

DIANA DE MATIA LIPOSKI

**CRIOPRESERVAÇÃO EM PALHETAS DE FIBROBLASTOS
BOVINOS SUBMETIDOS Á PRESSÃO NEGATIVA**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Ciência Animal, na
Universidade do Estado de Santa
Catarina, como quesito para obtenção
do título de mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Alceu Mezzalira

LAGES, SC

2015

Liposki, Diana de Matia

Criopreservação em palhetas de fibroblastos
bovinos submetidos à pressão negativa / Diana de
Matia Liposki. - Lages, 2015.

38 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Alceu Mezzalira

Inclui bibliografia

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2015.

1. estresse controlado 2. criopreservação 3.
Células somáticas I. Liposki, Diana de Matia. II.
Mezzalira, Alceu. III. Universidade do Estado de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. IV. Título


DIANA DE MATIA LISPOKI

**CRIOPRESERVAÇÃO EM PALHETAS DE FIBROBLASTOS
BOVINOS SUBMETIDOS Á PRESSÃO NEGATIVA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Ciência Animal, na Universidade do Estado de Santa Catarina, como quesito para obtenção do título de mestre em Ciência Animal

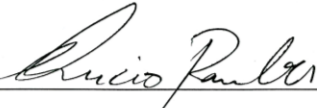
Banca Examinadora

Orientador: _____


Prof. Dr. Alceu Mezzalira, CAV-UDESC

Membros: _____


Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta, UFSC Curitibaanos


Prof. Dr. Lúcio Pereira Rauber, IFC Concórdia

Lages-SC, 28/08/2015

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus pelas bênçãos e oportunidades, aos meus pais Analice (*in memoriam*) e Francisco, meu irmão João Vitor, ao prof. Dr. Alceu Mezzalira, aos meus amigos e demais pessoas que acreditaram na minha capacidade para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai pela minha criação, por me apoiar nas minhas escolhas e me dar suporte, a minha mãe (*in memoriam*) que onde estiver sei que esta me cuidando e me guiando, por ter me ensinado a ser honesta e íntegra e sempre ajudar ao próximo. Ao meu irmão João Vitor por sempre estar ao meu lado.

Ao meu orientador prof. Dr. Alceu Mezzalira, por toda sua atenção, compreensão, confiança, pela oportunidade que sem a qual não estaria obtendo este título. Aos professores e amigos Carla Vogel, Fabricio Mozzaquatro, Maicon Pinto e Guenther Kluge, que de alguma forma me apoiaram, ajudaram e aconselharam. Aos demais docentes pelos ensinamentos. A UDESC, CAPES e FAPESC por proporcionarem a realização deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório, em especial Joana, Lain, Claudio e Larissa pelo apoio na realização deste trabalho. Aos demais colegas Andressa, Ramiro, Lucas, Luana, Guilherme, Camila Ceccato, Camila Martins, Renata e Lais pela amizade e ajuda a qualquer momento.

As minhas amigas que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui, em especial Ghiovana, Roberta, Joana, Ana Paula, Bruna, Cristina e Ediane. Aos demais colegas da universidade que em algum momento dispuseram de seu tempo para me ajudar.

E a todos aqueles que acreditaram em mim, rezaram por mim, e fizeram deste período de grande experiência pessoal e profissional, meu muito obrigada!

RESUMO

LIPOSKI, Diana de Matia. Criopreservação em palhetas de fibroblastos bovinos submetidos à pressão negativa. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – área de concentração: produção animal)-Universidade do Estado de Santa Catarina – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

A criopreservação de células somáticas vem se destacando não apenas como aliada na preservação de germoplasma, mas também na manutenção de genótipos utilizados para a indução de pluripotência, formação de linhagens e clonagem por transferência nuclear. O estudo dos efeitos do estresse controlado em gametas ou células somáticas tem demonstrado que, além de proporcionar maior sobrevivência em condições experimentais, outros parâmetros podem ser influenciados, como por exemplo, o padrão de crescimento em cultivo. Para isto, fibroblastos bovinos de primeira passagem, obtidos por procedimento padrão de explantação de cartilagem, foram distribuídos uniformemente em quatro grupos experimentais conforme descrito a seguir: Fibroblastos em cultivo foram submetidos por 4 minutos à pressão negativa de 200, 500 e 800 mbar, imediatamente (PN0h) ou 3 horas antes (PN3h) do congelamento, realizado em solução padrão (10% DMSO em D-MEM). Após a tripsinização, as células eram envasadas em uma concentração de 1×10^6 células/mL, em palhetas de 0,25 mL, num volume total de 200 μ L. As palhetas eram seladas e estabilizadas em geladeira (5-7 °C) por 30 minutos, expostas ao vapor de nitrogênio (4 cm acima da superfície) por 5 minutos, e então mergulhadas no mesmo. O descongelamento era realizado em banho-maria a 36 °C por 20 segundos. Fibroblastos não submetidos à pressão foram utilizados como controles congelado (CC) e fresco (FC). Foram avaliados a viabilidade pós-congelamento, e posteriormente o índice de replicação, baseado no tempo de duplicação da população (PDT) celular, com intervalos de 24h e duração de 8 dias. A cada avaliação, um poço de cada grupo era tripsinizado sendo o número de células viáveis determinado em câmara hemocitométrica, após a coloração com Azul de Trypan. O PDT foi

determinado utilizando-se o algoritmo disponível online (<http://www.doubling-time.com>): $TD = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$. Os dados foram submetidos à ANOVA e teste T Student, com 5% de significância. A sobrevivência celular média dos grupos controle (89,8%) e PN500 0h (88,1%) foram superiores aos outros grupos. O tempo médio de PDT de todas as células congeladas foi 33,2h; o tempo de PDT foi semelhante nos grupos fresco ($27,5 \pm 0,35$ h), controle congelado ($30,1 \pm 2,3$ h) e PN500 0h ($32,4 \pm 1,6$ h), o menor tempo foi observado no grupo PN800 0h (21,9 h). As palhetas plásticas se mostraram adequadas para o congelamento de fibroblastos bovinos, não sendo observados efeitos negativos da submissão à pressão negativa imediatamente antes do congelamento, sendo os valores de 200 e 500 mbar os que possibilitaram as melhores taxas de crescimento. Muito embora o emprego de pressão negativa não tenha aumentado a criotolerância de fibroblastos bovinos, determinou mudanças no comportamento destas células durante o cultivo pós-descongelamento. Novas avaliações devem ser realizadas para avaliar a qualidade das células submetidas à pressão negativa, no desenvolvimento de clones animais.

Palavras-chave: estresse controlado, criopreservação, células somáticas.

ABSTRACT

LIPOSKI, Diana Matia. Thesis (Master in Animal Science - area animal production) – Universidade do estado de Santa Catarina – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

The cryopreservation of somatic cells has been highlighted not only in the preservation of germplasm, but also in the maintenance of genotypes used for the induction of pluripotency, development of strains and cloning by nuclear transfer. The study of the effects of controlled stress in somatic cells or gametes have shown that, in addition to providing increased survival under experimental conditions, it may influence other parameters like the growth pattern in culture. Bovine fibroblasts obtained by standard procedure from a cartilage explant were evenly distributed in four experimental groups as described below: fibroblasts in culture were subjected for 4 minutes to negative pressure 200, 500 and 800 mbar, immediately (PN0h) or 3 hours before (PN3h) freezing, performed in a standard solution (10% DMSO in D-MEM). After trypsinization, the cells were loaded in 0.25 mL straws in a concentration of 1×10^6 cells / mL, and total volume of 200 μ L. The straws were sealed and stabilized in a refrigerator (5-7 °C) for 30 minutes, and then exposed to nitrogen vapor (4 cm above the surface) for 5 minutes when were dipped therein. Thawing was performed in a water bath at 36 °C for 20 seconds. Fibroblasts not subjected to pressure were used as frozen (CC) and fresh (FC) controls. There was evaluated the post-thaw viability and subsequently the cell replication index, based on the population doubling time (PDT) performed each 24 h intervals, during 8 days. At each evaluation, the cells of one well of each group were trypsinized and the number of viable cells determined by hemocytometric chamber after staining with Trypan Blue. PDT was determined using the algorithm available online (<http://www.doubling-time.com>): $TD = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$. Data were submitted to ANOVA and T student test, with 5% significance level. The average cell survival of control group (89.8%) and PN500 0h (88.1%) were higher than all other groups. The PDT average time of all frozen cells was 33.2 h. The

PDT time was similar in fresh (27.5 ± 0.35 h), frozen control (30.1 ± 2.3 h) and PN500 0h (32.4 ± 1.6 h) groups. The lowest PDT time was observed in the PN800 0h (21,9h) group. The freezing in plastic straws with 10% DMSO was adequate to cryopreserve bovine fibroblasts allowing high survival rates. It was not observed negative effects of submission to the negative pressure just before freezing, and the level of 200 and 500 mbar resulted in growth rates similar to the obtained with fresh fibroblasts. Although the negative pressure has not increased cryotolerance in bovine fibroblasts, it determined changes in the behavior of these cells during the post-thaw culture. New evaluations should be performed to assess cells subjected to negative pressure in the development of animal clones.

