

Influência de um protocolo de criopreservação no rendimento *in vitro* de células-tronco derivadas do tecido adiposo

Effect of a cryopreservation protocol on the in vitro yield of adipose-derived stem cells

FERNANDA GINANI¹

DIEGO MOURA SOARES¹

CARLOS AUGUSTO GALVÃO
BARBOZA²

RESUMO

Introdução: O tecido adiposo obtido por lipoaspiração pode ser uma fonte acessível de células-tronco, para posterior aplicação clínica na regeneração tecidual. O processo de criopreservação mantém essas células vivas por longos períodos, sem prejuízo a suas funções. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de um protocolo de criopreservação na proliferação das células-tronco derivadas do tecido adiposo. **Método:** Fragmentos de tecido adiposo de camundongos foram submetidos a digestão enzimática e as células foram cultivadas em meio α -MEM (do inglês *Minimum Essential Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantidas a 37°C em 5% de dióxido de carbono. No primeiro subcultivo, uma alíquota de 1×10^6 células foi criopreservada em SFB com 10% de dimetilsulfóxido por 30 dias, e outro grupo permaneceu em cultura. No terceiro subcultivo, as células dos dois grupos (não-criopreservadas e criopreservadas) foram plaqueadas e a viabilidade celular e as curvas de crescimento foram estabelecidas a partir de contagem em hemocitômetro e pelo ensaio de MTT, nos intervalos de 24 horas, 48 horas e 72 horas. A avaliação da morfologia nuclear foi realizada pela marcação por DAPI. Os dados foram analisados estatisticamente, com nível de significância de 5%.

Resultados: Observou-se padrão de crescimento celular ascendente em ambos os grupos, sem diferença significativa ao longo do experimento ($P > 0,05$). Não houve alteração considerável da viabilidade celular e danos nucleares também não foram observados nos grupos estudados. **Conclusões:** O protocolo de criopreservação avaliado mostrou-se eficaz para manter a integridade das células-tronco de tecido adiposo, permitindo seu armazenamento para uso posterior.

Descritores: Tecido adiposo. Células-tronco. Criopreservação. Proliferação de células.

ABSTRACT

Background: Adipose tissue obtained by liposuction may be an accessible source of stem cells for future clinical application in tissue regeneration. Cryopreservation maintains stem cells in a live state for long periods of time, without impairing their function. The aim of this study was to assess the effect of a cryopreservation protocol on the proliferation of adipose-derived stem cells. **Methods:** Fragments of mouse adipose tissue were subjected to enzymatic digestion in order to isolate cells that were then cultured in minimum essential medium (α -MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were maintained at 37°C in 5% carbon dioxide (CO₂). At the first passage, an aliquot of 1×10^6 cells was cryopreserved in FBS with 10% dimethylsulfoxide (DMSO) for 30 days, whereas the remaining cells were seeded and maintained in culture. When these cells reached the third passage, the 2 groups of cells (cryopreserved and non-cryopreserved) were seeded for

Trabalho realizado na
Universidade Federal do
Rio Grande do Norte (UFRN),
Natal, RN, Brasil.

Artigo submetido pelo SGP
(Sistema de Gestão de
Publicações) da RBCP.

Artigo recebido: 12/6/2012
Artigo aceito: 7/8/2012

Supporte Financeiro: CAPES

1. Especialista em Ciências Morfológicas, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil.
2. Doutor em Patologia Bucal, professor associado do Departamento de Morfologia da UFRN, Natal, RN, Brasil.

experiments. Cell viability and proliferation curves were established at intervals of 24, 48, and 72 hours by counting cells with a hemocytometer and MTT assay. Nuclear morphology was assessed by DAPI staining. The data were statistically analyzed, with a significance level of 5%. **Results:** Increasing cellular proliferation was observed in both groups, with no significant difference throughout the experiment ($P > 0.05$). There was no significant change in cell viability and signs of nuclear damage were not detected in both the groups studied. **Conclusions:** The cryopreservation protocol analyzed was effective for maintaining the integrity of adipose-derived stem cells, allowing their storage for later use.

Keywords: Adipose tissue. Stem cells. Cryopreservation. Cell proliferation.

