrana celular (McGANN, 1978; MUKHERJEE, 2008; BAKHACH, 2009).

- Agentes Não Penetrantes: o crioprotetor não atravessa a membrana celular devido ao seu alto peso molecular e exigem taxas de congelamento e aquecimento rápido, sendo para tanto utilizados alguns açúcares como a sacarose e a lactose (McGANN, 1978, MUKHERJEE, 2008).

- Agentes Penetrantes: os crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula, protegendo-a contra as lesões causadas durante os processos de congelamento lento, previnem a formação de cristais de gelo no ambiente intracelular, não podem causar efeito tóxico (McGANN, 1978) e devem ter penetração uniforme nas células (MERYMAN, 1971). Como exemplos citamos o glicerol, o dimetil sulfoxido (DMSO), o etileno glicol (EG) e o propileno glicol (PG).

- *Dimetil sulfoxido (DMSO)*

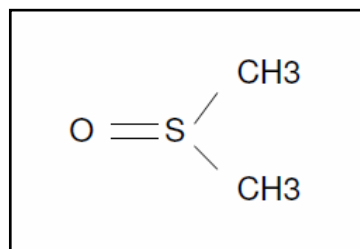


Figura 1. Fórmula estrutural do Dimetil sulfoxido (DMSO).

O DMSO é um composto polar, cuja fórmula química é  $C_2H_6SO$ , possui  $pm = 78$  gr/mol, tem sido utilizado com sucesso para criopreservação de gametas e embriões (CASTRO *et al.*, 2011). E também é o crioprotetor de eleição para criopreservação celular. Entretanto, devido a sua alta permeabilidade e alta toxicidade, quando utilizado com elevado tempo de exposição pode causar danos às células (FRESHNEY, 2000). Alguns estudos relatam que o DMSO pode induzir a diferenciação celular quando utilizado para a criopreservação de células tronco (ADLER *et al.*, 2006, KATKOV *et al.*, 2011).

- Etileno Glicol (EG)

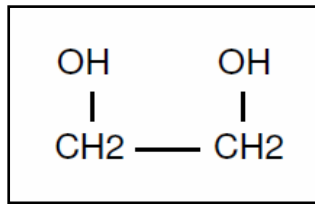


Figura 2. Fórmula estrutural do Etileno Glicol (EG).

O EG é um álcool de fórmula química  $\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$ , definido como não genotóxico e não cancerígeno baseado em estudos *in vitro* e *in vivo* (NTP-CERHR - Ethylene Glycol, 2004), apresenta baixo peso molecular ( $\text{pm}=62,07$  gr/mol). Sua alta permeabilidade tem justificado sua grande utilização na criopreservação de oócitos (CASTRO *et al.*, 2011), o que lhe proporciona uma vantagem quando comparado a outros crioprotetores intracelulares de maior peso molecular, como o DMSO. Além disto, é amplamente utilizado para a criopreservação de embriões e nos procedimentos de vitrificação (BAFRANI *et al.*, 2003), porém seu efeito na criopreservação de células somáticas ainda é pouco estudado (MAUGER *et al.*, 2006). Em células-tronco apresenta baixa toxicidade (KATKOV *et al.*, 2011).

- Propileno glicol (PG)

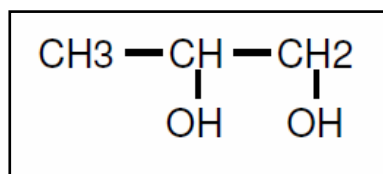


Figura 3. Fórmula estrutural do Propileno glicol (PG).

A fórmula química do PG é  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$  e o  $\text{pm}=76,095$  gr/mol. É uma substância viscosa, incolor, considerada não genotóxica ou carcinogênica (NTP-CERHR - Propylene Glycol, 2004). Em comparação com outros crioprotetores, se apresenta mais estável e é amplamente utilizado no congelamento lento de embriões (BAFRANI *et al.*, 2003), pois possui propriedades físico-químicas que o tornam um agente biológico utilizado na vitrificação (WUSTEMAN *et al.*, 2008). Já foi utilizado em tecido cutâneo e os melhores níveis de sobrevivência foram obtidos com concentrações de 10% a 20% (VILLALBA *et al.*, 1996;

ARMITAGE e JUSS, 2003). Em células-tronco têm apresentado baixa toxicidade (KATKOV *et al.*, 2011).

### 2.3.3 Recipiente de Envase

A sobrevivência celular também é influenciada pelo tipo de recipiente utilizado na criopreservação, pois modifica a relação superfície-volume (MAXWELL, LANDERS e EVANS, 1995), mudando a velocidade de resfriamento e aquecimento durante o processo de criopreservação.

Recipientes para a criopreservação de sêmen de animais vêm sendo estudados há décadas; os primeiros recipientes utilizados na criopreservação de sêmen foram às ampolas de vidro utilizadas pelo método de congelamento lento desenvolvido por Polge e colaboradores na década de 50. Na década de 60, os pesquisadores Nagase e Niwa desenvolveram um método de congelação rápida em *pellets*, porém apresentavam algumas desvantagens como: dificuldade de identificação do reprodutor e deficiência sanitária, os *pellets*, assim como ampolas de vidro também apresentam problemas de manuseio, armazenamento e transporte (SALAMON e MAXWELL, 1995).

Cassou em 1971 resolveu o problema do espaço (desvantagem da ampola) e ao mesmo tempo ofereceu garantia sanitária, ausentes no sistema de *pellets*, ele utilizou palhetas plásticas de 0,5 mL e 0,25 mL (MIES FILHO, 1987). As palhetas plásticas proporcionaram um grande avanço no ponto de vista da identificação das amostras, a praticidade de armazenamento e transporte, sendo hoje em dia a ferramenta mais amplamente utilizada para a criopreservação e comercialização de sêmen e embriões no mundo (SALAMON e MAXWELL, 1995).

Semelhante ao utilizado na criopreservação do sêmen, a criopreservação de células foi inicialmente realizada em ampolas de vidro, sendo mais recentemente substituídas por tubos criogênicos plásticos ou criotubos (SIMONI, 1998; FRESHNEY, 2000; MAUGER *et al.*, 2006). Como desvantagem, este tipo de recipiente apresenta uma menor praticidade ao armazenamento e a relação superfície volume não permite uma velocidade de resfriamento tão rápida quanto com a utilização de palhetas plásticas. A criopreservação de células em palhetas pode ser mais conveniente para a formação de bancos de recursos genéticos, pois ocupam um reduzido espaço nos tanques de nitrogênio. Entretanto, poucos pesquisadores vêm utilizando palhetas plásticas na criopreservação de células, Forell *et al.* (2008) utilizaram



palhetas de 0,5 mL para criopreservação de células somáticas utilizadas para clonagem animal. Em 2010, Li *et al.*, criopreservaram células tronco embrionárias humanas em palhetas de 0,25 mL.

Desta maneira, as hipóteses do trabalho foram: o congelamento de células em palhetas plásticas proporcionará uma viabilidade pós-descongelamento superior ao protocolo convencional, a utilização de PG ou EG proporcionará uma maior taxa de sobrevivência celular pós-descongelamento do que o uso do DMSO, diferentes concentrações de células utilizadas interferem na criopreservação.

Com isso, o objetivo geral foi otimizar uma metodologia de criopreservação de células bovinas de cultivo primário de origem cutânea. Os objetivos específicos são comparar o uso de DMSO, PG ou EG como agentes crioprotetores na sobrevivência de células, comparar a sobrevivência pós-descongelamento de células criopreservadas em criotubo ou palheta e comparar a sobrevivência pós-descongelamento de diferentes concentrações de células submetidas à criopreservação.

