

# DETERMINAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS MDBK APÓS CONGELAMENTO COM DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) OU GLICEROL.

KUNERT FILHO, H.C.<sup>1,2\*</sup>; .HOLZ, C.L.<sup>2</sup>; .DEZEN, D.<sup>2</sup>; TEIXEIRA, T.F.<sup>2</sup>;  
CIBULSKI, S.P.<sup>2</sup>; ROEHE, P.M.<sup>2,3</sup>

**Resumo:** O processo de criopreservação é essencial para a manutenção de cultivos celulares, uma vez que a linhagem celular é congelada, a mesma pode ser mantida em nitrogênio líquido por tempo indeterminado. Buscando melhorar a eficiência no processo de congelamento de linhagens celulares, várias substâncias têm sido avaliadas como crioprotetoras. Neste trabalho, foram comparados dois crioprotetores, dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol tamponado (pH 7.0), nas concentrações de 5%, 7,5%, 10% e 12,5%. Para os ensaios da taxa de recuperação de células viáveis e de porcentagem de viabilidade após o congelamento foram utilizadas células da linhagem "Madin Darbin bovine kidney" (MDBK). A taxa de recuperação das células viáveis foi estimada por contagem das mesmas através de coloração com azul de Trypan em câmara de Neubauer. A porcentagem de células viáveis foi avaliada 24 horas após o descongelamento, através do ensaio de redução do MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide). Verificou-se que apesar das taxas de recuperação de células viáveis terem sido similares entre os grupos tratados, a porcentagem de viabilidade celular foi significativamente maior para células congeladas com 10% DMSO. Testes com outras linhagens celulares devem ser feitos pois o seu genótipo tem influência quanto a tolerância e tipo de crioprotetor utilizado bem como em sua concentração.

## INTRODUÇÃO

O processo de criopreservação é central para a manutenção de cultivos celulares em longo prazo. Todavia, durante o congelamento os cristais de gelo intracelulares formados causam ruptura das membranas celulares e prejudicam a viabilidade celular ao descongelamento (PICKETT, 1986).

---

<sup>1</sup> Acadêmico de Medicina Veterinária – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS.

<sup>2</sup> Equipe de Virologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS. 92990-000

<sup>3</sup> Laboratório de Virologia, DM-ICBS/ UFRGS, Porto Alegre, RS, Av Sarmiento Leite 500 sala 208, CEP 90050-170.

Para minimizar estes danos são adicionados crioprotetores ao meio de congelamento. Durante o congelamento lento, cristais de gelo são formados no meio extracelular, aumentando a concentração do crioprotetor. Em uma resposta osmótica o diluente do meio intracelular passa para o meio extracelular, fazendo com que a célula diminua o tamanho e diminua a formação de cristais de gelo intracelulares (MAZUR, 1986)

Um crioprotetor bastante conhecido é o dimetilsulfóxido (DMSO), composto muito usado como solvente apolar em laboratórios e na indústria. É produzido pela oxidação do dimetil sulfeto, que por sua vez é produzido por alguns processos biológicos. Acredita-se que o DMSO diminua o ponto de congelamento, o que leva a formação de gelo somente em baixas temperaturas, -40°C a -50°C (MASSUMOTO et al., 1997).

Outra substância freqüentemente utilizada como crioprotetor é o glicerol, ou Propano-1,2,3-triol (IUPAC, 1993). O glicerol é um composto orgânico, líquido à temperatura ambiente (25 °C), higroscópico, inodoro e viscoso. É um crioprotetor intracelular com baixa toxicidade que evita danos as células causados pelo processo de criopreservação e descongelamento, que são a desidratação (alterações osmóticas) e a formação dos cristais de gelo intracelulares mantendo a estabilidade da mesma e vitalidade durante o processo de criopreservação (BRIDSSON et al., 2001).

Neste trabalho foram avaliadas a taxa de recuperação de células viáveis e porcentagem de viabilidade celular, após o descongelamento de células MDBK (ATCC CCL-22) tratadas com DMSO ou glicerol em diferentes concentrações

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Células**

Garrafas de 25 cm<sup>2</sup> com monocamadas de células MDBK (ATCC-CCL22), na 38ª passagem foram tripsinizadas. Para isto, o meio de cultivo foi removido e a monocamada lavada duas vezes com PBS. Em seguida foi adicionado 1mL de tripsina verseno e as garrafas foram incubadas por 5 minutos a 37°C. Após a individualização das células, foram adicionados 9 mL de meio de cultivo. A suspensão celular foi centrifugada a 200 g por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o pellet celular ressuspendido em meio de cultivo (meio essencial mínimo acrescido de 10% soro fetal bovino).