INTRODUÇÃO

As células-tronco adultas são responsáveis pela reposição das células dos tecidos onde se encontram ao longo de toda a vida, tendo sido isoladas de vários órgãos, incluindo o tecido adiposo^{1,2}. Esse tecido altamente complexo consiste de adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, monócitos/macrófagos residentes e linfócitos³. Esse tecido tem sido foco de pesquisas com células-tronco, uma vez que fornece rica fonte de células pluripotentes^{4,5}.

As células-tronco derivadas do tecido adiposo (*adipose tissue-derived stem cells* – ADSCs) apresentam um potencial de diferenciação semelhante ao das células-tronco derivadas da medula óssea, podendo originar células e tecidos de origem mesodérmica, como adipócitos, cartilagem, osso e músculo esquelético⁶. No entanto, o principal benefício das ADSCs é que elas podem ser facilmente obtidas dos pacientes através de um método simples e minimamente invasivo, além de serem facilmente cultivadas⁷.

A necessidade de manter as células vivas por um longo período sem a perda de suas funções levou ao desenvolvimento de técnicas de criopreservação, que têm como objetivo cessar reversivelmente, de forma controlada, todas as funções biológicas dos tecidos vivos em uma temperatura ultrabaixa, geralmente por volta de -196°C ⁸. Outra possibilidade é realizar a criopreservação celular na temperatura de -80°C , o que garante resultados semelhantes quando se usa o nitrogênio líquido, conforme citam Woods et al.⁹, que criopreservaram células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária por 6 meses nas duas temperaturas supracitadas e observaram capacidade de diferenciação celular idêntica nos dois grupos.

Entretanto, é extremamente necessário determinar se o processo de criopreservação afeta tanto a capacidade proliferativa das células criopreservadas como seu potencial de diferenciação, tendo em vista que uma dificuldade da criopreservação é o restabelecimento das propriedades biológicas das células após o descongelamento. Face ao exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar, por meio de

experimentos *in vitro*, a influência de um protocolo mais simples de criopreservação na capacidade proliferativa das ADSCs.

MÉTODO

Obtenção e Cultivo Celular

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, com o Parecer nº 036/2012. Dois camundongos albinos Swiss machos, com 3 meses de idade, pesando em média 30 g, foram submetidos a eutanásia com dose letal de pentobarbital sódico (150 mg/kg, intraperitoneal), e fragmentos de tecido adiposo foram extraídos da região inguinal. Em câmara de fluxo laminar, os espécimes foram submetidos a três lavagens de 10 minutos cada, com meio α -MEM (*Minimum Essential Medium* – Cultilab, Brasil) enriquecido com antibiótico e antifúngico (Gibco, Estados Unidos), objetivando eliminar possível contaminação.

Posteriormente, o tecido adiposo foi submetido a digestão enzimática com solução contendo 3 mg/ml de colagenase I (Gibco, Estados Unidos) e 1 ml de tripsina/EDTA (Cultilab, Brasil) por uma hora a 37°C . As células foram cultivadas em meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37°C em 5% de dióxido de carbono (CO_2) até atingirem entre 70% e 90% de confluência, com troca de meio a cada três dias.

Uma alíquota das células foi cultivada em meios de diferenciação osteogênico e adipogênico (StemPro® Differentiation Kits, Invitrogen Corp., Estados Unidos) por até 21 dias. Após esse período, as células exibiram, à microscopia de luz, morfologia característica de células osteoblásticas e adiposas, comprovando a natureza multipotencial dessas células.

Criopreservação

No primeiro subcultivo (P1), uma alíquota de 1×10^6 células foi submetida a criopreservação em SFB com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), de acordo com o seguinte protocolo: 2 horas a 4°C , 18 horas a -20°C e, então, mantidas a -80°C por um período de 30 dias. Após esse tempo, as células

foram descongeladas e seguiu-se com o cultivo celular semelhante ao de células que não foram criopreservadas (P2).

Avaliação da Proliferação e da Viabilidade Celulares

No terceiro subcultivo (P3), células de cada grupo (não-criopreservadas e criopreservadas) foram cultivadas em quadruplicata ($n = 4$), na densidade de 3×10^4 células/poço, a fim de se obter o rendimento e a curva de crescimento nos diferentes grupos, durante os intervalos de 24 horas, 48 horas e 72 horas após o plaqueamento. A proliferação e a viabilidade celulares foram avaliadas por meio de contagem utilizando o método de exclusão pelo azul de tripan. Outro método de estudo da proliferação celular utilizado foi o ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], em que as células foram cultivadas em placas de 96 poços, na densidade de 5×10^3 células/poço, durante os mesmos intervalos. A densidade óptica foi obtida pela leitura das placas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm.

Avaliação de Danos Morfológicos Nucleares

A marcação dos núcleos celulares foi realizada nos dois grupos estudados por meio do corante DAPI (4', 6'-diamino-2-fenilindol), no intervalo de 72 horas, com a finalidade de identificar possíveis alterações na morfologia do núcleo indicativas de apoptose, tais como condensação de cromatina e fragmentação nuclear.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise não-paramétrica. A diferença entre os grupos para cada um dos intervalos estudados (24 horas, 48 horas e 72 horas) foi analisada pelo teste estatístico de Mann-Whitney, considerando-se um nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Curvas de crescimento ascendentes foram observadas tanto nas células não-criopreservadas como nas criopreservadas, com maior tendência à proliferação no grupo de células criopreservadas (Figura 1).

Comparando-se as médias das contagens celulares obtidas no grupo de células não-criopreservadas e criopreservadas, a partir do método de exclusão por azul de tripan, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa. Esse método também permitiu a avaliação da viabilidade celular, demonstrando que não houve alteração considerável (Tabela 1). Do mesmo modo, o método de ensaio de MTT também não apresentou diferença estatística significativa ($P > 0,05$) em relação à proliferação celular observada nos dois grupos, nos intervalos estudados (Figura 2).

Não foi observada alteração morfológica no núcleo (como fragmentação nuclear ou núcleos picnóticos) nas ADSCs em nenhum dos grupos (Figura 3).

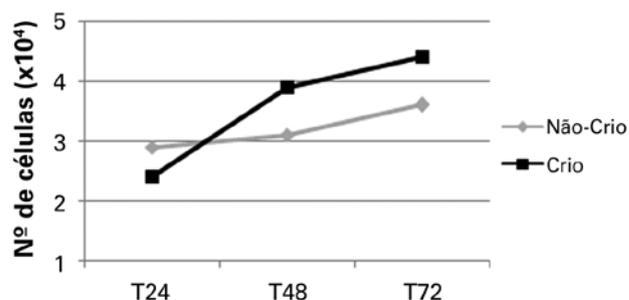


Figura 1 – Curva de crescimento das células não-criopreservadas e criopreservadas, nos intervalos estudados.

Crio = criopreservadas; Não-Crio = não-criopreservadas; T24 = 24 horas; T48 = 48 horas; T72 = 72 horas.

Tabela 1 – Valores referentes a média e desvio padrão do número de células e percentual de viabilidade celular em cada grupo.

	Não-criopreservada	Criopreservada	P*
T24	2,9 ± 0,3 100%	2,4 ± 0,6 100%	0,2059
T48	3,1 ± 0,6 100%	3,9 ± 0,8 94,8%	0,1913
T72	3,6 ± 0,5 96,4%	4,4 ± 0,6 100%	0,1441

* Teste de Mann-Whitney.

T24 = 24 horas; T48 = 48 horas; T72 = 72 horas.

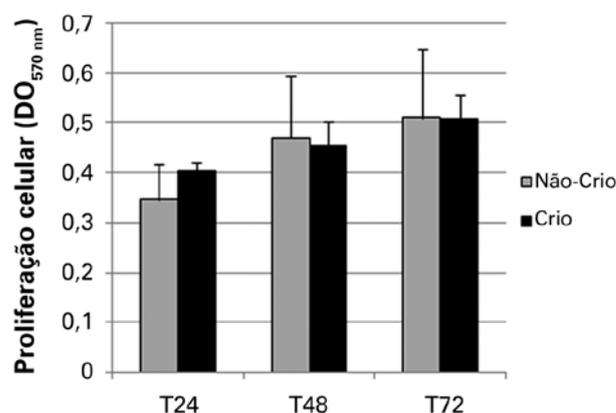


Figura 2 – Atividade mitocondrial das células-tronco derivadas do tecido adiposo nos grupos estudados. Crio = criopreservadas;

Não-Crio = não-criopreservadas; T24 = 24 horas;

T48 = 48 horas; T72 = 72 horas.

