

PADRONIZAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO EM CULTURAS DE LINHAGENS TUMORAIS

CARLA BEATRIZ ROCHA DA SILVA¹; GUSTAVO DIAS FERREIRA²; LOLITA SCHNEIDER PIZZOLATO²; ILMA SIMONI BRUM DA SILVA²; ISABEL OLIVEIRA DE OLIVEIRA³

¹*Universidade Federal de Pelotas – carlabrsil@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – gusdiasferreira@gmail.com*

²*Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre – loli.schneider@gmail.com*

²*Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre – ilma@ufrgs.br*

³*Universidade Federal de Pelotas – isabel.ufpel@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A suplementação de meios de cultura com soro bovino fetal (SBF) é uma prática comumente usada na metodologia de cultivo celular in vitro, pois facilita a adesão e estimula a proliferação das células.

O SBF é obtido de lotes de soros originados de sangue total coagulado extraído de fetos de vacas em abatedores oficiais. É composto por uma variedade de substâncias, incluindo os ácidos graxos, fatores de crescimento, substratos energéticos, aminoácidos e vitaminas com concentrações variáveis, mas baixa concentração de gamaglobulinas (BAVISTER et al., 1992; KRISHER et al., 1999; ISAAC et al., 2011).

Um dos componentes do SBF é o folato, metilfolato ou vitamina B9, que corresponde a uma vitamina hidrossolúvel do complexo B. O folato é a forma natural encontrada nos alimentos, sendo o ácido fólico a forma sintética. O folato tem grande importância no metabolismo e no controle do crescimento celular (SANTOS; PEREIRA, 2007). Estudos recentes têm sugerido uma ligação entre a alta ingestão de ácido fólico presente em suplementos e vários tipos de câncer, em particular o câncer colorretal (PROTIVA et al., 2011). Modelos animais sugerem que a alta ingestão de ácido fólico pode ter um efeito duplo: inibindo a formação de lesões neoplásicas em tecidos normais e acelerando a transformação maligna de neoplasmas existentes. Em relação ao câncer de próstata, o papel do ácido fólico ainda necessita ser esclarecido.

O objetivo do presente estudo foi padronizar a quantidade mínima de SBF a ser usada para manter células de linhagens tumorais em cultura, especialmente células tumorais de próstata, afim de posteriormente ser testado o efeito de diferentes concentrações de ácido fólico sobre a proliferação destas células.

2. METODOLOGIA

As linhagens celulares obtidas através de projeto em colaboração com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) foram LNCaP, C4-2B e MRC-5. A linhagem tumoral LNCaP é originária de células de adenocarcinoma de próstata humana, tendo sido obtida de um homem caucasiano com 50 anos de idade em 1977. Essas células são sensíveis a androgênios e capazes de produzir antígeno prostático específico de membrana (PSMA). A linhagem C4-2B corresponde a células derivadas de metástases ósseas de câncer de próstata de coluna lombar de ratos atípicos. A linhagem MRC-5 é uma linhagem celular humana derivada de fibroblastos de pulmão.

Na primeira etapa do protocolo de cultivo adotado, foi realizado o plaqueamento de 1.000 células por poço da linhagem MRC-5 em meio RPMI 1640 (suplementado com 10% de SBF) usando placas de 96 poços. As células foram deixadas em repouso por 24h, em estufa com 5% de CO₂ e em temperatura de 37°C; na segunda etapa, foi realizado o tratamento das células com meio RPMI 1640 contendo diferentes concentrações de Soro Bovino Fetal (SBF) (0%; 1%; 2%; 5%; 7,5% e 10%). As células foram deixadas em cultivo por 3 e 5 dias nas condições acima mencionadas. Na terceira etapa, foi realizado o ensaio de proliferação MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Na preparação do reagente, foi usada uma quantidade de 5mg de MTT diluído em 1mL de PBS. A seguir, 10% da solução de MTT foi diluída em 90% de meio de cultura. Em cada poço da placa foi acrescentado 100 microlitros de meio com MTT, que foi deixado por 3h na estufa. Após decorrido o tempo de 3h, foi retirado o meio dos poços e acrescentado DMSO. Na última etapa, foi realizada a leitura das placas usando espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. O resultado de geração de cor por diluição dos cristais de MTT é proporcional à taxa de proliferação celular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do ensaio de proliferação do MTT obtidos correspondem à avaliação da proliferação das células da linhagem MRC-5 após tratamento com diferentes concentrações de soro bovino fetal (SBF), conforme podem ser observados os dados das tabelas 1 e 2. As concentrações de SBF acrescido ao meio de cultivo foram de 0%; 1%; 2%; 5%; 7,5% e 10%. Foi observado um crescimento dose dependente nas diferentes concentrações de SBF acrescentadas ao meio ($p<0,001$) (Figura 1). Com meio sem soro (0%) houve diminuição significativa da proliferação em relação ao controle (soro 10%), conforme pode ser observado pelos dados nas tabelas 1 (3 dias de cultivo) e 2 (5 dias de cultivo). Os dados sugerem ser possível diminuir a concentração de SBF para 1%, uma vez que foi mantida uma taxa de proliferação que não foi diferente em relação aos tratamentos de suplementação com 2,5%, 5% e 7,5% de SBF, respectivamente ($p=0,490$).

