

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MEIOS SÓLIDOS EM CULTURA DE CÉLULAS ADERENTES

¹Carla O. de Souza ¹, Graziela de Sousa ¹, Cristina Pacheco-Soares ¹,
Newton Soares da Silva ¹

¹Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova - São José dos Campos/SP - CEP: 12.244-000
nsoares@univap.br

Palavras-chave: Cultura de Células, VERO, Gelatina, Ágar

Área do Conhecimento: III - Engenharias

Resumo- A cultura de células tem sido largamente utilizada nas pesquisas atuais, já que as células podem ser diretamente utilizadas, dinamizando assim o tempo de resposta de um experimento. Os fibroblastos acham-se envolvidos na produção dos vários tipos de fibras encontradas no tecido conjuntivo e também participa da síntese da matriz do tecido conjuntivo. Conhecendo-se a fisiologia dos fibroblastos mantidos em cultura, objetivou-se a comparação entre meios sólidos diferentes, a fim de possibilitar a manutenção de tal cultura celular. Utilizou-se células VERO cultivadas primeiramente em meio líquido e depois cultivadas em dois meios de cultura sólidos diferentes, sendo Ágar e solução Ágar-Gelatina. Observou-se que o crescimento da cultura celular ocorreu efetivamente em ambos os meios sólidos nos primeiros 3 dias. Entretanto a cultura em Meio Sólido Ágar apresentou maior índice de morte celular, inclusive um declínio no número de células vivas a partir do 3º dia. Já a cultura em Meio Sólido Ágar-Gelatina não apresentou índices anormais de morte celular, tão pouco declínio no número de células vivas; pelo contrário, as placas contendo este meio sólido se mostrou com alta densidade celular.

Introdução

Há cento e cinquenta e cinco anos, biólogos sabem que células vêm de células. Este conceito é atualmente tão fundamental que nós o aceitamos implicitamente; as células dividem-se assimetricamente para preservar as células-tronco progenitoras, dividindo-se em células irmãs, diferenciando-se ao longo do tempo seguindo a formação de tecidos normais[1].

As células são unidades estruturais e funcionais dos organismos vivos ou seja, todos os seres vivos são formados por células - compartimentos envolvidos por membrana, preenchidos com uma solução aquosa concentrada de substâncias químicas. Há muitos tipos diferentes de células, que variam enormemente em tamanho, forma e funções especializadas [2].

A cultura de células tem sido largamente utilizada nas pesquisas atuais, já que as células podem ser diretamente utilizadas, dinamizando assim o tempo de resposta de um experimento. Tal técnica é muito importante para o acompanhamento e monitoramento de processos que podem ocorrer no interior celular[3].

O fibroblasto é uma célula predominante do tecido conjuntivo (65% da população celular total). O fibroblasto acha-se envolvido na produção dos vários tipos de fibras encontradas

no tecido conjuntivo e também participa da síntese da matriz do tecido conjuntivo. O fibroblasto é uma célula fusiforme ou estrelada e está alinhado ao longo da direção geral dos feixes de fibras[4]. Geralmente, apresenta-se alongado e com algumas expansões citoplasmáticas, que se estendem para fora da célula. O citoplasma é basófilo devido à intensa atividade de síntese protéica desta célula[5]. Conhecendo-se a fisiologia dos fibroblastos mantidos em cultura, objetivou-se a comparação entre meios sólidos diferentes, a fim de possibilitar a manutenção de tal cultura celular.

Materiais e Métodos

Linhagem Celular: A linhagem celular utilizada foi a VERO (rim de macaco verde africano).

Manutenção da Linhagem Celular: As células foram cultivadas em meio de cultura líquido: Meio Mínimo Essencial - MEM (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino - SFB, 1% de antibiótico *Antibiotic Antimycotic* (Gibco) e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, em garrafas plásticas Nunc 25cm².

Propagação da Linhagem Celular em Meio Sólido Ágar: Transferiu-se as células para placas de petri de 40x10mm, as quais foram mantidas para adesão com meio de cultura líquido: Meio Mínimo Essencial - MEM (Gibco) suplementado

com 20% de Soro Fetal Bovino - SFB, 1% de antibiótico *Antibiotic Antimycotic* (Gibco) e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após a adesão celular retirou-se metade do meio de cultura no qual as células estavam e adicionou-se ágar fundido (36°C) à metade restante do meio de cultura em que as células estavam. Sendo que foi mantida a proporção de 1:1 entre meio líquido MEM e ágar fundido (36°C).

Propagação da Linhagem Celular em Meio Sólido Ágar-Gelatina: Transferiu-se as células para placas de petri de 40x10mm, as quais foram mantidas para adesão com meio de cultura líquido: Meio Mínimo Essencial - MEM (Gibco) com o dobro da concentração normal, suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino - SFB, 1% de antibiótico *Antibiotic Antimycotic* (Gibco) e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após a adesão celular retirou-se metade do meio de cultura no qual as células estavam e adicionou-se a solução de ágar-gelatina (2:1) à metade restante do meio de cultura em que as células estavam. Sendo que foi mantida a proporção de 1:1 entre meio líquido MEM e solução ágar-gelatina.

Obtenção dos Resultados: As células foram mantidas por 9 dias em meio sólido, de ambas as formas descritas de propagação da linhagem celular em meio sólido. Após este tempo de crescimento foram feitas fotomicrografias das placas contendo as células nos diversos meios sólidos. Para o registro do material foi utilizado um microscópio invertido Leica DMIL e sistema fotográfico Leica MPS-30.