Keywords: stress controlled, cryopreservation, somatic cells

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1	
Taxa de sobrevivência de fibroblastos bovinos logo após o descongelamento (Controle), ou após submissão à diferentes intensidades (mbar) de pressão negativa (PN), aplicada imediatamente antes (tempo 0) ou 3 horas antes do congelamento	
	25
Tabela 2	
Valores de PDT (tempo de duplicação da população celular) e erro padrão (EP) de fibroblastos bovinos cultivados frescos ou no pós-congelamento, após submissão à diferentes intensidades de pressão negativa (PN), imediatamente antes (0h) ou 3 horas antes (3h) do congelamento	
	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva de crescimento de fibroblastos bovinos frescos ou após congelamento em palhetas plásticas	27
Gráfico 2	Curva de crescimento de fibroblastos bovinos frescos ou após submissão à pressão negativa de 200 mbar, imediatamente antes (0h) ou 3 horas (3h) antes do congelamento em palhetas plásticas.	28
Gráfico 3	Curva de crescimento de fibroblastos bovinos frescos ou após submissão à pressão negativa de 500 mbar, imediatamente antes (0h) ou 3 horas (3h) antes do congelamento em palhetas plásticas.	29
Gráfico 4	Curva de crescimento de fibroblastos bovinos frescos ou após submissão à pressão negativa de 800 mbar, imediatamente antes (0h) ou 3 horas (3h) antes do congelamento em palhetas plásticas.	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
3	HIPÓTESES	13
4	REVISÃO DE LITERATURA	14
5	METODOLOGIA	19
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	19
5.2	ESTABELECIMENTO DO CULTIVO DE CÉLULAS SOMÁTICAS	20
5.3	SUBMISSÃO A PRESSÃO NEGATIVA	20
5.4	CONGELAMENTO DAS CÉLULAS	21
5.5	DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS	21
5.6	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MEMBRANA	22
5.7	PROLIFERAÇÃO <i>IN VITRO</i> E ESTIMATIVA DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO DA POPULAÇÃO (PDT)	22
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6.1	SOBREVIVÊNCIA	22
6.2	CURVA DE CRESCIMENTO	25
6.3	PDT	31
7	CONCLUSÕES	32
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	32
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

Uma acelerada perda dos recursos genéticos animais vem ocorrendo em todo o mundo. Muitos países tem incentivado ações para salvar espécies ameaçadas, porém esta não é a opção mais viável para a maioria das nações menos desenvolvidas (GROENEVELD et al., 2008). Bancos genéticos baseados em células somáticas poderiam universalizar estas ações preservacionistas de maneira fácil e com custos bastante reduzidos (GROENEVELD et al., 2008). A metodologia permitiria transpor limitações produzidas por animais incapacitados de produzir gametas (castração, freemartinismo), ou em epizootias dramáticas que determinem o abate sanitário dos animais (MAUGER et al., 2006).

O uso extensivo das células somáticas tem determinado a necessidade de preservar estas células até o momento da sua utilização. A forma mais comumente empregada é o congelamento e a estocagem em botijões criogênicos contendo nitrogênio líquido. Em contraste com os gametas de mamíferos, a metodologia de congelamento de células somáticas mudou muito pouco nos últimos anos. A metodologia mais comumente empregada utiliza o chamado Mr. Frosty (Nalgene®), equipamento que emprega tubos criogênicos de 2,0 mL, mantidos em recipiente que é transferido para ultra freezer (-80 °C), possibilitando uma curva de aproximadamente 1,0 °C/minuto, sendo mantido por 24 horas, quando é armazenado em botijões criogênicos.

Alguns trabalhos tem buscado aumentar a eficiência e a praticidade dos protocolos de criopreservação de células somáticas. Têm sido avaliadas novas metodologias, tais como a vitrificação (BROCKBANK et al., 2010), variações na curva de congelamento e o tipo de crioprotetor (LEÓN-QUINTO et al., 2014; LEÓN-QUINTO et al., 2011; BROCKBANK et al., 2010), assim como a concentração de células (LEÓN-QUINTO et al., 2011; BROCKBANK et al., 2010). Distintos processamentos tais como microencapsulação (MURUA et al., 2009) e variados tipos de containers como as palhetas (MAUGER et al., 2006) também já foram testados. Desta forma, existem novos conceitos que devem ser incorporados na metodologia de criopreservação de células, sempre buscando incrementar a sobrevivência e competência dessas células após o descongelamento.

A submissão ao estresse controlado permite aumentar a criotolerância de diferentes estruturas, como gametas e embriões. Nos últimos anos a forma mais empregada de estresse controlado tem sido o emprego de alta pressão hidrostática. Todavia o uso de pressão hidrostática nos sistemas biológicos é multifacetada. Células eucarióticas submetidas à pressão de até 100 MPa produzem uma resposta reversível similar as *heat*

shock, sem afetar a viabilidade celular (FREY et al., 2008). Já células submetidas a maiores pressões entre 100 e 200 MPa apresentam comportamento distinto, com indução de apoptose.

Os equipamentos necessários para o emprego de pressão hidrostática não estão disponíveis no mercado. O laboratório de reprodução animal do CAV desenvolveu um equipamento que possibilita aplicar pressão negativa em diferentes estruturas. A pressão negativa se mostrou efetiva para o aumento da criotolerância de blastocistos bovinos PIV, efeito que foi dependente do tempo proporcionado entre a aplicação do estresse e a criopreservação (MEZZALIRA et al., 2010). Assim, é conveniente a realização de investigações que avaliem a metodologia de congelamento de células somáticas em palhetas, previamente submetidas a diferentes intensidades de pressão negativa.

2 OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GERAL: Buscar metodologias que aumentem a viabilidade de fibroblastos bovinos criopreservados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a viabilidade do congelamento em palhetas plásticas de fibroblastos bovinos.
- Avaliar a taxa de sobrevivência, viabilidade de membrana e o tempo de duplicação celular de fibroblastos bovinos criopreservados imediatamente após, ou 3 horas após a submissão a pressões negativas de 200, 500 ou 800 mbar.

3 HIPÓTESES:

- A metodologia de congelamento de fibroblastos em palhetas plásticas é efetiva na criopreservação de fibroblastos bovinos.
- A submissão prévia de fibroblastos à pressão negativa aumenta a sua viabilidade no pós descongelamento.

- A pressão negativa de 500 mbar é mais efetiva do que as pressões de 200 ou 800 mbar na criopreservação de fibroblastos.
- O período de espera de três horas desde a submissão à pressão negativa até o congelamento melhora a viabilidade de fibroblastos congelados.

4 REVISÃO DE LITERATURA

A preservação de células somáticas é importante para diferentes áreas como a Medicina, a Biomedicina e a Veterinária, já que pode ser empregada na terapia celular, engenharia de tecidos, medicina regenerativa e conservação de material genético, entre outros (LÉON-QUINTO et al., 2014), além do suporte para tecnologias como a clonagem animal e a transgenia. Existe hoje um crescente interesse na criação de bancos de células para ilimitados propósitos.