### 3 CAPÍTULO ÚNICO – ARTIGO

#### VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS BOVINOS SUBMETIDOS A DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE CRIOPRESERVAÇÃO

##### RESUMO

A avaliação da viabilidade de células animais submetidas à criopreservação é importante para estudos em cultivo celular, aplicação em clonagem animal e para o estabelecimento e manutenção de bancos genéticos. O objetivo do trabalho é otimizar uma metodologia de criopreservação de células somáticas bovinas utilizando diferentes recipientes e crioprotetores. Para tanto, três experimentos foram conduzidos utilizando células fibroblásticas de origem cutânea foram obtidas por meio de biópsia auricular de uma fêmea da raça Flamengo. No primeiro experimento, as células foram criopreservadas em criotubos na concentração fixa de  $1 \times 10^6$  células/mL em três soluções de congelamento (1) meio de cultivo +10% de DMSO; (2) meio de cultivo + 10% de Propileno glicol; (3) meio de cultivo + 10% de Etileno glicol. No segundo experimento, o congelamento foi realizado com as mesmas soluções crioprotetoras utilizadas no experimento um, porém as células foram criopreservadas em palhetas de 0,25 mL e 0,5 mL. No terceiro experimento, foram testadas diferentes concentrações celulares, ( $0,33 \times 10^6$  cel/mL,  $1 \times 10^6$  cel/mL,  $3 \times 10^6$  cel/mL e  $5 \times 10^6$  cel/mL) que foram criopreservadas em palheta de 0,5 mL utilizando-se meio de cultivo + 10% propileno glicol. Em todos os experimentos, as células foram descongeladas em banho maria a 37 °C para avaliação da sobrevivência celular pelo método de azul de Tripán e avaliação da curva de crescimento celular após 72 h de cultivo, além disso, no primeiro experimento foi realizado o teste de *population doubling time (PDT)* e no segundo e terceiro experimento o grupo controle foi realizado com células criopreservadas em criotubo utilizando a solução de congelamento composta meio de cultivo +10% de DMSO. Os dados foram analisados através da análise de variância com comparações pareadas entre grupos pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. No primeiro experimento, não houve diferença significativa entre os grupos utilizando diferentes crioprotetores e o tempo de divisão celular estimado pelo PDT variou de 15,9 a 16,5 horas. No segundo experimento, a taxa de sobrevivência pós descongelamento, considerando as palhetas de 0,25 e 0,5 mL, não apresentou diferença significativa entre os grupos, independente do crioprotetor utilizado. Já na curva de crescimento, a sobrevivência das células criopreservadas em palhetas de 0,25 mL apresentou um desempenho estatisticamente inferior às congeladas em palhetas de 0,5 mL e criotubos. Neste experimento todos os grupos apresentaram resultados de sobrevivência significativamente inferiores ao grupo controle. No terceiro experimento as concentrações celulares que apresentaram melhores resultados de sobrevivência após o descongelamento foram de  $0,33 \times 10^6$  cel/mL e  $1 \times 10^6$  cel/mL. Com base nos resultados obtidos conclui-se que é possível utilizar palhetas para o congelamento de células e que as palhetas de 0,5 mL apresentaram resultados compatíveis aos obtidos com criotubos. Da mesma forma o uso de PG pode ser uma alternativa viável para o congelamento de células somáticas.

**Palavras – chave:** cultivo celular, fibroblasto, criopreservação, crioprotetores.

## BOVINE FIBROBLAST VIABILITY AFTER CRYOPRESERVATION USING DISTINCT PROTOCOLS

### ABSTRACT

The viability evaluation of animal cells subjected to different cryopreservation strategies is important for studies in cell culture, application in animal cloning and the establishment and maintenance of gene banks. The aim of this study is optimize a method for cryopreservation of bovine somatic cells in different containers using different cryoprotectants. For this purpose, three experiments were conducted using bovine skin fibroblast cells obtained by ear biopsy explantation by ear biopsy of a female Flemish breed. In the first experiment the cells were cryopreserved in cryotubes at fixed concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL and in three freezing culture medium (1) culture medium +10% DMSO, (2) culture medium + 10% propylene glycol, (3) culture medium + 10% ethylene glycol. In the second experiment the freezing was performed with the same solutions used in experiment 1, however, the cells were cryopreserved in 0.25 mL and 0.5 mL straws. In the third experiment cells in different concentrations, ( $0.33 \times 10^6$  cells/mL,  $1 \times 10^6$  cells/mL,  $3 \times 10^6$  cells/mL and  $5 \times 10^6$  cells/mL) were cryopreserved in 0.5 mL straws with culture medium + 10% propylene glycol. In all experiments, the cells were thawed in waterbath at 37 °C for evaluation of cell survival by trypan blue method and by the cell growth curve after 72 h in culture, moreover, in the first experiment was carried out the population doubling time test (PDT). The data were analyzed by analysis of variance with pairwise comparisons between groups by the Tukey test, with significance level of 5%. In first experiment there was no significant difference between groups using different cryoprotectants and the time of cell division, estimated by PDT, ranged from 15.9 to 16.5 hours. In the second experiment no significant difference in the survival rate between groups was observed, regardless of the cryoprotectant used, and considering the 0.25 and 0.5 mL straws. In the growth curve, the survival performance of cells cryopreserved in 0.25 ml straws was statistically inferior to that frozen in 0.5 mL straws and cryovials. In this experiment all groups had significantly lower survival results compared to the control group. In the third experiment, the cell concentrations that presented a better survival rate after thawing were  $0.33 \times 10^6$  cells/ mL and  $1 \times 10^6$  cells /mL. Based on the results obtained it follows that straws can be used for freezing cells and the straws of 0.5 mL showed results consistent with those obtained by cryotubes. Likewise the use of PG can be a viable alternative for the freezing somatic cells.

**Keywords:** cell culture, fibroblast, cryopreservation, cryoprotectants.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O sistema de cultivo de células tem sido utilizado para diversos fins como: produção e manutenção de células de origem hematopoiética, diagnóstico de agentes infecciosos,

produção de reagentes, avaliação de fármacos e produção de vacinas. Além destes, atualmente, cultivos celulares têm sido empregados como uma forma de preservar material genético de diversas espécies ou raças animais, principalmente aquelas ameaçadas de extinção. Para este fim, além da obtenção de gametas, embriões e cultivos celulares de células somáticas, são empregadas outras biotecnologias como a criopreservação e a clonagem animal.

Para estes fins, células devem ser preservadas por um longo período de tempo, o que é possível através da criopreservação em que as células devem suportar temperaturas criogênicas (MAZUR, 1996), pois no processo de congelamento a temperatura deve ser reduzida de 37 °C até -196 °C. O protocolo padrão de criopreservação faz uso de criotubos como recipientes para armazenamento das células em meio de congelamento contendo 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) amplamente utilizado na criopreservação celular, sendo o crioprotetor de eleição para estes fins. Entretanto, devido a sua alta permeabilidade e alta toxicidade, quando utilizado com elevado tempo de exposição pode proporcionar danos às células (FRESHNEY, 2000). Por outro lado, os crioprotetores propileno glicol e etileno glicol são rotineiramente utilizados na criopreservação de embriões (BAFRANI *et al.*, 2003), também possuem alta permeabilidade, baixa toxicidade e promovem boa taxa de sobrevivência pós-congelamento.

Além disso, o recipiente de envase da suspensão celular a ser criopreservada também pode influenciar a sobrevivência celular por modificar a velocidade da curva de resfriamento e aquecimento durante o processo de criopreservação. Os recipientes para a criopreservação de sêmen de animais vêm sendo estudados há décadas, e no ano de 1970 Cassou utilizou palhetas plásticas de 0,5 mL e 0,25 mL para a criopreservação (MIES FILHO, 1987) e atualmente é uma ferramenta amplamente utilizada para a criopreservação e comercialização de sêmen e embriões no mundo (SALAMON e MAXWELL, 1995).

A criopreservação de células foi inicialmente realizada em ampolas de vidro, sendo mais recentemente substituídas por tubos criogênicos plásticos ou criotubos (SIMONI, 1998; FRESHNEY, 2000; MAUGER *et al.*, 2006). Os criotubos apresentam uma menor praticidade ao armazenamento e a relação superfície:volume não permite uma velocidade de resfriamento tão rápida quanto com a utilização de palhetas plásticas.

O objetivo do trabalho é otimizar uma metodologia de criopreservação de células cutâneas bovinas de cultivos primários em diferentes recipientes utilizando distintos crioprotetores, aumentando-se a praticidade e eficácia dos procedimentos e diminuindo-se os custos de aplicação da técnica e estocagem do material criopreservado.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Preparo de Meios**

Os meios foram preparados com água ultrapura tipo I (Direct-Q, Milli-Q, Billerica, EUA) e a maioria dos reagentes utilizados foi da empresa Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI, EUA), os demais reagentes estão citados.

O meio de cultivo, utilizado para o cultivo e manipulação das células e meio base para o congelamento das células, foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), contendo 25 mM de HEPES e 4,5 gr/L de glicose (D1152) adicionado de 26 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 mM de piruvato de sódio, 65 mg/L de penicilina sódica e 50 mg/L de sulfato de estreptomicina, e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell®, Campinas, SP). Para a individualização das células foi usada solução isotônica de 0,05% de Tripsina 1:250 (BD Difco®, 215240, França) contendo 0,6 mM de EDTA.

Os meios eram preparados, filtrados com filtro descartável com membrana com poro 0,22 µm e armazenados a 4 °C ou -20 °C até o momento de sua utilização.

### **3.2.2 Obtenção e manutenção das células**

As células utilizadas neste trabalho foram obtidas através da técnica de explantação após biópsia auricular de uma fêmea bovina de oito meses da raça Flamenga de propriedade da EPAGRI – Estação Experimental de Lages, estas células foram denominadas de FLA661. Primeiramente, o pavilhão auricular do animal foi tricotomizado e lavado; em seguida foi realizada a antisepsia do local com álcool 70 °GL, seguida da realização de um botão anestésico com 1 mL de lidocaína. Após anestesia local, um fragmento triangular de 1 cm<sup>2</sup> foi removido com o auxílio de um assinalador para orelhas. Após a biópsia, o tecido foi colocado em frasco estéril contendo 10 mL de solução tamponada com fosfato (DPBS) (anexo 3), e transportado até o laboratório.