Os experimentos foram sempre realizados em duplicata.

Resultados

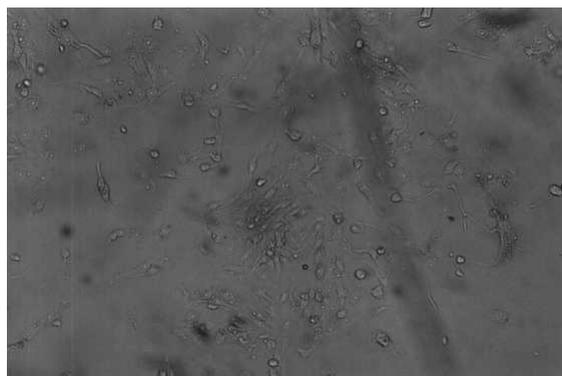
As células se multiplicam através de um processo de mitose e ao passarem por este processo as novas células e sua vizinhança se reorganizam espacialmente através de forças de contato, principalmente forças de adesão, que dependem diretamente dos tipos celulares em contato. As células aderem através de moléculas especializadas nesta função, as chamadas CAMs ("Cell Adhesion Molecules") que estão presentes na membrana celular e criam sítios de ligação. A correta organização espacial das células é essencial para a função de um dado tecido num organismo e esta depende também das propriedades de adesão entre as mesmas [6].

Visto a necessidade de uma correta organização espacial das células também em cultura de células, fez-se a comparação do crescimento celular em dois Meios de Cultura Sólidos distintos.

Linhagem Celular em Meio Sólido Ágar:

Como se pode observar, a Figura 1 apresenta redução da densidade celular, haja visto que culturas celulares saudáveis mostram-se arranjadas em estrutura de monocamada confluenta. O que pode ser notado na fotomicrografia é a distribuição esparsa das células, evidenciando a ocorrência de morte celular.

Figura 1: Linhagem Celular VERO cultivadas

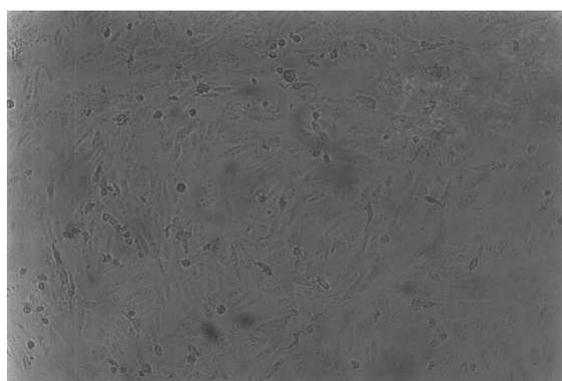


em Meio Sólido Ágar, apresentando lacunas intercelulares, X1000.

Linhagem Celular em Meio Sólido Ágar - Gelatina:

Já na Figura 2 pode-se observar a grande densidade celular em monocamada confluenta devido ao alto índice de células vivas, não apresentando espaços entre as células o que evidencia baixo índice de morte celular.

Figura 2: Linhagem Celular VERO cultivadas



em Meio Sólido Ágar-Gelatina, apresentando monocamada confluenta sem lacunas intercelulares, X1000.

Discussão

Comparando o método de cultivo em Meio Sólido Ágar e o método de cultivo em Meio Sólido Ágar-Gelatina, pode-se verificar uma grande diferença entre os dois métodos levando-se em conta os índices de morte celular.

O método de cultivo em Meio Sólido Ágar demonstrou um alto índice de morte celular, provavelmente, por baixa quantidade nutricional, pois o Ágar apresenta ausência de qualquer tipo de nutriente, causando com isso o estresse celular por desnutrição.

Enquanto que o método de cultivo em Meio Sólido Ágar-Gelatina se mostrou mais eficiente, provavelmente devido à presença de moléculas do meio mínimo essencial utilizado, além da gelatina como substrato de valor nutricional relevante e o ágar como agente responsável pela consistência do Meio Sólido. Todos esses fatores contribuindo para uma maior proliferação celular e maior resistência às passagens (ciclo celular) sem a adição de meio de cultura.

Conclusão

Observou-se que o crescimento da cultura celular ocorreu efetivamente em ambos os meios sólidos nos primeiros 3 dias. Entretanto a cultura em Meio Sólido Ágar apresentou maior índice de morte celular, inclusive um declínio no número de células vivas a partir do 3º dia. Já a cultura em Meio Sólido Ágar-Gelatina não apresentou índices anormais de morte celular, tão pouco declínio no número de células vivas; pelo contrário, as placas contendo este meio sólido se mostrou com alta densidade celular.

Referências

[1]KALLURI, R. and NEILSON, E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**. V.112, n.12, p.1776-1784, 2003.

[2]Visão Geral da Célula, Internet site address: <http://www.terraviva.pt/bilene/5547/biologia/Celula/introd01.htm> acessado em 13/07/2004

[3]SOUSA, G. Avaliação do Efeito da Terapia Fotodinâmica sobre Estruturas Celulares. 2002. Trabalho de Graduação (Ciências Biológicas) Faculdade de Educação - Universidade do Vale do Paraíba.

[4]BHASKAR, S. N. - Histologia e Embriologia Oral de Orban São Paulo. Artes Médicas. 10 ed., 1989.

[5]Atlas Eletrônico de Histologia, Internet site address: http://www.ufrgs.br/morfologicas/txt_conj.html acessado em 13/07/2004.

[6]Gilbert, S. F., *Developmental Biology*, Sunderland, Massachussets: Sinauer, 1991.

Apoio:

