

## INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DE DIMETILSULFÓXIDO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SOMÁTICAS CRIOPRESERVADAS DO RATO-DE-NARIZ-VERMELHO (*Wiedomys pyrrhorhinus*)

LIMA, Sueli de Oliveira<sup>1</sup>; RODRIGUES, Luanna Lorena Vieira<sup>2</sup>; ASSUNÇÃO, Pedro Rafael Ribeiro<sup>3</sup>; REBOUÇAS, Dallila Nascimento<sup>4</sup>; RODRIGUES, Ana Livia Rocha<sup>5</sup>; BARBOSA, Brenna de Sousa<sup>6</sup>; PEREIRA, Alessandra Fernandes<sup>7\*</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA);

<sup>2</sup>Doutoranda em Ciência Animal, UFERSA; <sup>3</sup>Graduando em Biotecnologia, UFERSA;

<sup>4</sup>Graduanda em Biotecnologia, UFERSA; <sup>5</sup>Mestranda em Ciência Animal, UFERSA;

<sup>6</sup>Doutoranda em Ciência Animal, UFERSA; <sup>7</sup>Docente do PPGCA e coordenadora do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), UFERSA \*alexandra.pereira@ufersa.edu.br

### Resumo

Este estudo avaliou a viabilidade e a apoptose em células somáticas do rato-de-nariz-vermelho criopreservadas com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO; 10% e 2,5%). Após a criopreservação, células foram analisadas quanto à viabilidade e aos níveis de apoptose. Observou-se que o grupo não criopreservado apresentou maior viabilidade ( $93,6 \pm 3,0\%$ ), seguido pelo grupo com 10% de DMSO ( $80,3 \pm 6,0\%$ ), sem diferença estatística ( $P > 0,05$ ). Além disso, este grupo apresentou maior proporção de células viáveis. Os resultados indicam que 10% de DMSO favorece a manutenção da viabilidade celular e reduz a apoptose.

**Palavras-chave:** Biobancos. Células somáticas. Criopreservação. Roedores silvestre.

### Introdução

Os roedores correspondem aproximadamente 37,5% das espécies de mamíferos na Caatinga (Delciellos, 2016). Dentre essas espécies, destaca-se o *Wiedomys pyrrhorhinus* (Wied-Neuwied, 1821), conhecido popularmente como rato-de-nariz-vermelho, o qual é um roedor de pequeno porte endêmico da Caatinga (Sobral et al., 2014). Espécies endêmicas apresentam maior suscetibilidade à ameaça de extinção diante de rápidas transformações ambientais (Zeng et al., 2019). Nesse contexto, estudos focados no desenvolvimento de protocolos de criopreservação são essenciais para o desenvolvimento de estratégias de conservação, sendo a criopreservação de células somáticas essencial na criação de criobancos.

Na criopreservação de células são utilizados crioprotetores, como o dimetilsulfóxido (DMSO). Estudos com fibroblastos de espécies como porquinhos-da-índia demonstraram que o uso 10% de DMSO tem sido eficaz na preservação celular (Mehrabani et al., 2014). De forma semelhante, em fibroblastos de cutia-vermelha e preá, 10% DMSO tem sido empregada na criopreservação dessas células (Praxedes et al., 2021; Aquino et al., 2024). Embora o DMSO seja amplamente utilizado na criopreservação como crioprotetor intracelular, concentrações elevadas podem exercer efeitos citotóxicos, comprometendo a viabilidade celular e ocasionando danos estruturais. Nesse contexto, estudos buscam reduzir sua concentração nos protocolos de criopreservação, minimizando efeitos adversos sem comprometer a eficiência.

### Objetivos

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO; 10% e 2,5%) sobre a viabilidade e os níveis de apoptose em células somáticas criopreservadas do rato-de-nariz-vermelho.

## Metodologia

O experimento foi conduzido de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (no. 48/2024) e SISBIO (no. 96958-1). Para tanto, foram utilizados cinco animais mantidos no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA, Mossoró, RN). Explantes de tecido auricular (1–2 cm<sup>2</sup>) foram coletados e transportados ao Laboratório de Biotecnologia Animal em solução de transporte previamente preparada composta de meio essencial mínimo de Dulbecco (DMEM), suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de antibiótico-antimicótica (10.000 unid/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de Anfotericina B; Gibco-BRL, Carlsbad, EUA) a 4 °C. No laboratório, os explantes foram tricotomizados e fragmentados (9,0 mm<sup>3</sup>; 4 a 5 fragmentos) e cultivados em placas contendo meio de cultivo DMEM<sup>2</sup> (DMEM, suplementado com 15% de SFB e 2% de antibiótico-antimicótica, previamente preparado no laboratório) e incubados a 38,5 °C, 5,5% CO<sub>2</sub>, com troca de meio cada 24 h. Após as células atingirem 70% de confluência, os fragmentos foram removidos. As células foram tripisinizadas (0,25 % tripsina, 0,05 % EDTA). As células foram cultivadas até a terceira passagem e, ao atingirem entre 70–80% de confluência foram divididas em dois grupos: não criopreservadas e criopreservadas por congelamento lenta. As células foram criopreservadas utilizando diferentes soluções crioprotetoras contendo 2,5% ou 10% de DMSO e 0,2 M de sacarose. Após duas semanas, foram descongeladas e cultivadas.