Os principais focos das pesquisas concentram-se em trabalhos com células-tronco embrionárias, células-tronco adultas (multipotentes) e células-tronco de pluripotência induzida (IPS- *induced pluripotent stem cells*), que possuem um grande potencial como fonte de terapia celular e medicina regenerativa, sendo que para suas aplicações clínicas exige-se grande número de células de qualidade controlada (THOMSON et al., 1998; TROUNSON E PERA, 2001). A engenharia de tecidos é uma técnica promissora para resolver o problema das deficiências de órgãos e tecidos, e para fornecer a próxima geração de implantes médicos (EAGLSTEIN E FALANGA, 1998); a substituição de enxertos de pele (aloenxertos) por tecidos gerados em cultivo *in vitro* a partir dessas células, pode ser uma alternativa para auxiliar a manter a biointeratividade após o implante, oferecendo assim uma consistente estrutura, e funções fisiológicas garantindo a segurança, eficácia, facilidade de utilização e de alimentação do tecido (WANG et al., 2007).

A conservação de células também é importante para estudos da cinética de células tumorais malignas, em particular sobre as taxas da produção de células em alguns tumores sólidos e leucemias (AHERNE e BUCK, 1971). Na área de transplantes e medicina regenerativa a criopreservação deve ser pesquisada para a preservação de células, tecidos ou fragmentos de órgãos, seja para a avaliação de tratamento de câncer (TAO E VALLE, 2008), para determinar o metabolismo de drogas (GRAAF et al., 2007; KUES E NIEMANN, 2004), para

conhecer doenças degenerativas e neurodegenerativas (LADEWIG et al., 2008; MAHMOOD et al., 2014; PIKANÇO-CASTRO et al., 2014), para transplantes e autotransplantes (KUES E NIEMANN, 2004; PAN et al., 2012; PEEK et al., 2015), reduzindo o risco de imunorejeição (GREGGAINS et al., 2014).

A preservação de células somáticas também se constitui num potente instrumento para a preservação de animais em risco de extinção. Com o nascimento da ovelha Dolly (WILMUT et al., 1997; WILMUT, 2014), houve a ampla aceitação que é possível clonar um animal adulto através da inserção de uma célula somática em um oócito enucleado. Desde então, a possibilidade de transferência nuclear de células somáticas tornou-se um dos marcos mais significativos da biologia do desenvolvimento e apresentou ao mundo novos desafios científicos, comerciais e éticos (VAJTA e GJERRIS, 2006). Sabe-se que uma acelerada perda dos recursos genéticos animais vem ocorrendo em todo o mundo. Muitos países tem incentivado ações para salvar espécies ameaçadas, porém esta não é a opção mais viável para a maioria dos países menos desenvolvidos (GROENEVELD et al., 2007), além do fato de inúmeras espécies ainda apresentarem variações na eficiência da clonagem. Com isso, as células somáticas preservadas constituem um importante instrumento para a formação de bancos genéticos, visando a preservação de raças em risco de extinção, de uma forma rápida e com custos favoráveis (GROENEVELD et al., 2007). A utilização dessas células como fonte de genoma, quando gametas e embriões não estão disponíveis, seja por estado de maturação sexual incerto em algumas espécies, ou por ser um animal de fenótipo e/ou genótipo valiosos, a fim de se obter um grande número de descendentes, sem que precise sacrificar este animal, deve ser fortemente considerada (MAUGER et al., 2006).

É possível inclusive a utilização de métodos alternativos, como a clonagem por transferência nuclear interespecies (Lanza et al., 2000). A técnica de transferência nuclear por células somáticas (TNCS) vem sendo estudada e comprovada por diversos pesquisadores e tem se mostrado eficaz tanto em mamíferos (CHACÓN et al., 2010; FAHRUDIN et al., 2001; LIU et al., 2014), como roedores (KUES E NIEMANN 2004), espécies selvagens (LOI et al., 2001), e em espécies ameaçadas de extinção (LANZA et al., 2000; WHITE et al., 1999).

Além das aplicações práticas, a transferência de um único núcleo para um oócito enucleado, fornece a oportunidade de ampliar o conhecimento da diferenciação celular e seu envolvimento com modificações genéticas irreversíveis (WILMUT et al., 1997), além dos demais mecanismos de diferenciação.

Em geral, a criação de um criobanco de genoma de modelos animais é necessária para preservar genótipos originais de vários problemas potenciais, incluindo: deriva genética; instabilidade genética; contaminação genética; e a perda desse material por causa de doenças ou desastres naturais (AGCA, 2012).

Alguns trabalhos tem buscado aumentar a eficiência e a praticidade dos protocolos de criopreservação de células somáticas. Tem sido avaliadas novas metodologias como a vitrificação (BROCKBANK et al., 2010), alterações na curva de congelamento e no tipo de crioprotetor (LEÓN-QUINTO et al., 2014; LÉON-QUINTO et al., 2011; BROCKBANK et al., 2010), diferentes concentrações de soluções crioprotetoras (LEÓN-QUINTO et al., 2011; BROCKBANK et al., 2010), além de formas alternativas de processamento, como microencapsulação (MURUA et al., 2009), diferentes tipos de containers, como as palhetas (MAUGER et al., 2006) que foram propostas para a criopreservação de células somáticas de peixe. Desta forma, existem novos conceitos que devem ser incorporados à metodologia de criopreservação de células.

Por outro lado, existe um entendimento crescente que além da busca por metodologias otimizadas de criopreservação, concomitantemente pode-se buscar alternativas que proporcionem maior criotolerância a estas estruturas. A ideia de aplicar estresse subletal para preparar células reprodutivas para alta sobrevivência em procedimentos de tecnologias de reprodução assistida (TRA) foi alavancada a partir de estudos anteriores de microbiologia de alimentos que reduziram a contaminação microbiológica preservando a qualidade do alimento (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011). Os microorganismos possuem mecanismos de adaptação a diferentes estresses subletais, que ainda não são bem entendidos (PRIBENSZKY et al., 2005). É aceito que em resposta a estresses térmicos, estas bactérias sintetizam as chamadas *cold-shock* proteínas. Sabe-se que não apenas o choque térmico, mas também outros estressores ambientais podem produzir os mesmos efeitos. Mudanças ambientais como calor ou frio, modificações do pH, hiper ou hipoosmose, presença de agentes oxidativos, irradiação, luz ou

nutrição inapropriada como falta de energia, todos servem como fatores de estresse e iniciam reações de estresse celular (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011). Um fator em comum desses impactos é o efeito gradual e tempo-dependente na célula, que afeta primeiro a membrana celular e progride gradualmente para o centro da célula (PRIBENSZKY E VAJTA, 2011).

Nos últimos anos uma das formas de estresse controlado mais utilizada para aumentar a viabilidade de células e gametas é a pressão hidrostática. Pressão é um parâmetro termodinâmico cujos efeitos nos sistemas biológicos estão sendo estudados em numerosas áreas da ciência, que envolvem desde proteínas, enzimas, microrganismos, até células e tecidos de mamíferos (AERTSEN et al., 2009). Assim, o emprego da pressão hidrostática na medicina e nas ciências da vida é multifacetada.

Diferente de outras formas de estresses ambientais, uma grande vantagem da pressão hidrostática é que esta é transferida instantaneamente as células (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011). A pressão hidrostática atua imediatamente e uniformemente em cada ponto da amostra, não sofrendo problemas de penetração ou efeitos gradientes, podendo ser aplicada com alta precisão, consistência e confiança, desde que se disponha de equipamento apropriado.

Embora o conhecimento sobre as respostas fisiológicas da pressão hidrostática ainda seja limitado, sabe-se que células eucarióticas submetidas à pressão de até 100 Mpa sofrem alterações morfológicas das suas organelas, que se traduzem por uma resposta reversível similar as proteínas heat shock, sem afetar a viabilidade celular (FREY et al., 2008). Sabe-se ainda que microrganismos submetidos a estresses subletais por pressão hidrostática podem produzir uma resistência cruzada contra outros desafios (AERTSEN et al., 2009). O tratamento com doses não letais de pressão hidrostática, osmótica, calor ou estresse oxidativo, resultam em aumento da sobrevivência, habilidade de fecundação e potencial de desenvolvimento embrionário após diferentes procedimentos *in vitro* ou *in vivo* (PRIBENSZKY et al., 2010). Resultados positivos também foram obtidos com o emprego de pressão hidrostática positiva, na qualidade de espermatozoides, na criotolerância de embriões de camundongo (BOCK et al., 2010), na qualidade de blastocistos ovinos (BOGLIOLO et al., 2010), assim como blastocistos

bovinos (PRIBENSZKY et al., 2005). Em função disto, estas técnicas passaram a ser empregadas em estruturas sabidamente mais sensíveis, tais como espermatozoides suínos e equinos (HUANG et al., 2009) e até mesmo oócitos suínos (DU et al., 2008; PRIBENSZKY et al., 2008).