A avaliação da proliferação das linhagens celulares de próstata, LNCAP e C4-2B, após tratamento com diferentes concentrações de SBF, encontra-se em fase de execução.

Tabela 1. Avaliação por MTT da Proliferação das células MCR-5 em meio RPMI suplementado com diferentes concentrações de SBF (3 dias).

Concentrações (%)	Dia 3										Média	Proliferação
	Repetições											
0	0,3	0,221	0,107	0,118	0,127	0,100	0,113	0,11	0,1495	39,7078		
1	0,4	0,433	0,213	0,262	0,252	0,188	0,25	0,23	0,2785	73,9708		
2,5	0,363	0,448	0,286	0,262	0,29	0,259	0,244	0,203	0,294375	78,1873		
5	0,362	0,3	0,245	0,334	0,304	0,3	0,259	0,306	0,33025	87,7158		
7,5	0,429	0,25	0,301	0,34	0,289	0,363	0,346	0,324	0,33025	87,7158		
10	0,506	0,311	0,323	0,305	0,301	0,298	0,288	0,68	0,3765	-		

Tabela 2. Avaliação por meio da técnica de MTT da Proliferação das células MCR-5 em meio RPMI 1640 suplementado com diferentes concentrações de SBF (5 dias de cultivo)

Concentrações (%)	Dia 5									Média	Proliferação
	Repetições										
0	0,088	0,073	0,075	0,085	0,070	0,082	0,069	0,065	0,075875	15,9443	
1	0,223	0,211	0,268	0,218	0,235	0,263	0,172	0,217	0,225875	47,4652	
2,5	0,395	0,331	0,394	0,492	0,434	0,385	0,353	0,313	0,387125	81,3501	
5	0,476	0,383	0,371	0,569	0,519	0,619	0,393	0,406	0,467	98,135	
7,5	0,515	0,623	0,574	0,625	0,639	0,293	0,428	0,463	0,52	109,272	
10	0,406	0,507	0,561	0,565	0,509	0,354	0,565	0,34	0,475875	-	

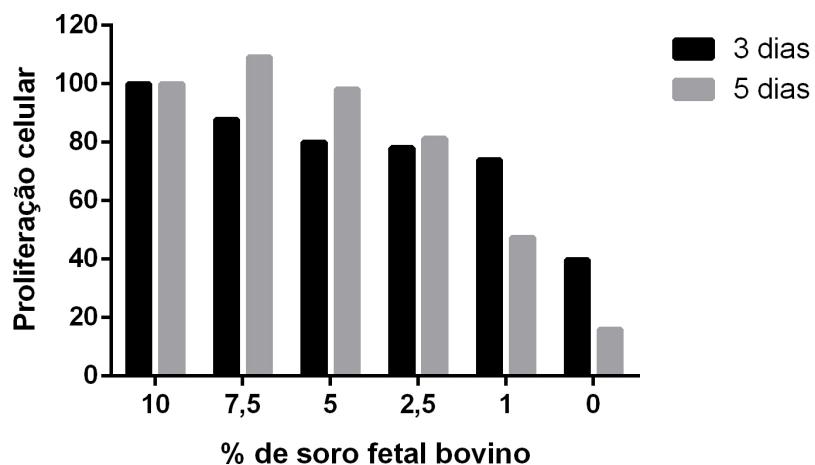


Figura 1. Avaliação da proliferação das células MRC-5 em meio RPMI suplementado com diferentes concentrações de SBF. Tempo de avaliação 3 e 5 dias.

4. CONCLUSÕES

Considerando o interesse em se avaliar o efeito do ácido fólico sobre a proliferação de células tumorais em cultura, a diminuição da concentração de SBF no meio de cultivo ao menor valor possível é importante para reduzir a interferência dos produtos presentes no soro que estimulam a proliferação celular, sem contudo prejudicar a adesão das células à placa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E.A.; GUIMARÃES A.C.R. Cultivo Celular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC. 2010. Vol. 2, Cap. 5, p.1215-1253.

BAVISTER, B.D.; ROSE-HELLEKANT, T.A; PINNYOMMINTER T. Development of in vitro and matured in vitro fertilized bovine embryos into morula and blastocyst in defined culture media. **Theriogenology**, v. 37, p. 127-146, 1992.

ISAAC, C. et al. Substituição de soro bovino fetal por soro humano como suplemento para cultura de fibroblastos humanos. **Rev. Bras. Cir. Plást.** v. 26, n. 3, p. 379-84, 2011.

KRISHER, R.L.; LANE, M.; BAVISTER, B.D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semidefined and defined culture media. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1345-1352, 1999.

MARTINIAK, Y.; HEUER, T.; HOFFMANN, I. Intake of dietary folate and folic acid in Germany based on different scenarios for food fortification with folic acid. **Eur. J. Nutr.** v. 54, p. 1045-1054, 2015.

PROTIVA, P. et al. Altered folate availability modifies the molecular environment of the human colon: implications for colorectal carcinogenesis. **Cancer Prev Res (Phila)**. v. 4, n. 4, p. 530–543, April, 2011

SANTOS, L.M.; PEREIRA, M.Z. The effect of folic acid fortification on the reduction of neural tube defects. **Cad Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 17-24, Jan 2007.