DISCUSSÃO

Atualmente, a lipoaspiração vem sendo um procedimento bastante comum nas clínicas de estética. Ao término desse

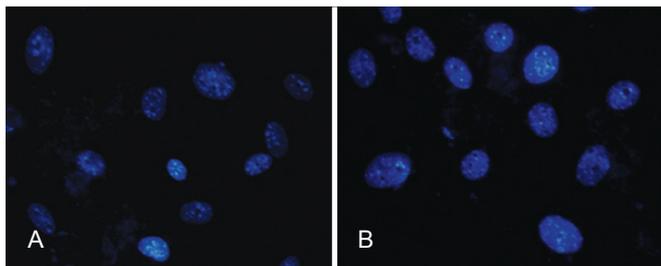


Figura 3 – Em **A**, fotomicrografia das células não-criopreservadas, no intervalo de 72 horas. Em **B**, fotomicrografia das células criopreservadas, no intervalo de 72 horas (DAPI, 40x).

tipo de cirurgia, grande quantidade de tecido adiposo é prontamente obtida. Além de ser utilizado para preenchimentos, a fim de proporcionar aumento de tecido mole, o tecido adiposo também pode ser bastante útil como fonte de células-tronco para a regeneração tecidual¹⁰. Assim, a criopreservação tem sido investigada com o intuito de armazenar o tecido adiposo (ou células específicas) para utilização posterior.

Diversos estudos na literatura relatam tempos distintos de criopreservação, que variam de um dia a intervalos maiores^{11,12}. O tempo de avaliação utilizado neste artigo também está respaldado na literatura, em diversos autores que avaliaram o processo de criopreservação por 30 dias^{9,13,14}, sem diferenças significativas na proliferação e na capacidade de diferenciação celular das células criopreservadas quando comparadas às não-criopreservadas.

Com o objetivo de avaliar as capacidades multipotencial e proliferativa das ADSCs humanas criopreservadas, Gonda et al.¹² mantiveram essas células em baixas temperaturas por 6 meses. Após esse período, observaram que o grupo de células criopreservadas demonstrou potencial de proliferação e de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica semelhante ao do grupo de células não-criopreservadas. Uma diferença destacada pelos autores foi a maior variabilidade no potencial de diferenciação condrogênica para as células criopreservadas. No que se refere à proliferação, esses resultados corroboram os encontrados em nosso estudo, em que ambos os grupos (células não-criopreservadas e criopreservadas) tiveram curva de proliferação celular ascendente.

Thirumala et al.^{15,16}, estudando a criopreservação de células estaminais de tecido adiposo, comentam principalmente o efeito físico que os processos de congelamento e descongelamento podem causar na integridade dessas células. A partir da marcação pelo DAPI, podemos afirmar que o protocolo de criopreservação utilizado no presente estudo manteve íntegras as membranas nucleares, bem como a morfologia do núcleo.

Os protocolos de criopreservação para as células-tronco de tecido adiposo apresentados na literatura mantêm esse tipo celular em uma temperatura de -196°C (nitrogênio

líquido)^{12,17,18}, o que gera alto custo de manutenção e não está acessível a todos os laboratórios de pesquisa. Neste estudo, utilizou-se um protocolo mais simples, mais acessível e de baixo custo, mantendo as células a uma temperatura de -80°C e ainda assim preservando sua viabilidade.