A pressão hidrostática desencadeia a expressão de genes (PRIBENSZKI e VAJTA, 2011) de bloqueio do crescimento, assim como genes relacionados com o estresse oxidativo (BOCK et al., 2008). Com base nestes princípios, uma série de estudos foram conduzidos nos últimos anos buscando o entendimento dos efeitos da submissão à pressão hidrostática em gametas. Pribenszky et al., (2004) submetem blastocistos expandidos de camundongos à pressão de 90 Mpa durante 30, 60 ou 120 minutos. Os autores observaram uma sobrevivência de 50%, 0% e 0% para os três tempos de submissão, quando a decompressão foi instantânea. Já quando a pressão foi gradualmente reduzida em passos, foi observado um aumento da sobrevivência, que foi dependente do tempo em que os embriões permaneceram pressurizados. Num segundo estudo, Pribenszky et al., (2005) verificaram que quando os tratamentos excediam uma certa pressão ou tempo (90 Mpa por 30 minutos ou 30 Mpa por 3 horas) induziam mudanças morfológicas reversíveis. Os blastocistos expandidos colapsavam no interior da zona pelúcida e a blastocèle desaparecia. Porém após 4-5 horas de cultivo estes blastocistos reexpandiam e eclodiam de forma semelhante ao controle. No mesmo estudo, os autores observaram um aumento da sobrevivência após vitrificação (98 vs 46%), em embriões de camundongos previamente submetidos ao tratamento por compressão hidrostática. Verificaram ainda uma precocidade na reexpansão (4-6 horas vs 20 horas) nos grupos tratados em relação ao controle. O estágio de desenvolvimento embrionário também influencia os efeitos da submissão à pressão hidrostática. Pressões acima de 60 Mpa causam injúrias em membrana e blastômeros de embriões 2 células de camundongos (BOCK et al., 2010), enquanto pressões de até 80 Mpa são bem toleradas por blastocistos. A submissão à pressão hidrostática executada antes do congelamento proporcionou um aumento da motilidade de sêmen de suínos (PRIBENSZKY et al., 2005). Os autores observaram motilidade de 43.2 ± 5.24 e 42 ± 3.24 , respectivamente para 200 e 400 bar de pressão durante 80 minutos, enquanto o controle foi 23.2 ± 1.83 . Quando o período de submissão aumentou para 120 minutos, a motilidade pós descongelamento foi 51 ± 2.33 ; 55.5 ± 3.63 , para 200 e 400 bar, respectivamente. Já o emprego de pressão de 800 bar resultou em reduzida motilidade pós

descongelamento. Estes efeitos foram confirmados para pressões entre 200 e 400 bar em novos estudos (HUANG et al., 2009), que observaram ainda a influência da pressão hidrostática em 3 spots de proteínas existentes no sêmen suíno. Também com bovinos foi observado um incremento na qualidade de sêmen congelado após a submissão a pressão de 30 Mpa por 90 minutos (PRIBENSZKY et al., 2008). Os autores ainda observaram um significativo montante de touros com sêmen de baixa congelabilidade que tiveram uma melhora dos parâmetros, que permitiriam seu uso comercial.

Todavia, embora tenha se mostrado efetiva na melhora da criotolerância em diferentes estruturas, a pressão hidrostática exige equipamentos ainda não disponíveis no mercado, bem como demanda períodos relativamente longos para sua aplicação. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um equipamento artesanal (Nitrocooler) que possibilita a aplicação controlada de pressão negativa a diferentes estruturas. Em estudos prévios, a submissão à pressão negativa por curto período aumentou a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro* (dados não publicados), bem como prolongou a viabilidade de sêmen ovino, após o congelamento (CASALI et al., 2014).

Assim como acontece com a pressão hidrostática positiva que é transferida instantaneamente as células, atuando imediata e uniformemente em cada ponto da célula (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011), também a pressão negativa apresenta este comportamento, podendo ser aplicada com precisão e consistência. Não existem dados na literatura avaliando o efeito da pressão negativa na criotolerância de células somáticas, o que justifica a realização deste estudo.

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O cultivo de células já estabelecido foi dividido em grupos semelhantes e submetido à pressão negativa de 200, 500 ou 800 mbar, imediatamente antes do congelamento (tempo zero), ou com antecedência de três horas do congelamento. Foram utilizados dois grupos controle: o primeiro composto por células frescas e o segundo

por células congeladas, porém sem a submissão à pressão negativa. Os critérios de viabilidade empregados foram a taxa de sobrevivência, o PDT e as curvas de crescimento, após submissão aos tratamentos.

5.2 ESTABELECIMENTO DO CULTIVO DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A amostra de tecido foi retirada da orelha de uma bezerra natimorta, clone de uma vaca freemartin da raça Flamenga, do rebanho da EPAGRI-Lages/SC. Após desinfecção com álcool 70GL (30 seg), os explantes foram mantidos em meio de cultivo D-MEM (Sigma, D-1152) com 10% de soro fetal bovino (Gibco 12484), 0,5 mg de penicilina (Sigma, S-1277), 0,5 mg estreptomina (sigma, S-1277), 0,5 mg/mL amphotericina-B (Sigma, A-2411) por 1 min. Em seguida os explantes foram lavados por 30 seg, em D-PBS adicionado de 50 mg/mL de penicilina e 50 mg/mL de estreptomina, colocados em meio de cultivo por 1 min e novamente lavados em D-PBS contendo 50 mg/mL amphotericina-B. Os explantes foram então lavados duas vezes em meio de cultivo por 5 minutos. O tecido cartilaginoso foi então isolado dos demais tecidos, sendo fatiado em peças de 1x4x4 mm de altura, comprimento e largura, respectivamente e cultivados durante 10 dias a 38,5 °C, 5% CO₂ e umidade saturada. No décimo dia as peças foram removidas e as células proliferadas foram tripsinizadas e distribuídas em novas placas para multiplicação. Para a tripsinização das células o meio de cultivo foi removido, sendo adicionado uma solução com 0,25% de tripsina (Fisher, T360-500), 5 mM EDTA (sigma, E-6758) em D-PBS, com incubação por 3 minutos a 38,5 °C. A tripsina era inativada com a adição de idêntico volume de meio de cultivo acrescido de soro *(10% de soro fetal bovino). As células foram então centrifugadas por 5 minutos em 400 X g, sendo o sobrenadante removido e as células ressuspendidas em meio de cultivo e semeadas em uma concentração de 7.800 células/cm². Então foram cultivadas até atingirem uma confluência mínima de 90%.

5.3 SUBMISSÃO A PRESSÃO NEGATIVA

A submissão das células a pressão negativa se deu da seguinte forma: a própria placa de cultivo, com as células aderidas foi colocada dentro do container hermético do Nitrocooler, que foi fechado. O equipamento foi ligado e, através de uma válvula que era mantida semi aberta obtinha-se a pressão desejada (200, 500 ou 800 mbar), por 1 min. Após o equipamento era desligado, porém mantendo-se a válvula

fechada por mais 4 min. Em seguida a válvula era gradualmente aberta (5 mbar/seg) até atingir a pressão atmosférica.

5.4 CONGELAMENTO DAS CÉLULAS

As células foram divididas em dois grupos, células congeladas imediatamente após a submissão à pressão negativa, e células congeladas após 3h da submissão à pressão negativa, mantidas no meio de cultivo em estufa a 38 °C.

Após a tripsinização e ressuspensão, as células foram transferidas para o meio de congelamento (meio de cultivo com 10% de DMSO em uma concentração de 1×10^6 células/mL).