No laboratório o tecido biopsiado foi submetido a banhos sequenciais de 30 s em álcool 70 °GL, álcool 96 °GL, solução de DPBS contendo 10X antibiótico, DPBS e meio de cultivo. A pele foi separada do tecido cartilaginoso, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e dividida em fragmentos de aproximadamente 3 x 5 mm, sendo colocados 3 a 4 fragmentos por poço, com área de 1,9 cm<sup>2</sup>, em placas de quatro poços (Nunclon - Nunc®, Roskilde, Dinamarca) com 200 µL de meio de cultivo. Os explantes e todas as etapas de cultivo foram realizadas em incubadora a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e atmosfera com umidade saturada.

O monitoramento dos explantes foi realizado diariamente para a observação do desprendimento de células e avaliação quanto à contaminação. Quando as células atingiam 80% de confluência o fragmento tecidual foi retirado e transferido para uma placa nova e mantido nas mesmas condições a fim de continuar o processo de liberação de células. E as células já liberadas, mas aderidas à placa, foram individualizadas através do processo de tripsinização (1ª passagem) , e transferidas na proporção de 1:2 para dois poços da placa de cultivo de seis poços, com 8,96 cm<sup>2</sup> de área em cada poço (TPP, Trasadingen, Suíça) onde foram cultivadas com 3 mL de meio de cultivo por cada poço até atingirem mais de 90% de confluência. O conteúdo de cada poço era tripsinzado mais uma vez e as células eram divididas em outros três poços (2ª passagem) até atingir a confluência máxima, quando eram criopreservadas para formação do banco de células. Para isto, as células na 2ª passagem foram tripsinizadas, centrifugadas a 526 g durante 5 min, ressuspensas e criopreservadas em criotubos na concentração de  $1,6 \times 10^5$  células/mL em meio de cultivo acrescido de 10% de dimetil sulfoxido (DMSO, D5879) pelo sistema de congelamento convencional e mantidas em N<sub>2</sub>L até o momento da sua utilização.

Além disso, duas placas de 35 mm com células na 2ª passagem foram mantidas em cultivo, e foram realizadas passagens sempre que atingiram 90% de confluência para verificar o número máximo de gerações suportadas por estas células.

Para a execução dos experimentos, as células do banco inicial foram descongeladas, cultivadas e multiplicadas até a atingirem 90 % de confluência e a quantidade necessária para cada experimento em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> (5ª e a 8ª passagem).

### **3.2.3 Criopreservação das células**

Para a criopreservação, células com 90% de confluência, foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo, determinada a concentração e criopreservadas de acordo com um dos métodos abaixo descritos.

As células foram diluídas na concentração de  $1 \times 10^6$  cel/mL, os crioprotetores utilizados foram o dimetil sulfoxido (DMSO), o propileno glicol (PG) e etileno glicol (EG) utilizados na concentração de 10% em meio de cultivo. Para a criopreservação era adicionado primeiramente o meio de cultivo, seguido do crioprotetor e a suspensão celular por último.

- Método convencional em criotubos

A suspensão de células para o congelamento foi envasada com um volume de 1 mL por criotubo e os mesmos foram transferidos para o aparato *Mr. Frosty* (Nalgene Nunc Cooler) previamente resfriado a 4 °C (Figura 1). Posteriormente o *Mr. Frosty* foi transferido para a geladeira a 4 °C e mantido durante 15 min, sendo então transferido para o ultrafreezer - 80 °C. Desta maneira, realizar a curva de congelamento de -1 °C/min. Os criotubos permaneceram por pelo menos 12 h, sendo então transferidos para o nitrogênio líquido a -196 °C.

O descongelamento foi realizado 72 h após a criopreservação. Os criotubos foram submersos no banho-maria a 37 °C por aproximadamente um min. Em seguida, o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo cônico de 15 mL o qual continha 2 mL de meio de cultivo com 10% de SFB, previamente aquecido. As células eram centrifugadas por 5 min a 526 g, em seguida o sobrenadante foi desprezado e o conteúdo celular diluído na proporção desejada, para a contagem celular pelo método de exclusão de células mortas por coloração com azul de Tripán a 0,4% (FRESHNEY, 2000).

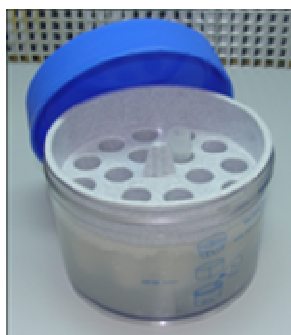


Figura 1. Aparato de congelamento celular *Mr. Frosty*.

- Método “alternativo” em palhetas plásticas de 0,5 mL e 0,25 mL

Após tripsinização, contagem e determinação da concentração as células foram ressuspendidas em solução crioprotetora, e mantidas sob agitação durante o envase. Foram envasados 400 µL da suspensão contendo as células por palheta de 0,5 mL e 150 µL por palheta de 0,25 mL (Figura 2), com o auxílio de uma seringa, a temperatura ambiente, seladas e submetidas ao equilíbrio, o qual foi realizado com o auxílio de um superfície resfriada a aproximadamente 4 °C por 15 min. Posteriormente as palhetas foram colocadas em uma raque

de isopor na posição horizontal e expostas ao vapor de nitrogênio a  $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min e posteriormente imersas em  $\text{N}_2$  líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para o descongelamento, a palheta era retirada do botijão de  $\text{N}_2\text{L}$  e colocada em banho-maria a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 40 s, após o conteúdo da palheta era transferido para um tubo cônico de 1,5 mL contendo 1 mL de meio de cultivo com 10% de SFB sendo realizada a centrifugação por 5 min a 419 g, em seguida o sobrenadante foi desprezado e o conteúdo celular diluído na proporção desejada, para a contagem celular.

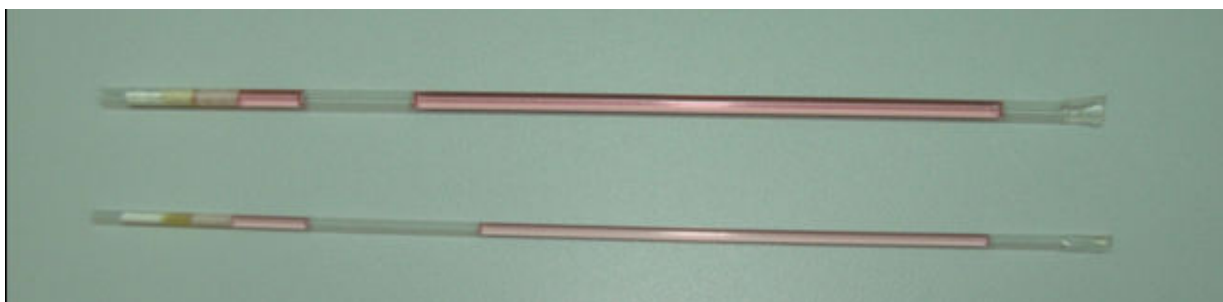


Figura 2. Método alternativo de congelamento celular em palhetas plásticas de 0,5 mL e 0,25 mL.

- Determinação da sobrevivência celular através da curva de crescimento

A curva de crescimento celular foi realizada em placas de 24 poços, com  $1,9\text{ cm}^2$  cada poço (TPP, Trasadingen, Suíça), utilizando uma concentração inicial de 10.000 células por poço em 1 mL de meio de cultivo, de cada crioprotetor e um grupo controle de células não criopreservadas. As leituras foram realizadas em triplicada com 24 h, 48 h e 72 h após o início do cultivo. Para as leituras, as células foram tripsinizadas, após foi acrescentado 200  $\mu\text{l}$  de meio de cultivo e as células foram transferidas para um tubo cônico de 1,5 mL e centrifugadas por 5 min a 419 g. Após a centrifugação o meio foi retirado e acrescentado 100  $\mu\text{l}$  de meio de cultivo, as células foram homogeneizadas e foi retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{l}$  para a determinação da concentração celular pelo método de azul de tripan, as leituras foram realizadas em câmara de Neubauer.