### **Congelamento de células**

As células tripsinizadas foram coradas com azul de Trypan e contadas em câmara de Neubauer, como descrito por Butler e Dawson (1992). A concentração celular foi ajustada com E-MEM com 10% de SFB, de modo que cada criotubo contivesse 1x10<sup>6</sup> células. Em seguida, foi adicionado 5%, 7,5%, 10% ou 12,5% do crioprotetor, glicerol tamponado ( pH 7.0) ou DMSO, de

modo que o volume final para cada criotubo fosse de 1mL. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

Os criotubos contendo as células ressuspendidas na solução de congelamento foram embalados com uma camada de algodão e papel alumínio e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Após foram acondicionados em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) onde permaneceram até o momento do descongelamento.

### **Taxa de recuperação de células viáveis**

Os criotubos foram retirados do nitrogênio, descongelados em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  e ressuspendidos em 9mL de E-MEM com 10% de SFB. A concentração celular foi determinada e a porcentagem de recuperação foi calculada através da estimativa do número total de células recuperadas em relação ao número de total de células congeladas (BUTLER & DAWSON, 1992).

### **Ensaio de redução do MTT**

Para determinação da porcentagem da viabilidade celular utilizou-se ensaio de MTT. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular de cada tratamento. Cada criotubo foi semeado em triplicata perfazendo um total de 9 poços por tratamento. Como controle foram utilizadas células MDBK tripsinizadas e resuspendidas em E-MEM com 10% de SFB em uma concentração de  $10^5$  células/mL. A placa foi incubada 24<sub>h</sub>s em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , com atmosfera a 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida o sobrenadante foi removido e adicionado 20 $\mu\text{L}$  de MTT, a placa foi incubada por 4 horas, protegida da luz, a  $37^{\circ}\text{C}$ , com atmosfera a 5% de  $\text{CO}_2$ . Retirou-se o MTT, adicionou-se 50 $\mu\text{L}$  de etanol por poço e incubou-se por 10 minutos por  $37^{\circ}\text{C}$ , em seguida retirou-se o sobrenadante e foi feita a leitura em 2 comprimentos de onda, 570 nm e 650 nm. A porcentagem da viabilidade celular (PVC) foi determinada pela seguinte fórmula;  $\text{PVC} = \frac{\text{média da diferença (570-650) dos poços tratados} \times 100}{\text{média da diferença (570-650) dos poços do controle}}$ .

## **RESULTADOS**

A média da taxa de recuperação de células viáveis (Figura1) após o descongelamento foi de 63,3%, 83,3%, 86,6% e 96,6% para os grupos congelados com DMSO 5%, 7,5%, 10% e 12,5% respectivamente; e de 73,3%, 86,6%, 96,6% e 90% para os grupos congelados com Glicerol 5%, 7,5%, 10% e 12,5% pelo método de coloração azul de Trypan.

No ensaio de redução do MTT (Figura 1) a viabilidade celular em relação ao grupo controle (100%) foi de 37,03%, 62,80%, 70,30%, 63,94% para os grupos congelados com DMSO 5%, 7,5%, 10% e 12,5% e com Glicerol 5%, 7,5%, 10% e 12,5% foi de 7,01%, 8,64%, 7,34% e 6,36% respectivamente.