As células eram então aspiradas para palhetas plásticas de 0,25 mL com auxílio de uma seringa de insulina, adaptada à extremidade da palheta que continha o lacre de álcool polivinílico. As células eram mantidas na parte central da palheta, entre duas bolhas de ar, para prevenir possíveis contaminações. O volume total do meio de congelamento contendo as células era 200 μ L. As palhetas foram seladas por calor e transferidas para um refrigerador (5-7 °C) por 30 minutos. Após, as palhetas eram submetidas ao vapor de nitrogênio (4 cm acima do nitrogênio líquido) por 5 minutos e então mergulhadas no mesmo. As palhetas eram então armazenadas em botijões criogênicos a -196 °C até o momento do descongelamento.

5.5 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS

No descongelamento as palhetas foram retiradas do botijão criogênico e mergulhadas em banho-maria a 36 °C por 20 segundos. As palhetas eram então desinfetadas com álcool 70 GL e tinham as extremidades cortadas no local da bolha de ar. O meio contendo as células era então depositado em tubos de microcentrifuga, sendo centrifugados a 400 x g por 5 minutos para remoção do meio contendo o crioprotetor. O pellet resultante era então ressuspendido em 50 μ L meio de cultivo fresco. Uma amostra das células era usada para avaliar a viabilidade das membranas, sendo as restantes cultivadas para avaliar a sua posterior capacidade de multiplicação.

5.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MEMBRANA

Uma amostra de células de cada grupo (frescas, controle congelado e tratamentos) foi tripsinizada e diluída 1:1 com 0,4% de Azul de Trypan e a proporção de células coradas (lesionadas/mortas) e células não coradas (vivas) era avaliada por microscopia convencional, em câmara hemocitométrica. A contagem das células era realizada em quatro regiões da lâmina, de cada grupo experimental, e procedida a estimativa da taxa de sobrevivência.

5.7 PROLIFERAÇÃO *IN VITRO* E ESTIMATIVA DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO DA POPULAÇÃO (PDT)

A capacidade de proliferação das células do grupo controle e dos grupos congelados foi avaliada pela semeadura das células em uma concentração inicial de 1×10^5 células/mL do total de células vivas. Para examinar o tempo de duplicação da população celular (PDT) foi usado um algoritmo disponível online (<http://www.doubling-time.com>): $TD = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$, onde: N_0 é o número de células semeadas, N_t é o número de células contadas no final do cultivo e t é o tempo de cultivo em horas.

A cada 24 h, durante oito dias de cultivo, um poço de cada grupo era tripsinizado e a população de células contadas com auxílio de câmara Hemocitométrica, após a coloração com Azul de Trypan, sendo consideradas apenas as células não coradas, de acordo com (FRESHNEY, 2010).

Os valores das populações celulares foram comparadas a cada dia de cultivo entre os grupos bem como o PDT, utilizando ANOVA e teste-T com 5% de significância, entre os grupos experimentais e o grupo controle fresco.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SOBREVIVÊNCIA

Na avaliação realizada logo após o descongelamento, observou-se uma redução da sobrevivência das células submetidas ao congelamento, em relação às células frescas (Tabela 1). Todavia, foi observada uma elevada taxa de sobrevivência dos fibroblastos no pós-

descongelamento (89,8%), demonstrando a efetividade do método de congelamento em palhetas plásticas, utilizado neste estudo.

Comparando diferentes protocolos de congelamento em fibroblastos de Lince em palhetas plásticas, León-Quinto et al. (2014) demonstraram que células de origem fetal possuem menor sobrevivência ao congelamento (54%) do que células de adultos (89%). Buscando otimizar o processo, os autores adicionaram 0,2 M de sacarose ao meio de congelamento, aumentando a sobrevivência das células de origem fetal para 74%. A metodologia de criopreservação empregada em nosso estudo, com fibroblastos de origem fetal, proporcionou taxa similar de sobrevivência em relação às obtidas por León-Quinto et al. (2014), mesmo após a otimização de seu protocolo. Liu et al. (2012) após o congelamento de fibroblastos fetais de Yak, utilizando o equipamento convencional “Mr Frosty”, obtiveram 89,5% de sobrevivência, resultado muito semelhante ao obtido em nosso trabalho.

O processo empregado em nosso estudo é de fácil execução, não exigindo qualquer equipamento dispendioso, já que os fibroblastos foram envasados em palhetas de 0,25 mL e congelados com 10% de DMSO, após 30 minutos de refrigeração (5-7 °C) e submissão ao vapor de nitrogênio por 5 minutos. Além de sua efetividade, o reduzido volume das palhetas permite o aumento da capacidade de armazenamento em botijões criogênicos, facilitando a criação de bancos genéticos, com diferentes propósitos, principalmente a manutenção da variabilidade genética animal.

Já quando foram comparados apenas os grupos congelados entre si, as maiores taxas de sobrevivência foram observadas nos grupos Congelado controle (89,8%) e PN500 zero hora (88,1%), que diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) dos demais grupos (Tabela 1). Como não existem trabalhos empregando a pressão negativa no pré-congelamento de fibroblastos, as intensidades de pressões testadas neste estudo foram aquelas previamente avaliadas no congelamento de sêmen de carneiro (CASALI et al., 2014). Aertsen et al. (2009) relatam que a submissão de células a pressão hidrostática, além de um determinado patamar, aumentam progressivamente a rigidez de membranas, a desnaturação de proteínas, as quais podem inativar a célula ou iniciar um processo de morte celular. A aplicação de excessiva pressão hidrostática determina a morte celular por apoptose, quando a pressão esta situada na faixa de

200 Mpa, ou por necrose, quando a pressão é superior a 300 Mpa (FREY et al., 2004). As menores taxas de sobrevivência observadas com a maior pressão testada (800 mbar) sugere que a mesma foi excessiva e induziu uma resposta negativa das células.

Já está bem documentado o efeito positivo da aplicação de pressão hidrostática em diferentes estruturas, como sêmen de suínos (PRIBENSZKY et al., 2005), sêmen de bovinos (PRIBENSZKY et al., 2008), embriões de camundongo (BOCK *et al.*, 2010) e embriões ovinos (BOGLIOLO et al., 2010), bem como do efeito positivo da pressão negativa em embriões bovinos criopreservados (MEZZALIRA et al., 2010). Todavia, ao contrário do esperado, neste estudo não foi observado aumento da criotolerância dos fibroblastos bovinos submetidos à pressão negativa. Entretanto, como demonstrado por Aertsen et al. (2009) em microorganismos submetidos a pressão hidrostática, pode haver uma resistência cruzada contra outros desafios, que não a criotolerância. Desta forma, mesmo sem aumentar a criotolerância dos fibroblastos avaliados, o emprego da pressão negativa determinou mudanças no padrão de seu desenvolvimento, sendo necessário investigar o possível efeito destas alterações, assim como as possíveis causas dessas mudanças de padrão, principalmente quando estas células são empregadas na clonagem animal.

Nos tratamentos em que se utilizou a pressão negativa, observou-se um efeito significativo do momento da aplicação do tratamento. A submissão dos fibroblastos à pressão negativa 3 horas antes do congelamento, reduziu a sobrevivência das células no pós-descongelamento. Com a pressão de 200 mbar observou-se uma redução na viabilidade pós-descongelamento de 62,8% para 46,5%, enquanto com a pressão de 500 mbar a redução foi de 88,1% para 68,7%. Já com a pressão de 800 mbar, a redução da sobrevivência pós descongelamento foi de 40,1% para 23,7% (Tabela 01).

Em contraste com estes dados, a submissão à pressão negativa de embriões bovinos, 2 horas antes da vitrificação, aumentou a taxa de eclosão após o reaquecimento (MEZZALIRA et al., 2010). Já, quando a submissão foi realizada 40 minutos antes da vitrificação, não foi verificado qualquer efeito sobre a eclosão. Estes dados evidenciam um efeito distinto da pressão negativa aplicada sobre os fibroblastos, em relação aos embriões bovinos.

Tabela 1: Taxa de sobrevivência de fibroblastos bovinos logo após o descongelamento (Controle), ou após submissão à diferentes intensidades (mbar) de pressão negativa (PN), aplicada imediatamente antes (tempo 0) ou 3 horas antes do congelamento.