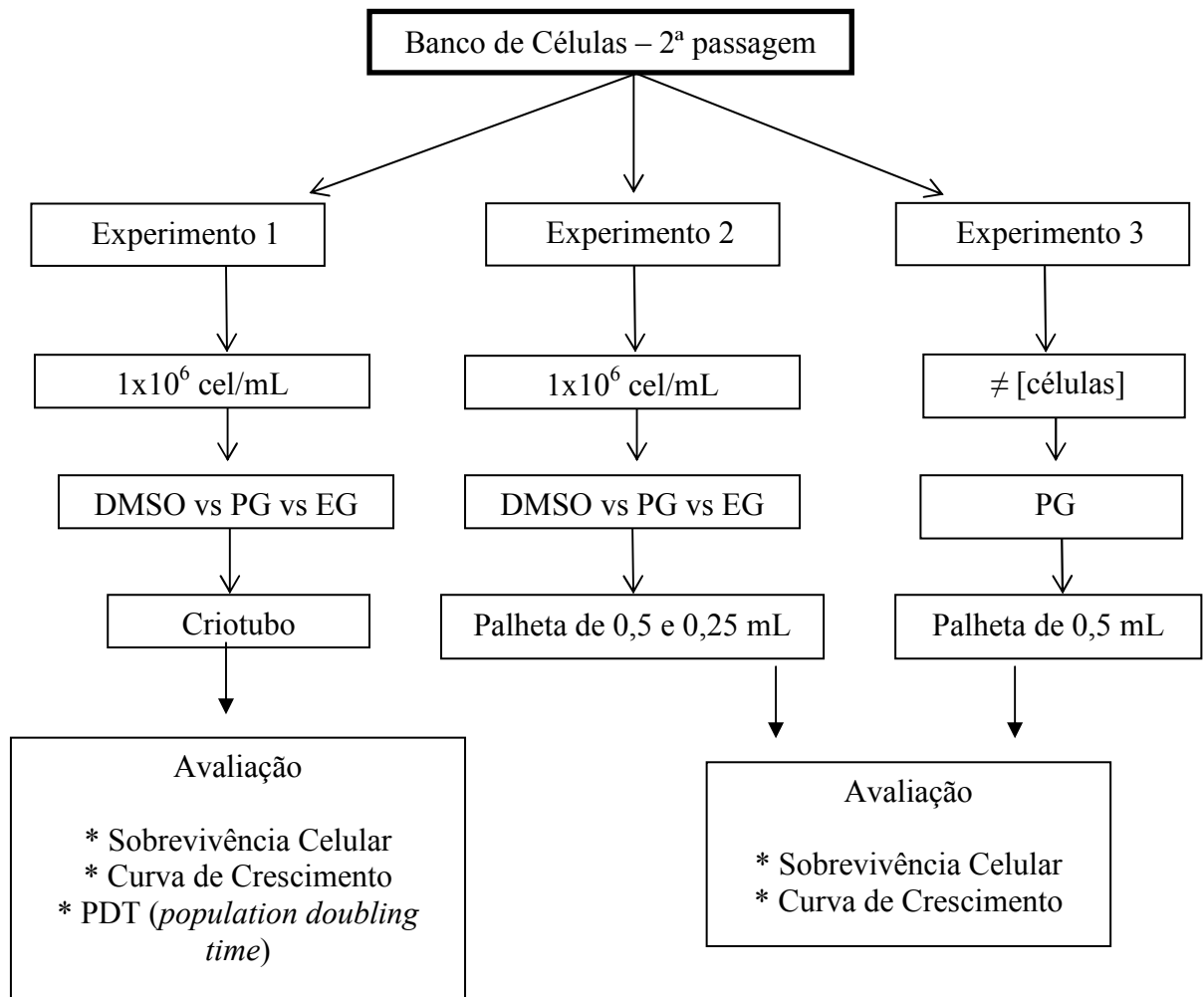
- Determinação do PDT (*population doubling time*)

O PDT foi realizado conforme Freshney (2000) em placas de 24 poços, com  $1,9\text{ cm}^2$  (TPP, Trasadingen, Suíça) cada poço contendo 1 mL de meio de cultivo, utilizando três concentrações iniciais: 10.000, 30.000 ou 100.000 células por poço de cada tratamento, além de um grupo controle de células não criopreservadas. A contagem foi realizada durante cinco

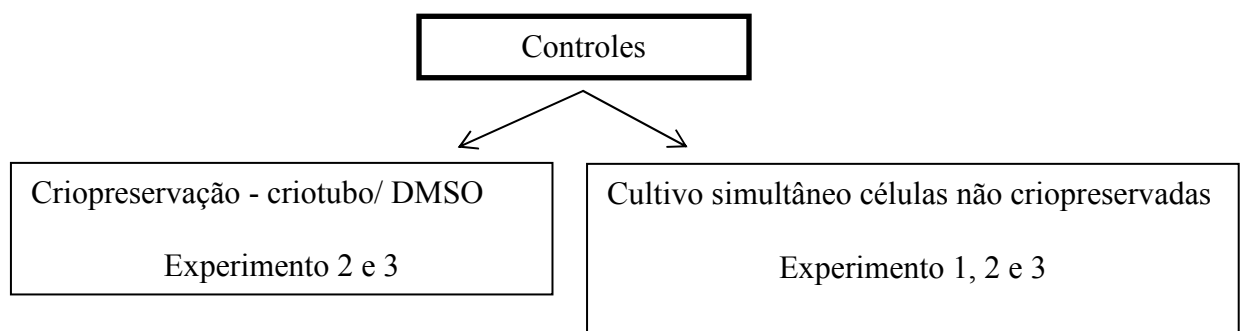


dias de cultivo com 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h, pelo mesmo método utilizado na curva de crescimento celular.

### 3.2.4 Delineamento experimental



- Controle dos Experimentos



### **3.2.5 Experimento 1: Congelamento de células somáticas bovinas em tubos criogênicos comparando distintos crioprotetores.**

Células entre 5<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> passagem foram criopreservadas em criotubos em uma das três soluções de congelamento: Tratamento DMSO: meio de cultivo + 10% de DMSO; Tratamento Propileno Glicol: meio de cultivo + 10% de PG; ou Tratamento Etileno Glicol: meio de cultivo + 10% de EG. Para isto, as células foram contadas e diluídas em cada solução crioprotetora numa concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, estas células foram adicionadas aos criotubos em um volume final de 1 mL, e congeladas pelo método convencional.

Foram realizadas 10 repetições, em cada repetição foi congelado dois criotubos de cada crioprotetor. Imediatamente após o descongelamento foi avaliada a sobrevivência celular de todas as repetições, além disso, três repetições foram realizadas o PDT e nas demais a curva de crescimento celular.

### **3.2.6 Experimento 2: Criopreservação de células somáticas bovinas utilizando distintos crioprotetores e recipientes de congelamento.**

Células entre 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> passagem foram criopreservadas utilizando as soluções crioprotetoras: Tratamento DMSO: meio de cultivo + 10% de DMSO; Tratamento Propileno Glicol: meio de cultivo + 10% de PG; ou Tratamento Etileno Glicol: meio de cultivo + 10% de EG e as células foram envasadas em palhetas plásticas de 0,5 mL e 0,25 mL. Cinco repetições foram realizadas, sendo criopreservada em cada uma quatro palhetas de 0,5 mL e sete palhetas de 0,25 mL de cada tratamento utilizado e dois criotubos como controle utilizando o crioprotetor DMSO. Imediatamente após o descongelamento foi avaliada a sobrevivência celular de todas as repetições e a curva de crescimento celular.

### **3.2.7 Experimento 3: Criopreservação de células somáticas bovina comparando diferentes concentrações celulares.**

Neste experimento, foi utilizado células entre 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> passagem, comparando o congelamento em 4 diferentes concentrações celulares: de  $0,33 \times 10^6$  cel/mL,  $1 \times 10^6$  cel/mL,  $3 \times 10^6$  cel/mL e  $5 \times 10^6$  cel/mL em palhetas de 0,5 mL, usando o crioprotetor PG. Foram realizadas 6 repetições deste experimento, tendo sido criopreservado pelo menos três palhetas de cada tratamento. Para avaliação da sobrevivência celular, duas palhetas da menor concentração e uma das outras concentrações foram descongeladas, e foi realizada contagem das células viáveis pela coloração de azul de Tripán e a da a curva de crescimento celular.

### 3.2.8 Análise Estatística dos Dados

Os dados foram analisados pelo pacote estatístico Minitab® (State College, EUA), submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey e teste de Chi quadrado, com nível de significância de 5%.

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Cultivo Celular

As células FLA661 foram obtidas através da técnica de explantação (Figura 3) com monitoramento diário do fragmento tecidual (Figura 4).

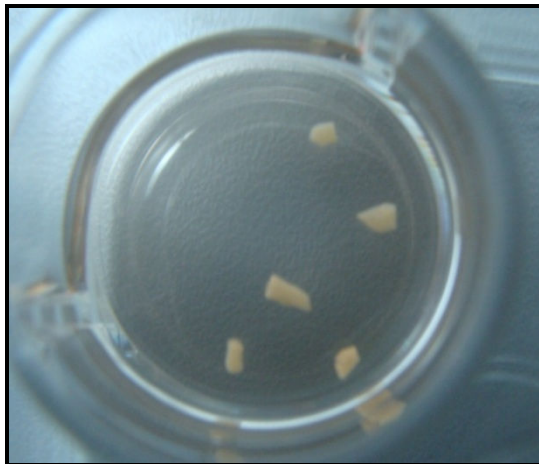


Figura 3. Fragmento tecidual auricular obtido pela técnica de explantação de uma fêmea bovina da raça Flamengo denominada de FLA661 colocado em cultivo *in vitro*.