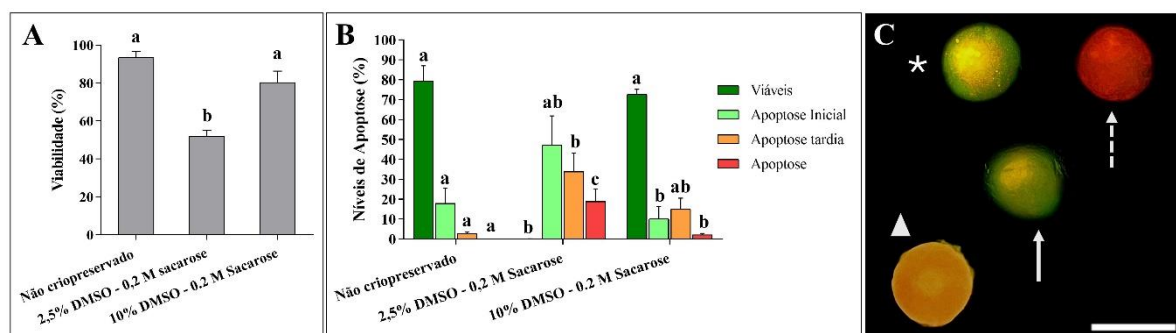
As células foram avaliadas quanto à viabilidade por azul de tripan e apoptose. A viabilidade foi determinada pelo teste de azul de tripan a 0,4% (Praxedes et al., 2021) e avaliadas em câmara Neubauer sob um microscópio óptico. Células viáveis foram identificadas pela ausência de coloração, enquanto células não viáveis apresentaram coloração azul. A análise de apoptose foi realizada por meio de dupla marcação com acridina laranja (2 µg/mL) e brometo de etídio (10 µg/mL) e analisadas usando microscópio de fluorescência. As imagens foram registradas e 300 células foram avaliadas utilizando o software ImageJ. A classificação das células quanto ao estágio apoptótico sendo categorizadas em: células viáveis (verde uniforme), apoptose inicial (verde amarelado), apoptose tardia (laranja) e apoptose (vermelho).

Os dados foram expressos como média ± erro padrão (animal/repetição) e analisados no software GraphPad Prism, Teste de Shapiro-Wilk e de Levene e ANOVA seguida do teste de Tukey, com nível de significância de  $P < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

Ao avaliar a viabilidade celular pelo teste de azul de tripan (Figura 1A), observou-se que os grupos 10% de DMSO e o não criopreservado apresentaram viabilidade acima de 80,3% ± 6,0 e 93,6 ± 3,0% respectivamente ( $P > 0,05$ ). Esses achados corroboram com estudos que ao usar 10% DMSO na criopreservação de fibroblastos do preá (Aquino et al., 2024). Liu et al. (2022) demonstraram que o uso da concentração de 10% de DMSO na criopreservação de fibroblastos de camundongos obtiveram viabilidade superior a 90%.

Por outro lado, a redução da concentração de DMSO para 2,5% (Figura 1A) resultou em diminuição significativa da viabilidade celular (52,0 ± 3,0%), diferindo do grupo não criopreservado ( $P < 0,05$ ). Estudos demonstram que condrócitos criopreservados com 5% DMSO, a viabilidade foi reduzida (Liu et al., 2019). A análise dos níveis de apoptose (Figura 1B-C) confirmou esse padrão, onde o grupo não criopreservado e 10% DMSO, resultaram nas maiores proporções de células viáveis (79,3% ± 7,6, 72,6% ± 2,6). Por outro lado, 2,5% DMSO apresentaram baixa viabilidade e aumentos no apoptose tardia (44,8% ± 2,9) e necrose (18,9% ± 6,2).



**Figura 1.** Análise da viabilidade e níveis de apoptose em células somáticas do rato-de-nariz-vermelho criopreservadas em diferentes concentrações de DMSO. **(A)** Viabilidade celular pelo teste de azul de tripan; **(B)** Níveis de apoptose; **(C)** Imagem representativa das células viáveis (→), apoptose inicial (\*), apoptose tardia (▲) e apoptóticas (---). <sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Barra de escala = 100 µm.

## Conclusão

O uso 10% de DMSO permite a manutenção da viabilidade e a redução dos níveis de apoptose em células somáticas. Por outro lado, a redução da concentração de DMSO para 2,5% resultou na diminuição da viabilidade celular e no aumento dos níveis de apoptose.

## Referências

- AQUINO, L.V.C. *et al.* L-proline as a cryoprotective agent for the preservation of skin fibroblasts of *Galea spixii*. **Biopreservation and Biobanking**, v. 23, p. 109–117, 2025.
- DELICIELLOS, A.C. Mammals of four Caatinga areas in northeastern Brazil: inventory, species biology, and community structure. **Check List**, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2016.
- FUJISAWA, R. *et al.* Reduced viability of chondrocytes cryopreserved with low DMSO. **Cell and Tissue Banking**, v. 20, p. 321–329, 2019.
- MEHRABANI, D. *et al.* Establishment, culture, and characterization of guinea pig fetal fibroblast cell. *Veterinary Medicine International*, v.1, p. 1–5, 2014.
- PRAXEDES, É.A. *et al.* Establishment, characterization, and cryopreservation of cell lines derived from red-rumped agouti. **Cryobiology**, v. 98, p. 63–72, 2021.
- SOBRAL, G.; OLIVEIRA, J.A. Annual age structure and reproduction in the Caatinga red-nosed mouse, *Wiedomys pyrrhorhinos* (Rodentia, Sigmodontinae). **Therya**, v. 5, n. 2, p. 509–534, 2014.
- ZENG, D. *et al.* Cascading effects of forested area and isolation on seed dispersal effectiveness of rodents on subtropical islands. **Journal of Ecology**, v. 107, n. 3, p. 1506–1517, 2019.