Grupos	Aplicação da PN horas antes do congelamento	Sobrevivência celular %
Frescas	-	100 ^a
Controle	-	89,8 ^b
PN200	0	62,8 ^d
PN200	3	46,5 ^e
PN500	0	88,1 ^b
PN500	3	68,7 ^c
PN800	0	40,1 ^f
PN800	3	23,7 ^g

Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste Qui-quadrado ($P < 0,05$). Fonte: Próprio auto

6.2 CURVA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

De forma semelhante ao observado por Liu et al., (2012), em todos os tratamentos, as curvas de proliferação apresentaram uma fase de latência em que as células não apresentaram uma proliferação significativa por um período de 48h para adaptação e possível recuperação de sua estrutura, seguida de um crescimento exponencial até atingirem sua fase estacionária (plateau) no 5º ou 6º dia de cultivo.

As curvas de proliferação das células frescas e das células do congelamento controle demonstraram um comportamento semelhante na maioria das avaliações (Gráfico 1). Foi observada uma redução no número médio das células congeladas em relação às células frescas no terceiro dia de cultivo, no momento em que se estabelece a fase log de desenvolvimento, demonstrando que mesmo nas células sobreviventes, o congelamento produziu sequelas que determinaram uma menor proliferação destas, no terceiro dia de cultivo (Gráfico 1). Embora não tenha ocorrido diferença estatística nos demais dias de cultivo, as células frescas atingiram o plateau no quinto dia de cultivo, um dia antes das células congeladas, que somente atingiram o plateau no sexto dia de cultivo.

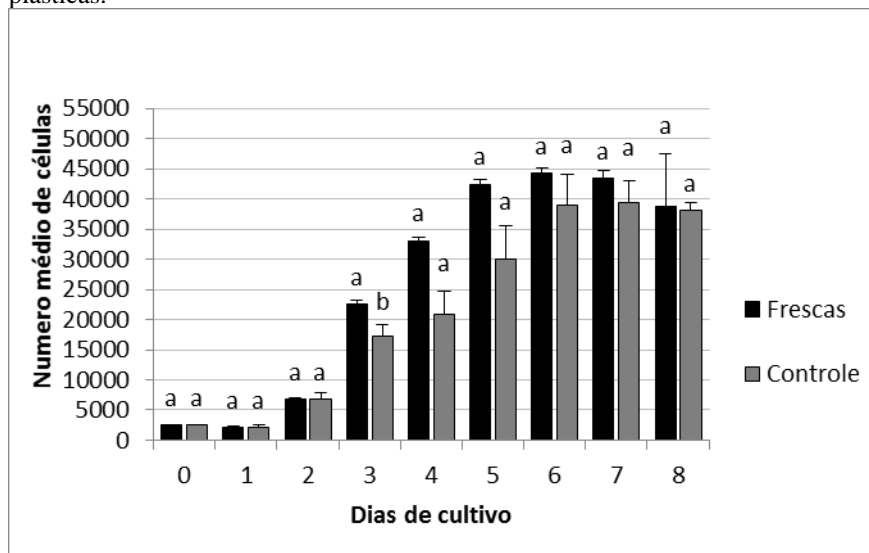
Já quando foram avaliadas as curvas de proliferação das células frescas e de células submetidas à pressão negativa de 200 mbar imediatamente antes (0h) ou 3h antes do congelamento, não foram observadas diferenças no número médio de células nos distintos dias de cultivo. O início da fase de plateau ocorreu no quinto dia de cultivo para os três grupos avaliados (Gráfico 2), em contraste com o grupo de células controle congeladas, que só atingiram a fase de plateau no sexto dia de cultivo (Gráfico 1). Desta forma, fica evidente o efeito positivo da submissão das células à pressão negativa de 200 mbar antes do congelamento.

Quando não houve intervalo para recuperação entre a submissão de pressão negativa de 200 mbar e o congelamento das células, este grupo (200 mbar- 0h) teve um plateau mais longo do que os demais grupos (grafico 2). Essa fase mais longa de plateau pode ser explicada pelo que se conhece a respeito dos checkpoints. Em condições desfavoráveis tais como a retirada do soro (que contém fatores de crescimento), os níveis de ciclina D caem rapidamente e as células não passam de um dos checkpoints, nesse caso, o R-point, que também é conhecido como ponto de restrição. Eventualmente, elas podem “escapar” do ciclo celular e entrar em um estado de quiescência chamado de G0 (OBACK E WELLS, 2002). Com a aquisição das condições favoráveis, as células podem entrar novamente ao estágio do ciclo G1 e continuar a proliferação. Quando não são obtidas as condições favoráveis para retornar ao ciclo celular, as células podem eventualmente morrer ou se diferenciar.

Já foi demonstrado por diversas vezes que o ciclo celular pode ser parado nos respectivos check points por inibidores do ciclo celular,

tais como a p53, a medida que algum dano de DNA seja detectado (FRESHNEY, 2010). Durante a curva de crescimento, foi observada também uma particularidade em comum para dois grupos experimentais, sendo um submetido à pressão negativa e outro não. Tanto o grupo experimental controle congelado (Gráfico 1), como o grupo pressão negativa 800-3h (Gráfico 4) tiveram menos células no início da fase log, em comparação aos demais grupos. Sabe-se que check points no início da fase S (síntese) assim como em G2 determinam a integridade do DNA e irão bloquear o ciclo temporariamente, até que haja o reparo necessário. Quando o reparo não for possível, as células irão entrar em apoptose.

Gráfico 1: Curva de crescimento de fibroblastos bovinos frescos ou após congelamento (controle) em palhetas plásticas.

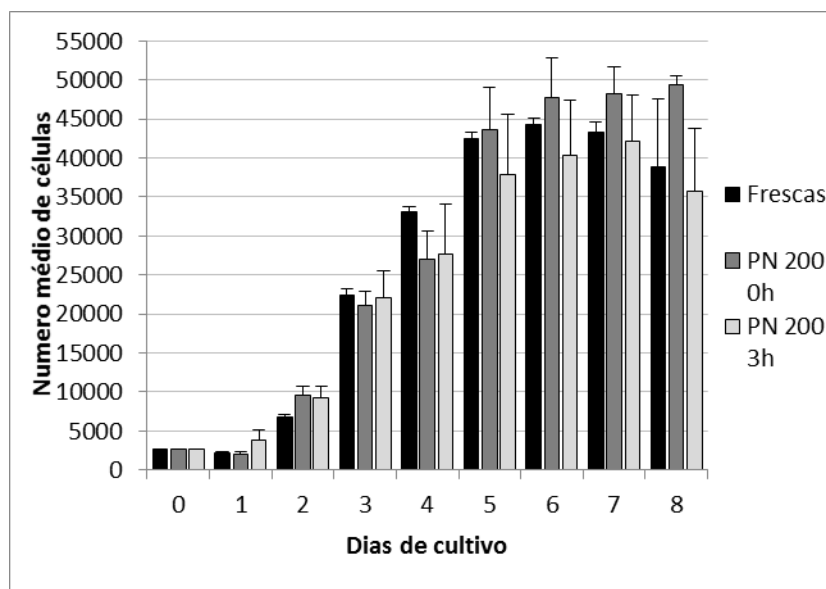


^{a,b} Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de T Student. Fonte: Próprio autor.

Também é importante ressaltar que, embora com menor sobrevivência no pós-descongelamento, a submissão à pressão negativa

de 200 mbar possibilitou às células sobreviventes viabilidade idêntica às células frescas. Como a concentração de células semeadas foi com base na sobrevivência, isto permitiu a obtenção de curvas de proliferação semelhantes entre os grupos PN 200 0h, PN 200 3h e grupo de células frescas.

Gráfico 2: Curva de proliferação de fibroblastos bovinos frescos ou após submissão à pressão negativa de 200 mbar, imediatamente antes (0h) ou 3 horas (3h) antes do congelamento em palhetas plásticas.