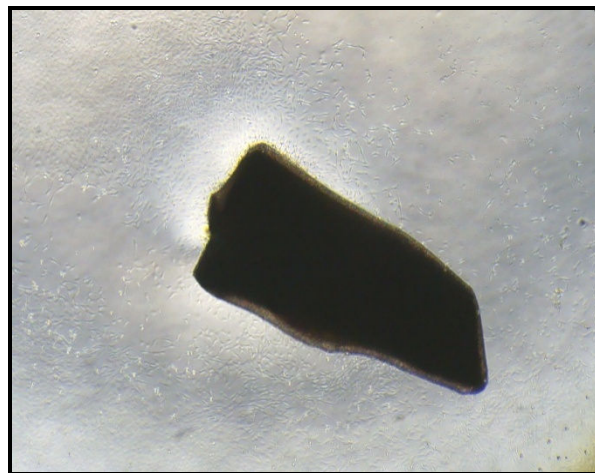


Figura 4. Fragmento tecidual FLA661 apresentando desprendimento de células.

Durante o período de cultivo as células FLA661 suportaram até 70ª passagem, as quais foram realizadas a cada dois dias até a 45ª passagem, a cada três dias até 60ª passagem, posteriormente a cada quatro dias até a passagem 68ª e a cada sete dias até 70ª passagem. As passagens foram realizadas quando a célula apresentava uma confluência de aproximadamente 100%, sendo dividida na proporção de 1:2 (Figura 5).

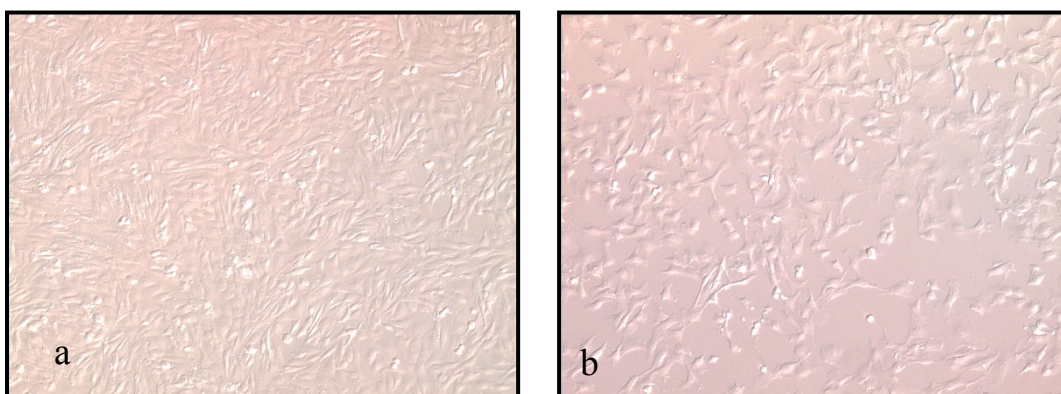


Figura 5. Tapete celular da célula FLA661 utilizada no trabalho. (a) tapete celular com 100 % de confluência; (b) tapete celular com 50% de confluência.

### 3.3.2 Experimento 1 - Congelamento de células somáticas bovinas em tubos criogênicos comparando distintos crioprotetores.

Na tabela 1 são apresentados os resultados de sobrevivência imediatamente após o descongelamento pela técnica de azul de Tripán e a curva de crescimento celular. As taxas de sobrevivência celular entre os grupos experimentais DMSO, PG e EG criopreservados em criotubos não apresentaram diferença estatística.

Tabela 1. Sobrevivência celular e curva de crescimento das células criopreservadas com DMSO ou PG ou EG.

Tratamento	% de sobrevivência*	Curva de Crescimento (nº células)#		
		24 h	48 h	72 h
DMSO	67,3 ± 4,4	10643	34298	94262
PG	68,1 ± 4,9	11143	34786	94500
EG	67,5 ± 4,4	10964	34107	93905

\*não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste de Chi quadrado ( $p > 0,87$ ).

# não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Quando avaliada a viabilidade celular após a criopreservação, através da curva de crescimento celular (Figura 6), não houve diferença estatística entre os grupos experimentais

(DMSO vs. PG vs. EG), entretanto, todos os grupos experimentais foram significativamente inferiores ao controle não criopreservado, em todos os períodos de cultivo.

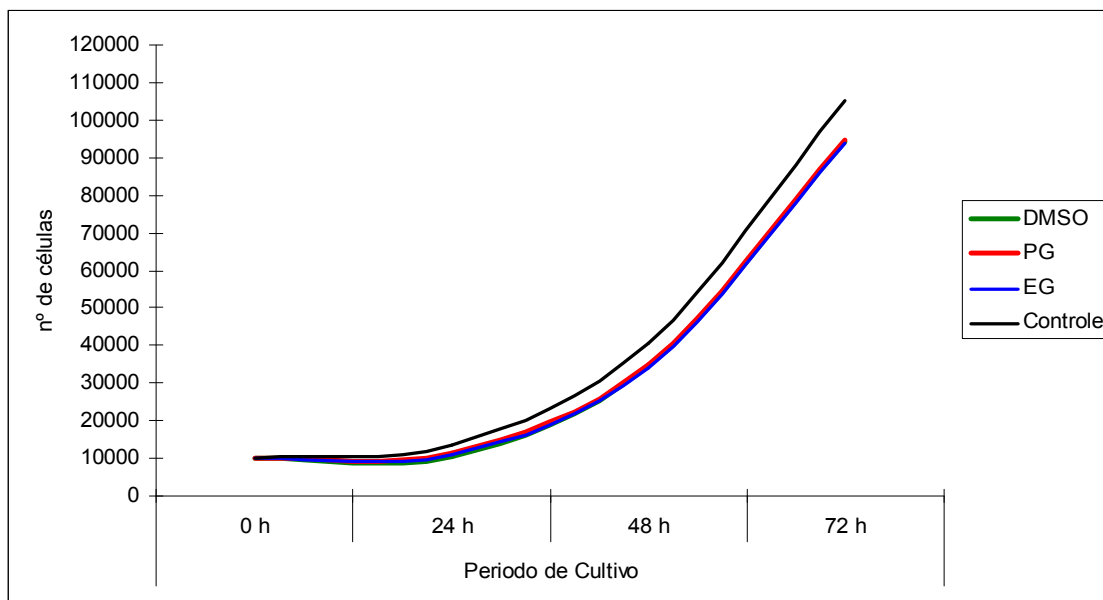


Figura 6. Curva de crescimento celular, contagem do número de células após criopreservação, reaquecimento e cultivo, utilizando diferentes crioprotetores (DMSO, PG e EG).

Os dados da curva de crescimento celular indicam através da correlação de Pearson, que houve correlação positiva entre o período de cultivo (24 h, 48 h e 72 h) e o número de células, conforme o esperado, mas não houve correlação com respeito ao tratamento, pois independente do tratamento utilizado o número de células aumentou conforme o tempo de cultivo.

Na estimativa de tempo de divisão celular, utilizando o programa disponível no site <http://www.doubling-time.com>, observou-se que o tempo de divisão variou entre 15,9 h e 16,5 h, calculado durante o crescimento exponencial das células (fase log).

### 3.3.3 Experimento 2 - Criopreservação de células somáticas bovinas utilizando distintos crioprotetores e recipientes de congelamento.

Na análise de sobrevivência celular não houve diferença entre tratamentos (DMSO vs. PG vs. EG) e os recipientes (palheta de 0,25 ml vs. palheta de 0,5 mL vs. criotubo), os dados estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2. Sobrevivência das células (%) criopreservadas em palhetas de 0,25 mL e palheta de 0,5 mL com a utilização DMSO ou PG ou EG e do grupo controle criotubo.

Recipientes	Palheta de 0,25 mL*	Palheta de 0,5 mL*	Criotubo*
<b>Crioprotetor</b>			
<b>DMSO</b>	66,1 ± 3,0	72,9 ± 11,7	77,7 ± 2,1
<b>PG</b>	66,0 ± 3,7	75,3 ± 10,8	---
<b>EG</b>	61,6 ± 4,0	67,8 ± 5,0	---

\* não houve diferença estatística entre linhas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Para verificar a viabilidade celular durante o cultivo após o uso dos diferentes recipientes e crioprotetores, foi realizada a curva de crescimento celular (Tabela 3). As palhetas de 0,25 mL e 0,5 mL proporcionam sobrevivência e viabilidade durante a curva (24 h, 48 h e 72 h), apresentando semelhança entre si quando utilizado o mesmo crioprotetor (DMSO vs. PG vs. EG).

Tabela 3. Curva de crescimento celular das células FLA 661 criopreservadas em palheta de 0,25 mL ou palheta de 0,5 mL utilizando os crioprotetores DMSO ou PG ou EG e controle criopreservado em criotubo.

