

A criopreservação celular tem como objetivo a conservação de células a temperaturas criogênicas, possibilitando a manutenção de sua viabilidade até que seja necessária sua utilização. Entretanto, o processo de congelamento por si só, já implica riscos para a sobrevivência celular e muitos estudos envolvendo tipos e concentrações de crioprotetores, densidade celular e curvas de resfriamento vêm sendo realizados. Além disto, a fase do ciclo celular em que as células se encontram no momento da criopreservação pode interferir na sobrevivência e retomada das divisões celulares pós-descongelamento. Esse trabalho tem como objetivo testar três padrões de confluência do cultivo celular imediatamente antes do processo de congelamento e relacioná-los à taxa de sobrevivência e viabilidade pós-descongelamento. Para isto, cultivos celulares de fibroblasto bovino, entre sexta e décima passagem, obtidos por explantação, foram mantidos em DMEM+10% SFB (soro fetal bovino) em incubadora a 37°C em ar e umidade saturada até atingirem a confluência desejada para cada grupo experimental. No tratamento 1 (T1) as células foram congeladas quando o cultivo celular estava subconfluente (confluência entre 70 e 80%), no tratamento 2 (T2) as células foram congeladas no dia em que atingiam a confluência de 100% e no tratamento 3 (T3) as células foram congeladas 48h após atingirem 100% de confluência. Para o congelamento foi utilizada a concentração de 1×10^6 células/mL por criotubo em solução de congelamento, composta de 10% de dimetil sulfoxio (DMSO), 10% SFB e 80% de DMEM. Após o envase das células, os criotubos foram mantidos a 4°C durante 15 min e depois foram resfriados com velocidade $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ até -80°C em aparato Mr. Frosty[®] (Nalgene, ThermoScientific) em ultrafreezer. Após permanecerem a -80°C durante 24h as células foram armazenadas em N₂L (nitrogênio líquido) até o momento do descongelamento. Para o descongelamento, os criotubos foram aquecidos em banho-maria a 37°C durante 1 min, e o crioprotetor foi removido das células por diluição e centrifugação, sendo então determinada a taxa de sobrevivência pela técnica de exclusão de células morta por azul de tripan. Para avaliação da viabilidade, as células foram cultivadas com uma concentração inicial de 10.000 células e 24h após foi realizada contagem pelo mesmo método. Foram realizadas dez repetições para cada tratamento e a análise estatística foi realizada pela ANOVA com teste de Tuckey com nível de significância de 5%. Após o descongelamento, não houve diferença significativa entre as taxa de sobrevivência média dos grupos testados (69,6%-T1, 73,6%-T2 e 70,7%-T3). Entretanto, o número de células contadas após 24h de cultivo no grupo subconfluente (13.650 células-T1) foi significativamente maior do que os demais grupos (8.518 células-T2 e 6.755 células-T3). Esses dados sugerem que após o congelamento/descongelamento as células em fase logarítmica, ou seja, com alta taxa de divisão celular (T1) retomam o crescimento mais rapidamente que as células que estão em uma fase de inibição densidade-dependente (T2 e T3).