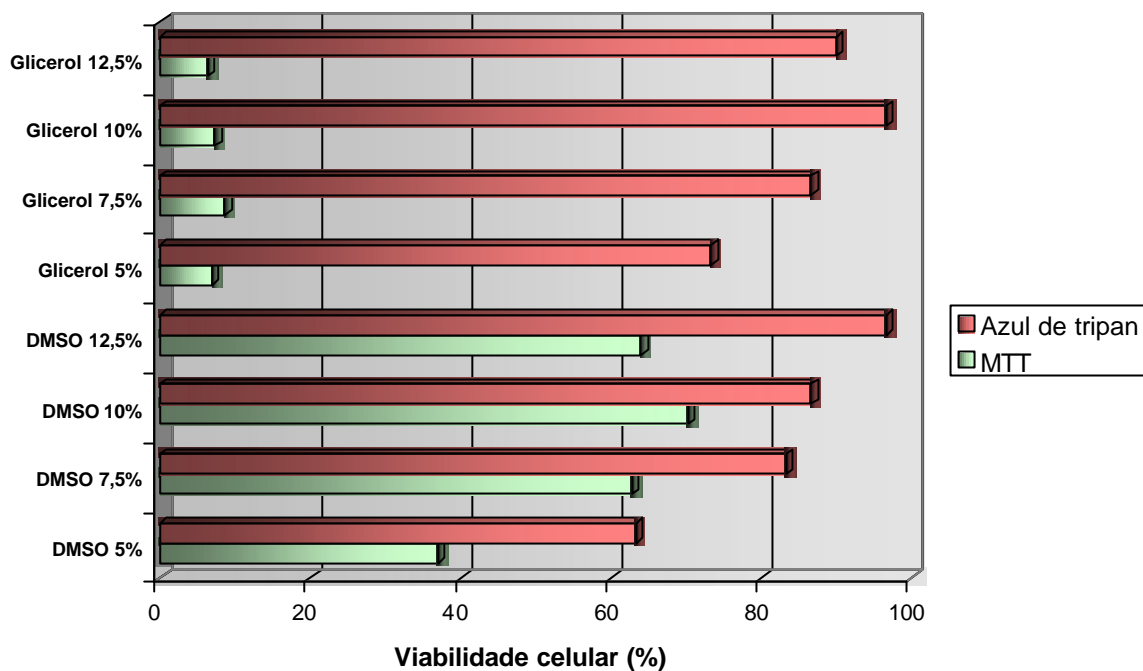


Figura 1. Porcentagem de viabilidade celular após o descongelamento. Resultados obtidos através de coloração de azul de Trypan e redução do MTT.

## DISCUSSÃO

A determinação da taxa de recuperação celular através da coloração de azul de Trypan tem a vantagem de produzir um resultado rápido. Este método é baseado na habilidade de células eliminarem o corante através da membrana. Células mortas são permeáveis e permanecerão com o corante. Apesar do teste informar a integridade da membrana celular ele não necessariamente indica como a célula está metabolicamente. Já no ensaio de MTT as células viáveis reduzem o composto a azul de formazan. A redução ocorre se as células possuírem um nível significativo de metabolismo oxidativo (BUTLER & DAWSON,1992). Quando comparamos o resultado da taxa de recuperação de células viáveis com os resultados obtidos no ensaio com MTT, é possível verificar que a proporção de células viáveis nos grupos tratados (DMSO e glicerol) em relação ao grupo controle diminui. Isto se dá provavelmente porque o congelamento celular pode induzir apoptose, de forma que apesar das células estarem viáveis logo após o descongelamento, as mesmas acabam sofrendo morte celular programada (REUBINOFF et al., 1981).

A taxa de recuperação de células viáveis foi maior (96,6%) nos grupos tratados com glicerol 10% e DMSO 12,5%. Porém, no ensaio de redução de MTT, o DMSO demonstrou-se mais apropriado para o congelamento celular. WATSON et al. (1981) ao utilizar glicerol como crioprotetor, explica que esse crioprotetor não quela o cálcio no meio extracelular, aumentando assim seu

influxo para o meio intracelular no processo de resfriamento. Isso ocorre devido a concentração de cálcio intracelular que vai aumentando na proporção que cai a temperatura e cujo acúmulo pode tornar-se irreversível, dificultando ou até mesmo impedindo a taxa de recuperação celular após descongelamento (ROBERTSON & WATSON 1986).

Ressalta-se ainda a necessidade de testar outras linhagens celulares, uma vez que o genótipo pode influenciar no grau de tolerância ao tipo e a concentração do crioprotetor utilizado. Outro fator a ser levado em consideração é o efeito do crioprotetor nas funções celulares; sabe-se por exemplo que células tronco embrionárias humanas perdem sua pluripotência quando congeladas com DMSO 10% (KATKOV et al., 2006). Além disso, é necessário que cada laboratório padronize seus próprios protocolos de congelamento, uma vez que a qualidade de meios, reagentes e aparelhos, podem variar influenciando na eficiência do processo de criopreservação.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRIDSSON, D.; VOHL, M.C.; ST-PIERRE, J.; HUDSON, T.J.; GAUDET, D.; (2001) Glycerol a neglected variable in metabolic process? **BioEssays** vol. 23, p. 534-542,

BUTLER, M.; DAWSON, M. (1992). **Cell culture labfax**, 1st edition . Academic Press, 247p.

REUBINOFF, B.E.; PERA, M.F.; VAJTA, G., TROUNSON A.O. (2001) Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrication method, **Hum. Reprod.**, vol. 16, p. 2187–2194.

KATKOV, I.I, KIM, M.S.; YOAV, R.B.; MERCOLA, S.A.M; LORING, J.F.; TERSKIKH, A.V.; SNYDER, E.Y. LEVINE, F. (2006) Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. **Cryobiology**, vol. 53, p. 194–205.

MAZUR, P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. **AJP - Cell Physiology**, vol. 247, n. 3, p. 125-142

MASSUMOTO, C.M., MIZUKAMI, S., CAMPOS, M.F., SILVA, L.A.G., MENDRONE JR., A., SAKASHITA, A., ZAMBON, E., OSTRONOFF, M., MACEDO, M.C. A., MEDEIROS, R., DORLHIAC, P., CHAMONE, D., DULLEY, F. (1997). Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, vol. 43, n.2, p. 93-98.

PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation. In: TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS: SHORT COURSE PROCEEDINGS, 1986, Fort Collins. **Proceedings...** Fort Collins: Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 1986, p.4

ROBERTSON, L.; WATSON, P.F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *Journal Reproduction Fertility*, v. 77, n. 1, p. 177-185,1986.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.; CLARKE, A. (Eds.) *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press, 1981. p. 189.