Tempo	Crioprotetor	Palheta de 0,25 mL	Palheta de 0,5 mL	Criotubo	Controle
24 h	DMSO	12417 <sup>a,A</sup>	12600 <sup>a,A</sup>	13683 <sup>a</sup>	
	PG	12217 <sup>a,A</sup>	12025 <sup>a,A</sup>	---	
	EG	10150 <sup>b,B</sup>	10613 <sup>b,B</sup>	---	
					17350 <sup>c</sup>
48 h	DMSO	31950 <sup>c,C</sup>	32600 <sup>c,C</sup>	32583 <sup>c</sup>	
	PG	32267 <sup>c,C</sup>	33433 <sup>c,C</sup>	---	
	EG	28500 <sup>d,D</sup>	29000 <sup>d,D</sup>	---	
					40433 <sup>e</sup>
72 h	DMSO	92400 <sup>e,E</sup>	92933 <sup>e,E</sup>	93633 <sup>e</sup>	
	PG	92867 <sup>e,E</sup>	93500 <sup>e,E</sup>	---	
	EG	88233 <sup>f,F</sup>	88450 <sup>f,F</sup>	---	
					102667 <sup>g</sup>

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05).

<sup>A,B,C,D,E,F</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

### 3.3.4 Experimento 3 - Criopreservação de células somáticas bovina comparando diferentes concentrações celulares.

A sobrevivência celular do grupo experimental contendo  $5 \times 10^6$  cels/mL apresentou menor do que os demais (43,7%), e o controle em criotubo foi superior a todos grupos experimentais, os os dados estão sumarizados na tabela 4.

Tabela 4. Sobrevivência das diferentes concentrações celulares, criopreservadas em palhetas de 0,5 mL com crioprotetor PG após descongelamento.

Tratamento	% sobrevivência	Curva de Crescimento		
		24 h	48 h	72 h
$0,33 \times 10^6$	$76,3 \pm 8,0^a$	11208 <sup>a</sup>	32875 <sup>a</sup>	91194 <sup>a</sup>
$1 \times 10^6$	$71,0 \pm 5,8^{a,b}$	11333 <sup>a</sup>	33139 <sup>a</sup>	92194 <sup>a</sup>
$3 \times 10^6$	$61,4 \pm 5,8^b$	10069 <sup>b</sup>	31556 <sup>b</sup>	90667 <sup>b</sup>
$5 \times 10^6$	$43,7 \pm 10,5^c$	9722 <sup>b</sup>	30583 <sup>b</sup>	90028 <sup>b</sup>
Criotubo (controle)	$82,6 \pm 5,5^d$	12611 <sup>c</sup>	34389 <sup>c</sup>	93861 <sup>c</sup>
Controle (não criopreservado)		15194 <sup>d</sup>	40958 <sup>d</sup>	103333 <sup>d</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Para verificar se as concentrações celulares interferem na viabilidade pós descongelamento foi realizada a curva de crescimento celular de todos os grupos experimentais, e também um controle não criopreservado. O controle não criopreservado foi superior a todos os grupos experimentais durante todo período de cultivo.

## 3.4 DISCUSSÃO

No primeiro experimento comparamos os crioprotetores DMSO, PG e EG em células somáticas criopreservadas em tubos criogênicos, utilizando uma curva de  $-1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  para o congelamento. As taxas de sobrevivência foram de 67,3% em DMSO, 68,1% em PG e 67,5%, em EG não apresentando diferença significativa entre os crioprotetores nas condições de nosso laboratório. De forma semelhante, Katkov *et al.* (2011) compararam os mesmos crioprotetores (DMSO, PG, EG e GLY) no congelamento de células tronco humanas, expostas a 10% do crioprotetor, e a sobrevivência celular não apresentou diferença entre os crioprotetores DMSO e o EG, entretanto, o PG foi significativamente inferior.

Castro *et al.* (2010) criopreservaram tecido ovariano caprino utilizando os crioprotetores DMSO, PG e EG, não havendo diferença no percentual de folículos normais entre os diferentes agentes crioprotetores. Da mesma maneira, Lucci *et al.* (2004) criopreservaram tecido ovariano de bovinos zebu. Os tecidos foram expostos a 1,5 M DMSO ou PG, e apresentaram uma porcentagem similar de folículos normais, enquanto os expostos a 10% GLY (glicerol) ou 1,5 M EG reduziram a porcentagem de folículos normais. Wanderley *et al.* (2011) na criopreservação de tecido ovariano de cutia, utilizando 1,5 M de DMSO ou PG ou EG, verificaram que o crioprotetor PG foi mais eficaz.

Sabe-se que a permeabilidade do crioprotetor à célula é extremamente importante para o sucesso na criopreservação de células somáticas, oócitos e embriões para evitar a formação de gelo intracelular. Desta maneira, Pedro *et al.* (2005) estudaram a permeabilidade dos crioprotetores DMSO, EG, PG, GLY e acetamina em oócitos de camundongo, e embriões em diferentes fases de desenvolvimento. A permeabilidade do EG é incrementada gradualmente entre o estágio de 8-células até mórula, enquanto que permeabilidade do PG é similar em todos os estágios de desenvolvimento. Em mórula de ovelhas os dados de Songsasen *et al.* (2002) mostram que permeabilidade dos crioprotetores difere, sendo maior para EG, seguido do PG, DMSO. Já em oócitos bovinos há permeabilidade similar entre o DMSO e EG (AGCA *et al.*, 1998). A permeabilidade é diferente em cada espécie e no produto biológico que está sendo criopreservado. Dessa forma, a permeabilidade do EG em palhetas plásticas foi inferior ao criotubo, o que pode estar relacionado com a curva de congelamento rápida utilizada nas palhetas plásticas não tendo tempo suficiente para permear nas células.

Newton *et al.* (1998) criopreservaram tecido de ovário humano, comparando os crioprotetores DMSO, EG, PG e glicerol (GLY) na concentração de 1,5 M em diferentes tempos de equilíbrio a 4 °C e a 37 °C, na temperatura de 37 °C o crioprotetor PG é mais indicado e a 4 °C não houve diferença entre os crioprotetores DMSO e EG. Já Ebertz e McGann (2004) utilizaram células de córnea humana (endoteliais, epiteliais e queratócitos) para comparar a permeabilidade dos crioprotetores DMSO e PG a diferentes temperaturas: 4 °C, 13 °C, 22 °C e 37 °C, o crioprotetor PG foi mais permeável em todas as temperaturas em relação ao crioprotetor DMSO.

Os criotubos são amplamente utilizados para a criopreservação de células com o uso do congelamento lento, porém o armazenamento ao longo prazo de grandes quantidades de células visando a conservação dos recursos genéticos animais requer o uso de botijões de nitrogênio líquido maiores (CETINKAYA e ARAT, 2011). A criopreservação células



somáticas em palhetas plásticas de 0,25 mL e 0,5 mL são uma alternativa para a redução do espaço ocupado nos botijões de nitrogênio.

No segundo experimento comparamos os recipientes de envase com o uso dos crioprotetores DMSO, PG e EG. Em nossas condições de trabalho, não houve diferença entre palhetas de 0,25 mL, palhetas de 0,5 mL e o criotubo nas taxas de sobrevivência celular. Gilmore *et al.* (2000), na criopreservação de sêmen humano, utilizando os crioprotetores DMSO, EG, PG e GLY, e curva de congelamento de  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , observaram que o EG é mais permeável permitindo uma maior desidratação que os demais crioprotetores. Mullen *et al.* (2008) verificaram que a permeabilidade de oócitos humanos, relatando que o crioprotetor EG a temperaturas mais baixa está associado com uma maior perda de volume total e um lento retorno ao volume isotônico. Li *et al.* (2010) trabalharam com a criopreservação células tronco em palhetas de 0,25 mL, já Forell *et al.* (2008) e Rochetti *et al.* (2010) utilizaram palhetas de 0,5 mL para criopreservação de células somáticas para uso na clonagem animal, mostrando que as palhetas são um método eficaz de criopreservação.

Hasegawa *et al.* (2011) utilizaram criotubos para o congelamento de sêmen de camundongo comparando com palheta, o descongelamento apresentou diferença, que pode ter ocorrido devido a parede do criotubo ser mais espessa do que a parede da palheta assim a difusão da temperatura no criotubo não seria uniforme, entretanto não observamos esta diferença em nosso trabalho.

No terceiro experimento foi testada a melhor concentração celular a ser criopreservada e que apresenta viabilidade após o descongelamento. A concentração de  $5 \times 10^6$  cel/mL, foi a que apresentou as menores taxas de sobrevivência celular (43,7%), já a concentração de  $0,33 \times 10^6$  foi a que obteve a melhor taxa (76,3%) comparada ao controle (82,6%). Rowley *et al.* (1994) observaram que células-tronco hematopoéticas podem ser criopreservadas utilizando o crioprotetor DMSO em uma concentração celular elevada de  $3,7 \times 10^8/\text{mL}$  sem comprometimento da viabilidade.