Liu et al.¹⁹ observaram resultados semelhantes aos deste estudo, quando criopreservaram células-tronco de tecido adiposo humano por duas semanas. Em outro estudo, células-tronco de tecido adiposo de cães foram criopreservadas durante 12 meses e depois de descongeladas apresentaram taxa proliferativa semelhante à do grupo de células não-criopreservadas¹⁷. É possível que o tempo em que as células permanecem criopreservadas possa afetar sua viabilidade, porém períodos mais curtos, como o utilizado neste estudo (30 dias), ou mais longos (12 meses), como o estudado por Martinello et al.¹⁷, não são capazes de alterar a proliferação celular. Com base nesses achados da literatura, é provável que se possa prolongar o período de criopreservação dessas células. No entanto, devem ser avaliados possíveis danos desses períodos mais longos de criopreservação no tipo celular em questão.

Entre os vários parâmetros relativos à criopreservação de células, os agentes crioprotetores também podem afetar significativamente a taxa de sobrevivência e o potencial de proliferação após o descongelamento. Optamos por utilizar o DMSO, por ser amplamente utilizado para a criopreservação de diversos tipos celulares^{11,17}. Como observado neste trabalho, esse agente forneceu resultados favoráveis em termos de viabilidade celular e capacidade proliferativa após a criopreservação das ADSCs, por um período de 30 dias.

A velocidade de diminuição da temperatura no congelamento pode ser outro fator crucial para a viabilidade celular após a criopreservação, e deve ser determinada para cada célula específica, a fim de evitar a formação de cristais de gelo intracelulares²⁰. Adotamos um protocolo padrão para outros tipos celulares em cultura, como relatado por Vasconcelos et al.¹⁴ (2 horas a 4°C , 18 horas a -20°C , e, em seguida, armazenamento a -80°C durante 30 dias), protocolo este que demonstrou ser bastante efetivo para as ADSCs.

Em geral, os resultados do presente estudo demonstraram que o protocolo de criopreservação utilizado pode ser uma ferramenta adequada para o armazenamento de ADSCs, permitindo seu uso posterior em experimentos *in vivo*, na busca por futuras aplicações clínicas.

CONCLUSÕES

O protocolo de criopreservação testado mostrou-se eficaz para manter a integridade das ADSCs, conservando sua capacidade proliferativa sem causar danos morfológicos nucleares.

REFERÊNCIAS

1. Levi B, Longaker MT. Concise review: adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *Stem Cells*. 2011;29(4):576-82.
2. De Rosa A, De Francesco F, Tirino V, Ferraro GA, Desiderio V, Paino F, et al. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(4):659-67.
3. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, André M, et al. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett*. 2005;579(17):3487-92.
4. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Cas-teilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res*. 2006;312(6):727-36.
5. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
6. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ojihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb*. 2006;13(2):77-81.
7. Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(11):1886-92.
8. De Santis GC, Prata KL. Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas. *Medicina*. 2009;42(1):36-47.
9. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*. 2009;59(2):150-7.
10. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(3 Suppl):121S-8.
11. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*. 2006;208(2):319-25.
12. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(2):401-10.
13. Temmerman L, Beele H, Dermaut LR, Van Maele G, De Pauw GA. Influence of cryopreservation on the pulpal tissue of immature third molars *in vitro*. *Cell Tissue Bank*. 2010;11(3):281-9.
14. Vasconcelos RG, Ribeiro RA, Vasconcelos MG, Lima KC, Barboza CA. *In vitro* comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. *Cell Tissue Bank*. 2011;13(3):461-9.
15. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Transport phenomena during freezing of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 2005;92(3):372-83.
16. Thirumala S, Zvonic S, Floyd E, Gimble JM, Devireddy RV. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells. *Biotechnol Prog*. 2005;21(5):1511-24.
17. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaolesi M, Mascarello F, et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci*. 2011;91(1):18-24.
18. Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, Iwata H, et al. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant*. 2012;21(2-3):617-22.
19. Liu G, Zhou H, Li Y, Li G, Cui L, Liu W, et al. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*. 2008;57(1):18-24.
20. Hubel A. Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev*. 1997;11(3):224-33.

Correspondência para:

Carlos Augusto Galvão Barboza
 Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte
 Av. Salgado Filho, 3.000 – Campus Universitário – Natal, RN, Brasil – CEP 59072-970
 E-mail: cbarboza@cb.ufrn.br