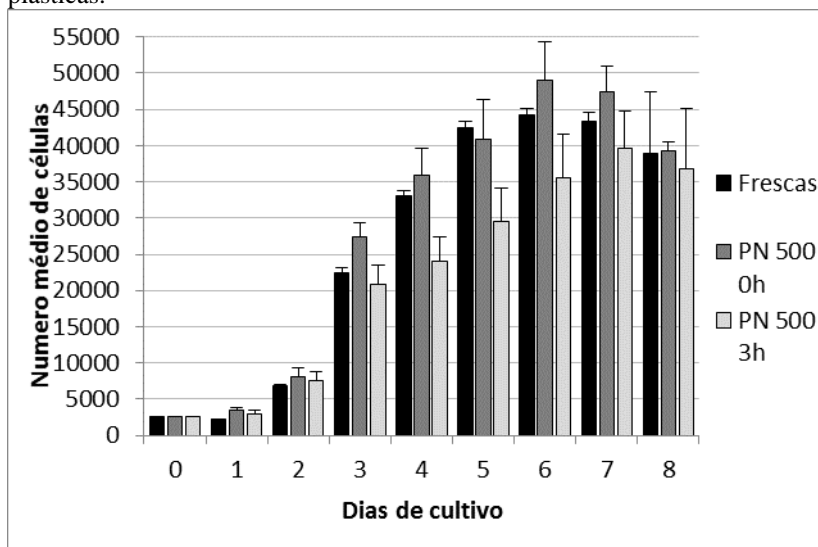


^{a,b} Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de T Student. Fonte: Próprio autor.

As curvas de proliferação proporcionadas pelas células frescas e aquelas previamente submetidas à pressão negativa de 500 mbar, tiveram um comportamento semelhante, não sendo observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$). As células dos grupos frescas e 500 mbar 0h atingiram a fase de plateau no mesmo momento, no quinto dia de cultivo. Já o grupo 500 mbar 3h atingiu a fase de plateau apenas no sexto dia (Gráfico 3).

Assim como verificado com o grupo PN 200 mbar, também foi observado um efeito positivo da submissão a PN 500 mbar, que possibilitou idêntico desenvolvimento dos fibroblastos frescos ou congelados, em todos os dias de cultivo avaliados. Embora não sendo estatisticamente diferente, o grupo PN 500 mbar foi o único a possibilitar concentrações médias de acima de 45.000 células nos dias 6 e 7 de cultivo (Gráfico 3). Todavia, as células submetidas à 500 mbar de PN 3 horas antes do congelamento, demoraram mais tempo para atingir a fase de plateau, evidenciando que provavelmente o tempo de execução das fases dos check points pode ter sido aumentado em função de algum mecanismo de quiescência (entrada em G0). Outra possível explicação pode ser simplesmente o fato de ter havido o desencadeamento de algum mecanismo de apoptose, pergunta essa que devera ser respondida através da investigação da ocorrência de apoptose entre os grupos controle e experimentais.

Gráfico 3: Curva de proliferação de fibroblastos bovinos frescos ou após submissão à pressão negativa de 500 mbar, imediatamente antes (0h) ou 3 horas (3h) antes do congelamento em palhetas plásticas.

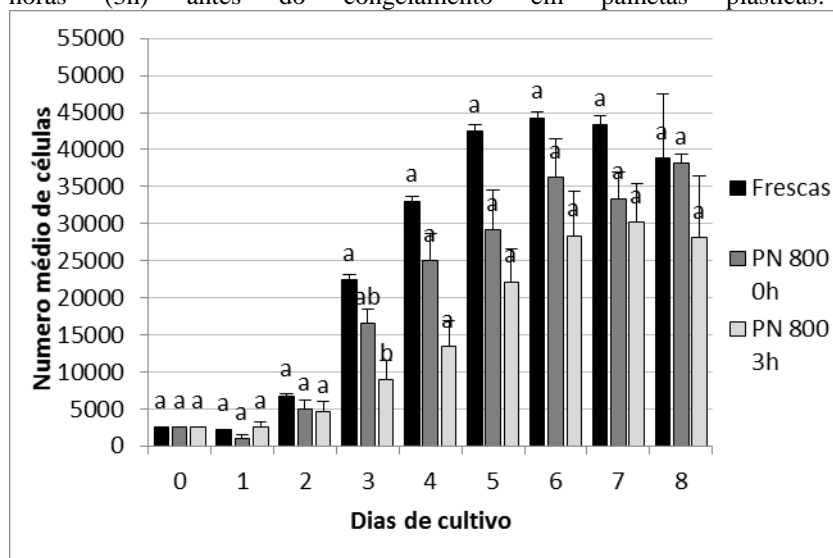


^{a,b} Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de T Student. Fonte: Próprio autor.

Na avaliação das curvas de crescimento entre células Frescas e células submetidas à pressão de 800 mbar 0h e 3h antes do congelamento, observou-se uma redução no número de células do grupo 800 mbar 3h, em relação aos demais grupos no terceiro dia de cultivo, que coincide com o início da fase log. As células frescas tiveram um comportamento semelhante em todos os experimentos (gráficos 1, 2 e 3) atingindo a fase de plateau no quinto dia de cultivo, um dia antes do que as células submetidas à pressão negativa de 800 mbar (6º dia).

Já ao atingirem a fase de plateau, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (Gráfico 4). Todavia, constatase que as células do grupo PN 800 não atingiram a concentração média de 40.000 células durante o cultivo, e que as células do grupo PN 800 3h tiveram uma concentração média máxima de 30.000 células, observadas no sétimo dia de cultivo.

Gráfico 4: Curva de proliferação de fibroblastos bovinos frescos ou após submissão à pressão negativa de 800 mbar, imediatamente antes (0h) ou 3 horas (3h) antes do congelamento em palhetas plásticas.



^{a,b} Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de T Student. Fonte: Próprio autor.

6.3 PDT

O tempo necessário para a duplicação da população celular (PDT) nas células frescas (27,5 horas) foi semelhante ao observado nas células congeladas (30,1 horas) (Tabela 2).

O tempo médio de PDT de todas as células congeladas foi 33,2 horas, assemelhando-se aos valores obtidos por Liu et al. (2012) com células fetais de Yak, congeladas pelo sistema Mr.Frosty; 30 h para fibroblastos de pulmão e 35 h para fibroblastos de orelha. Li et al. (2009) obtiveram PDT de 33,9 h com fibroblastos de orelha de cavalo.

Tabela 2: Valores de PDT (tempo de duplicação da população celular) e erro padrão (EP) de fibroblastos bovinos cultivados frescos ou no pós-congelamento, após submissão à diferentes intensidades de pressão negativa (PN), imediatamente antes (0h) ou 3 horas antes (3h) do congelamento.

Tratamentos	PDT / horas	EP
Frescas	27,5 ^{ab}	0,35
Congeladas	30,1 ^{abc}	2,3
PN 200 0h	40,4 ^c	12,6
PN 200 3h	37 ^{bc}	4,2
PN 500 0h	32,4 ^{abc}	1,6
PN 500 3h	34,8 ^{bc}	2,3
PN 800 0h	21,9 ^a	1,7
PN 800 3h	35,8 ^{bc}	3,4

^{a,b,c} Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey. Fonte: Próprio autor.

Já nos tratamentos submetidos à pressão negativa, o menor tempo de PDT foi observado no tratamento que aplicou a pressão negativa de 800 mbar, imediatamente antes do congelamento (21,9 h), que foi semelhante ao tratamento PN 500 0h (32,4 h), porém superior aos demais tratamentos que empregaram a pressão negativa (Tabela 2).

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o congelamento em palhetas plásticas de 0,25 mL, com a adição de 10% de DMSO como crioprotetor, é adequada para a criopreservação de fibroblastos bovinos, possibilitando elevadas taxas de sobrevivência no pós descongelamento. Ainda, a submissão de fibroblastos bovinos à pressão negativa de 200 ou 500 mbar, antes do congelamento, possibilita curvas de proliferação semelhantes às observadas com fibroblastos frescos.

A intensidade de 500 mbar de pressão negativa é a mais adequada para emprego antes do congelamento de fibroblastos bovinos, e o melhor momento para seu emprego é o tempo imediatamente antes do congelamento (0h).