Embora neste experimento o congelamento de células na concentração de  $3 \times 10^6$  cel/mL tenha se mostrado significativamente inferior as taxas de sobrevivência, utilizando concentrações mais baixas, biologicamente esta concentração pode ser utilizada, pois permite a recuperação de uma quantidade maior de células viáveis. A escolha então dependerá do número de células, necessárias após o descongelamento.

Nas curvas de crescimentos realizadas nos três experimentos, todos os grupos experimentais foram significativamente inferiores ao grupo controle, como esperado, já que as células utilizadas no controle não foram criopreservadas.

### 3.5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

- A criopreservação de células somáticas em palhetas plásticas apresenta eficácia semelhante à observada em criotubos, resultando em uma boa taxa de sobrevivência celular e viabilidade pós descongelamento para o cultivo *in vitro*.
- O crioprotetor propileno glicol pode ser utilizado como uma alternativa ao DMSO no congelamento de células somáticas
- As concentrações de  $0,33 \times 10^6$  cel/mL e  $1 \times 10^6$  cel/mL mostraram-se melhores para o congelamento celular, entretanto, dependendo da finalidade utilizada, a concentração de  $3 \times 10^6$  cel/mL pode ser utilizada

### 3.6 REFERÊNCIAS

AGCA, Y.; LIU, J.; PETER, A.T.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. Effect of Developmental Stage on Bovine Oocyte Plasma Membrane Water and Cryoprotectant Permeability Characteristics. **Molecular Reproduction and Development** 49:408–415, 1998.

BAFRANI, H.H.; SALSABILI, N.; PASBAKHS, P.; HASSANI, H.; MOVAHEDIN, M.; AL-TARIHI, T.; AKBARI, F.; KESHAVARZ, M. Comparison of 1,2-Propanediol and Ethylene Glycol for Cryopreservation of Slow-Cooled Mouse Zygotes and Their Subsequent Development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 20:234-240, 2003.

CASTRO, S.V.; GONÇALVES, R.F.B.; LUZ, H.K.M.; WANDERLEY, L.S.; FAUSTINO, L.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Criopreservação de tecido ovariano caprino utilizando etilenoglicol, propanodiol ou dimetilsulfóxido. **Acta Scientiae Veterinariae** 38(2):811, 2010.

CETINKAYA, G., ARAT, S. Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. **Cryobiology**, 2011.

EBERTZ, S.L.; MCGANN, L.E. Cryoinjury in endothelial cell monolayers. **Cryobiology** 49:37-40, 2004.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4ª edição: Wiley-Liss, 2000, 577p.

FORELL, F., FELTRIN, C.; SANTOS, L.C.; 1, COSTA, U.B., VIEIRA, A.D.; HÖLKER, M.; RODRIGUES, J.L. Otimização do sistema de produção de clones por transferência nuclear da célula. **Acta Scientiae Veterinarie** 36:221-228, 2008.

GILMORE, J.A.; LIU, J.; WOODS, E.J.; PETER, A.T; CRITSER, J.K. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Human Reproduction** 15(2):335-43, 2000.

HASEGAWA, A.; YONEZAWA, K.; OHTA, A.; MOCHIDA, K.; OGURA, A. Optimization of a Protocol for Cryopreservation of Mouse Spermatozoa Using Cryotubes. **Journal of Reproduction Development**, 2011.

KATKOV, I.I.; KAN, N.G.; CIMADAMORE,F.; NELSON, B.; SNYDER, E.Y.; TERSKIKH, A.V. DMSO-free programmed cryopreservation of fully dissociated and adherent human induced pluripotent Stem Cells. **Stem Cells International** 2011.

LI, Y.; TAN, J.; LI, L. Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. **Fertility and Sterility** 93:999-1004, 2010.

LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.A.; LOPES, L.H.R.; RUMPF, R.; BÁO, S.N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology** 61:1101–1114, 2004.

MAUGER, P.E, LE BAIL, P.Y.; LABBÉ, C. Cryobanking of fish somatic cells: Optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B v. 144, p. 29–37, 2006.

MAZUR, P. Principles of medical cryobiology: the freezing of living cells, tissues, and organs. In: Brittar, E.E. e Brittar, N. **Cell chemistry and physiology**, 1996.

MIES FILHO, A. Tecnologia do sêmen II. In: Inseminação Artificial. v.2. 6º edição. Porto Alegre: Revista e Atualizada, 1987, 502-534.

MULLEN, S.F.; LI, M.; LI, Y.; CHEN, Z.J.; CRITSER, J.K. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. **Fertility and Sterility** 6:1812-1825, 2008.

NEWTON, H.; FISHER, J.; ARNOLD, J.R.; PEGG, D.E.; FADDY, M.J.; GOSDEN, R.G. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. **Human Reproduction** 13:376-80, 1998.

PEDRO, P.B; YOKOYAMA, E.; ZHU, S.E.; YOSHIDA, N.; VALDEZ JR, D.M.; TANAKA, M.; EDASHIGE, K.; KASAI, M. Permeability of Mouse Oocytes and Embryos at Various Developmental Stages to Five Cryoprotectants. **Journal of Reproduction and Development**, 51:235-246, 2005.

ROCHETTI, R.; DE BEM, T.H.C.; BRESSAN, F.F.; SANGALLI, J.R.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F.V. Criopreservação celular em palhetas para fins de transferência nuclear em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae** 38(2):819, 2010.

ROWLEY, S.D.; BENSINGER, W.T.; GOOLEY, T.A.; BUCKNER, C.D. Effect of Cell Concentration on Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cell Cryopreservation. **Blood** 9:2731-2736, 1994.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Review - Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science** 37:185-249, 1995.

SIMIONE, F. P. **Cryopreservation Manual** - Nalge Nunc International, 1998.

SONGSASEN, N.; RATTERREE, M.S.; VANDEVOORT, C.A.; PEGG, D.E.; LEIBO, S.P. Permeability characteristics and osmotic sensitivity of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) oocytes. **Human Reproduction** 17(7): 1875-1884, 2002.

WANDERLEY, L.S.; MACHADO LUZ, H.K.; FAUSTINO, L.R.; LIMA, I.M.T.; LOPES, C.A.P.; SILVA, A.R.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Ultrastructural features of agouti (*Dasyprocta aguti*) preantral follicles cryopreserved using dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propanediol. **Theriogenology**, 2011.

#### 4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

- A criopreservação de células somáticas em palhetas plásticas apresenta eficácia semelhante a observada em criotubos resultando em uma boa taxa de sobrevivência celular e viabilidade pós descongelamento para o cultivo *in vitro*.
- O crioprotetor propileno glicol pode ser utilizado como uma alternativa ao DMSO no congelamento de células somáticas.
- As concentrações de  $0,33 \times 10^6$  cel/mL e  $1 \times 10^6$  cel/mL mostraram-se melhores para o congelamento celular, entretanto, dependendo da finalidade, a concentração de  $3 \times 10^6$  cel/mL pode ser utilizada.
- Os protocolos utilizados neste trabalho poderão ser testados para criopreservação de células tronco.
- Os protocolos utilizados serão testados também para células somáticas de diferentes origens e espécies doadoras.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S., PELLIZZER, C., PAPARELLA, M., HARTUNG, T., BREMER, S. The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. **Toxicology in Vitro** 20:265–271, 2006.

ANDRABI, S.M., MAXWELL, W.M. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science** 99:223-43, 2007.

ARMITAGE, W.J; JUSS, B.K. Freezing monolayers of cells without gap junctions. **Cryobiology** 46:194-196, 2003.

BAFRANI, H.H.; SALSABILI, N.; PASBAKSH, P.; HASSANI, H.; MOVAHEDIN, M.; AL-TARIHI, T.; AKBARI, F.; KESHAVARZ, M. Comparison of 1,2-Propanediol and Ethylene Glycol for Cryopreservation of Slow-Cooled Mouse Zygotes and Their Subsequent Development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 20:234-240, 2003.

BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis** 5:119-126, 2009.

BAUST, J.M.; SNYDER, K.K.; VANBUSKIRK, R.G.; BAUST J.G. Changing Paradigms in Biopreservation, Review. **Biopreservation and Biobanking** 7:3-12, 2009.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae** 39(2): 1-17, 2011.

CAMPISI, J.; FAGAGNA, F.A. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Molecular Cell Biology** 8(9):729-40, 2007.

COGER R, TONER M. **Preservation Techniques for Biomaterials**. In: *The Biomedical Engineering Handbook* 2ª edição. Boca Raton: CRC Press LLC. 2000. Disponível em: <http://sm-7.net/upload/Detail%20mashin/bmt/The%20Biomedical%20Engineering%20Handbook%20-%20Ed%20-%20Bronzino/ch045.pdf>

DIMRI, G.P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANO, E.E.; LINSKENS, M.; RUBELJ, I.; PEREIRA-SMITH, O.; PEACOCKE,

M.;CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Cell Biology** 92:9363-9367, 1995.

EBERTZ, S.L.; McGANN, L.E. Cryoinjury in endothelial cell monolayers. **Cryobiology** 49:37-40, 2004.

DOBRINSKY, K. Y. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, p.17-26, 1996.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology** 23(1):1-13, 1986.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 4<sup>a</sup> edição: Wiley-Liss, 2000, 577p.

FORELL, F., FELTRIN, C.; SANTOS, L.C.; 1, COSTA, U.B., VIEIRA, A.D.; HÖLKER, M.; RODRIGUES, J.L. Otimização do sistema de produção de clones por transferência nuclear da célula. **Acta Scientiae Veterinarie** 36:221-228, 2008.

GORDON, I. Storage and criopreservation of oocytes and embryos. In: GORDON I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: CAB International, Raven Press, p. 293-328, 1994.

HAYFLICK, I.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research** 25:585-621, 1961.

HAYFLICK, I. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research** 37:614-636, 1965.

HOLT, W.V., PICKARD, A.R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Reviews of Reproduction** 4:143-50, 1999.

KARLSSON, J.O.M.; TONER. M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. **Biomaterials**, v. 17, p. 243-256, 1996.

KATKOV, I.I.; KAN, N.G.; CIMADAMORE,F.; NELSON, B.; SNYDER, E.Y.; TERSKIKH, A.V. DMSO-free programmed cryopreservation of fully dissociated and adherent human induced pluripotent Stem Cells. **Stem Cells International** 2011.

LEON-QUINTO, T.; SIMON, M.A.; CADENAS, R.; JONES, J.; MARTINEZ-HERNANDEZ, J.M.; VARGAS, A.; MARTÍN, F.; SORIA, B. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. **Animal Reproduction Science** 112:347–361, 2009.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMON, M. A.; SÁNCHEZ, Á.; MARTÍN, F.; SORIA, B. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. **Cryobiology** 62:145–151, 2011.

LI, L.F.; YUE, H.; MA, J.; GUA, W.J.; MA, Y.H. Establishment and characterization of a fibroblast line from Simmental cattle. **Cryobiology** 59:63–68, 2009a.

LI, X.C., YUE, H., LI, C.Y., HE, X.H., ZHAO, Q.J., MA, Y.H., GUAN, W.J., MA, J.Z. Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from Jining Black Grey goat for genetic conservation. **Small Ruminant Research** 87:17–26, 2009b.

LI, Y.; TAN, J.; LI, L. Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. **Fertility and Sterility** 93:999-1004, 2010.

LOVELOCK, J.E e BISHOP, M.W. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. **Nature**, 16(183):1394-5, 1959.

MALPIQUE, R.; EHRHART, F.; KATSEN-GLOBA, A.; ZIMMERMANN, H.; ALVES, P.M. Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing. **Tissue Engineering** 15:373-383, 2009.

MAUGER, P.E, LE BAIL, P.Y.; LABBÉ, C. Cryobanking of fish somatic cells: Optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B** v. 144, p. 29–37, 2006.

MAXWELL, W.M.C.; LANDERS, A.J.; EVANS, G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. **Theriogenology** 43:1201-1210, 1995.

MAZUR, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **The Journal of General Physiology** v.47, 1963.

MAZUR, P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells - Abstract. **Cryobiology** 4:181-192, 1966.



MAZUR, P.; SCHMIDT, J.J. Interactions of cooling velocity, temperature, and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast - Abstract. **Cryobiology** 1: 1-17, 1968

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science** 168:939-49, 1970.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology** 14:251-272, 1977.

MAZUR, P. Principles of medical cryobiology: the freezing of living cells, tissues, and organs. In: Brittar, E.E. e Brittar, N. **Cell chemistry and physiology**, 1996.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; SEIDEL, G.E. Minireview - Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology of Reproduction**, 78:2-12, 2008.

McCANN, L. E. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. **Cryobiology** 15:382-390, 1978.

MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents – Abstract. **Cryobiology** 8(2): 173-183, 1971.

MIES FILHO, A. Tecnologia do sêmen II. In: Inseminação Artificial. v.2. 6º edição. Porto Alegre: Revista e Atualizada, 1987, 502-534.

MUKHERJEE, I. N. **A rational design approach for the cryopreservation of natural and engineered tissues**. 2008. 219 p. Degree Doctor of Philosophy in the School of Chemical & Biomolecular Engineering Georgia Institute of Technology.

NTP-CERHR Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Ethylene Glycol. **Reproductive Toxicology** 18:457-532, 2004.

NTP-CERHR Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Propylene Glycol. **Reproductive Toxicology** 18:533-579, 2004.

POLGE, C.; SMITH, A.U; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, 164:666, 1949.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, V.312, p.573-575, 1985.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Review - Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science** 37:185-249, 1995.

SIMIONE, F. P. **Cryopreservation Manual** - Nalge Nunc International, 1998.

SILVARES, O.M.; CARVALHO, E.G.; TOSCANO, W.M.; HUGGINS, C.E. The thermodynamics of water transport from biological cells during freezing. **Journal of Heat Transfer** 76:582-588, 1975.

SPRITZE, A.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; MCMANUS, C. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1157-1164, 2003.

TABERLET, P.; VALENTINI, A.; REZAEI, H.R.; NADERI, S.; POMPANON, F.; NEGRINI, R.; AJMONE-MARSAN, P. Are cattle, sheep and goats endangered species? **Molecular Ecology** 17:275-284, 2008.

TABERLET, P.; COISSAC, E.; PANSU, J; POMPANON, F. Conservation genetics of cattle, sheep, and goats. **Comptes Rendus Biologies** 334:247–254, 2011.

TÃO, Y.; LIU, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; FANG, J.; HAN, W.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; DING, J.; ZHANG, X. Fibroblast cell line establishment, cryopreservation and interspecies embryos reconstruction in red panda (*Ailurus fulgens*). **Zygote** 17:117–124, 2009.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, V.60-61, p. 357-364, 2000.

VILLALBA, R.; BENITEZ, J.; NO-LOWIS, E.; RIOJA, L.F.; GÓMEZ-VILLAGRÁN, J.L. Cryopreservation of Human Skin with Propane-1,2-diol. **Cryobiology** 33(5):525-529, 1996.

WHITE, K. L.; BUNCH, T.D.; MITALIPOV, S.; REED, W.A. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. **Cloning**, v. 1, n. 1, p. 47-54, 1999.

WU, H.; GUAN, W.; LI, H.; MA, Y. Establishment and characteristics of white ear lobe chicken embryo fibroblast line and expression of six fluorescent proteins in the cells. **Cell Biology International** 32:1478-1485, 2008.

WUSTEMAN, M.; RAUEN, U.; SIMMONDS, J.; HUNDS, N.; PEGG, D.E. Reduction of cryoprotectant toxicity in cells in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. **Cryobiology** 56:72–79, 2008.

**ANEXOS****Anexo 1 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium**

<b>Reagente</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Catalogo</b>	<b>pm</b>	<b>Concentrao</b>
DMEM	Sigma	D1152		
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma	S5761	84,01	26 mM
Piruvato de sodio	Sigma	P4562	110,04	0,2 mM
Penicilina	Sigma	P7794		65mg/L
Estreptomicina	Sigma	S1277		50mg/L

Osmolaridade: 295 a 298 mOsm

pH: 7,2 – 7,3

**Anexo 2 - Tripsina**

<b>Reagente</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Catálogo</b>	<b>pm</b>	<b>Concentração</b>
Tripsina	Difco	215240		0,05%
NaCL	Sigma	S5886	58,44	116 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma	S5011	120	1 mM
KCL	Sigma	P5405	74,55	5 mM
EDTA	Sigma	E6511	416,2	0,6 mM
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma	S5761	84,01	26 mM
Vermelho de Fenol	Sigma	P5530		5 mg/L

Osmolaridade 289 - 293 mOsm

### Anexo 3 – DPBS

#### Solução 1

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Concentração
NaCL	Sigma	S5886	58,44	136 mM
KCL	Sigma	P5405	74,55	2 mM
MgCL <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Sigma		95.21	1 mM
CaCL <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sigma	C7902	110.98	1 mM
Glicose	Sigma	G6152	180.16	6 mM
Piruvato de sódio	Sigma	P4562	110,04	0,2 mM
Penicilina	Sigma	P7794		65mg/L
Estreptomicina	Sigma	S1277		50mg/L

#### Solução 2

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Concentração
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sigma	S5011	141.96	8 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Sigma		120	1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma	P5655	139.09	1 mM

Osmolaridade: 280-290 mOsm

pH: 7.1- 7.2

Para fazer o DPBS é imprescindível que todos os sais da solução 1 estejam dissolvidos antes de colocar os sais da solução 2.