A aplicação de pressão negativa como alternativa de estresse sub-letal em células somáticas pode alterar a sobrevivência após a criopreservação assim como influenciar a curva de crescimento, dependendo das condições de aplicação do tratamento e tempo de espera até o congelamento das mesmas.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Muito embora o emprego de pressão negativa não tenha aumentado a criotolerância de fibroblastos bovinos, determinou mudanças no comportamento destas células durante o cultivo pós-descongelamento. Estas alterações podem determinar modificações na reprogramação destas células, influenciando assim o desenvolvimento de embriões produzidos por clonagem com células somáticas. Novas avaliações devem ser realizadas para avaliar a qualidade das células submetidas à pressão negativa, no desenvolvimento de animais produzidos a partir da transferência nuclear de células somáticas previamente submetidas a pressão negativa com o equipamento Nitrocooler. Outra frente de pesquisa deveria investigar a utilização do Nitrocooler no tratamento de células obtidas com a finalidade de estabelecer linhagens, assim como cultivos iPS, investigações em oncogenese e para o tratamento com células-tronco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTSEN, A.; et al. Biotechnology under high pressure: applications and implications. **Trends in Biotechnology** , v.27, p.434-441, 2009.

AGCA, Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals - Special Collection of Papers in Honor of Dr. John K. Critser. **Theriogenology**, v. 78, p.1653-1665, 2012.

AHERNE, W.; BUCK, P. The potential cell population doubling time in Neuroblastoma and nephroblastoma. **Department of Pathology, Royal Victoria Infirmary, Newcastle upon Tyne**, p. 691-696, 1971.

BOCK, I.; et al. Stress tolerance and transcriptional response in Mouse embryos treated with high hydrostatic Pressure to enhance cryotolerance. **CryoLetters**, v. 31, p. 401-412, 2010.

BOGLIOLO, L.; et al. High hydrostatic pressure treatment improves the quality of in vitro-produced ovine blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 809–817, 2011.

BROCKBANK, K. G.M.; CHEN, Z. Z.; SONG, Y. C. Vitrification of porcine articular cartilage. **Cryobiology**, v. 60, p. 217–221, 2010.

CASALI, R.; et al. Negative Pressure in the Pre-freezing of Ram Semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42: 1240, 2014.

CHACÓN, L.; et al. Effect of cryopreservation and in vitro culture of bovine fibroblasts on histone acetylation levels and in vitro development of hand-made cloned embryos. **Cambridge University Press** , p. 1- 10, doi:10.1017/S0967199410000316, 2010.

DU, Y.; et al. High Hydrostatic Pressure Treatment of Porcine

Oocytes before Handmade Cloning Improves Developmental Competence and Cryosurvival. **Cloning and Stem Cells**, v. 10, p. 325-330, 2008.

EAGLSTEIN, W. H.; FALANGA, V. Tissue engineering for skin: An update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, p. 1007-1010, 1998.

FAHRUDIN, M.; OTOI, T.; SUZUKI, T. The use of cryopreserved fetal tissues derived somatic cells as donor karyoplast in bovine somatic nuclear transfer. **Arch. Tierz., Dummerstorf**, v. 44, 2001.

FRESHNEY, R. I. Biology of Cultured Cells. In: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6 ed., pp. 11-23. Copyright © John Wiley & Sons, Inc. 2010.

FRESHNEY, R. I. Quantitation. In: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6 ed., pp. 335-364. Copyright © John Wiley & Sons, Inc. 2010.

FREY, B.; et al. Cells under pressure – Treatment of Eukaryotic Cells with High Hydrostatic Pressure, from Physiologic Aspects to Pressure Induced Cell Death. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 2329-2336, 2008.

GRAAF, I.A.M.; et al. Cryopreservation of rat precision-cut liver and kidney slices by rapid freezing and vitrification. **Cryobiology**, v. 54, p. 1–12, 2007

GREGGAINS, G.D.; et al. Therapeutic potential of somatic cell nuclear transfer for degenerative disease caused by mitochondrial DNA mutations. *Scientific Reports*, v. 4, doi: 10.1038/srep03844, 2014.

GROENEVELD, E.; et al. A protocol for the cryoconservation of breeds by low-cost emergency cell banks – a pilot study. **Animal**, v.2:1, p. 1-8, 2008.

HUANG, S.; et al. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing–thawing. **Animal Reproduction Science**, v.112, p. 136–149, 2009.

KUES, W.A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, p.286-294, 2004.

LADEWIG, J.; et al. Lineage Selection of Functional and Cryopreservable Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. **Stemcells**, v. 26, p.1705–1712, 2008.

LANZA, R.P.; et al. Cloning of an Endangered Species (*Bos gaurus*) Using Interspecies Nuclear Transfer. **Cloning**, v.2, p.79-90, 2000.

LEÓN-QUINTO, T.; et al. 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**, v. 62, p. 145–151, 2011.

LEÓN-QUINTO, T.; et al. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v. 68, p. 227–233, 2014.

LI, L.F.; et al. Establishment and characterization of a fibroblast cell line from the Mongolian horse. **In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal**, v.45, p.311–316, 2009.

LIU, B.; et al. Establishment and characterization of two fetal fibroblast cell lines from the yak. **In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal**, v.48. p. 619–624, 2012.

LIU, C.; et al. Establishment and genetic characteristics analysis of in vitro culture a fibroblast cell line derived from Wuzhishan miniature pig. **Cryobiology**, v. 68, p.281–287, 2014.

- LOI, P.; et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. **Nature Biotechnology**, v.19, p. 962-964, 2011.
- 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 144, p. 29–37, 2006.
- MAHMOOD, S.C.; et al. Cryopreservation of whole adipose tissue for future use in regenerative medicine. **Journal of Surgical Research**, v.187, p.24-35, 2014
- MEZZALIRA, J.C.; et al. Effects of nitrocooler negative pressure and recovery interval on cryotolerance of bovine *in vitro*- produced embryos. **Annual Conference of the International Embryo Transfer Society**, Cordoba AR. Reproduction, Fertility and Development. Collingwood: CSIRO Publishing, v. 22, p. 210-210, 2010.
- MURUA, A.; et al. Cryopreservation based on freezing protocols for the long-term storage of microencapsulated myoblasts. **Biomaterials**, v. 30, p.3495–3501, 2009.
- OBACK, B; WELLS, D; Donor cells for nuclear cloning: Many are called, but few are chosen. **Cloning and Stem Cells**, v.4, n.2, 2002.
- PAN, X.; et al. Establishment and characterization of immortalized human hepatocyte cell line for applications in bioartificial livers. **Original Research Paper**, v. 34, p. 2183–2190, 2012.
- PEEK, R.; et al. A preliminary study on a new model system to evaluate tumour-detection and tumour-purging protocols in ovarian cortex tissue intended for fertility preservation. **Human Reproduction**, v.30, p. 870–876, 2015.
- PICANÇO-CASTO, V.; et al. Can Pluripotent Stem Cells Be Used in Cell-Based Therapy? **Cellular Reprogramming**, v16, p.98-107, 2014.

PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; CSEH, S.; SOLT, L. Survival of mouse blastocysts after low-temperature preservation under high pressure. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 52, p. 479–487, 2004.

PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; HORVATH, A.; HARNOS, A.; SZENCI, O. Hydrostatic pressure induced increase in postthaw motility of frozen boar . **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 162- 163, 2005.

PRIBENSZKY, C.; et al. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Animal Reproduction Science** , v.87, p.143–150, 2005.

PRIBENSZKY, C.; et al. Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 200–207, 2008.

PRIBENSZKY, C. et al. Stress for Stress Tolerance? A Fundamentally New Approach in Mammalian Embryology. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 690–697, 2010.

PRIBENSZKY, C.; VAJTA, G. Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes' and embryos' performance?. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 48–55, 2011.

THOMSON, J. A.; et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, p. 1145-1147,1998.

TROUNSON, A.; PERA, M. Human embryonic stem cells. **Fertility and sterility**, v. 76, p.600-601, 2001.

TAO, T.; VALLE A. D. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. **Assisted Reproduction**, v.25, p. 287-296, 2008.

VAJTA, G.; GJERRIS, M. Science and technology of farm animal cloning: State of the art. **Animal Reproduction Science**, v.92, p. 211–230. 2006.

WANG, X.; et al. Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me2SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. **Cryobiology**, v. 55, p.60–65, 2007.

WHITE, K.; et al. 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,p. 47-54, 1999.

WILMUT I.; et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v.385, p. 810-813, 1997.

WILMUT I. From germ cell preservation to regenerative medicine: an exciting research career in biotechnology. **The Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, p.1-21, 2014.