

IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE CULTURA DE LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO NO LABORATÓRIO DE MUTAGÊNESE E MONITORAMENTO AMBIENTAL (LMMA)

Jonatas Alécio dos Prazeres (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Igor Vivian de Almeida (Coorientador), Veronica Elisa Pimenta Vicentini (Orientador)
e-mail: jonatasap2008@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular - DBC

Ciências Biológicas/Mutagênese

Palavras-chave: Cultura Celular, Micronúcleo, Linfócitos.

Resumo:

A técnica de cultura celular *in vitro* possui grande importância para testes genéticos, químicos e bioquímicos e também na produção de vacinas, anticorpos, enzimas, hormônios e vários outros produtos. A cultura de linfócitos humanos responde *in vitro* de forma semelhante ao do organismo vivo, como danos celulares induzidos por fármacos e outras substâncias químicas. O ensaio mais utilizado devido a sua facilidade de reprodução, comparado a outros testes, é o teste do micronúcleo (MN). Esse teste permite observar danos em nível cromossômico, ou seja, danos direto ao material genético. Os cromossomos, sofrem quebra ou perda, formando um 'segundo' núcleo com características semelhantes à do núcleo principal, no entanto, com tamanho menor.

Devido ao exposto acima esse trabalho padronizou todas as variáveis, como ajuste do fixador, corante, quantidade de material coletado e etc., da técnica de cultura de linfócitos humanos e o teste do MN no Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental (LMMA), Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, da Universidade Estadual de Maringá.

Introdução

O cultivo de linfócitos de sangue periférico humano, é uma boa técnica para ensaios *in vitro*, por permitir diversos estudos relacionados a genotoxicidade e citotoxicidade, além da fácil obtenção desse tipo celular.

Produzidos pela medula óssea a partir da diferenciação dos leucócitos, os linfócitos fazem parte do grupo mais heterogêneo de células que constituem o sistema imune ou o sistema de defesa do organismo. Os linfócitos são células pequenas, regulares e arredondadas e se dividem em dois tipos, T e B. Os linfócitos T derivados do timo, fazendo parte da resposta imunológica celular, os linfócitos B são aqueles que atingem a maturidade na medula óssea, sendo precursores das células produtoras de anticorpos.

Com os linfócitos é possível avaliar danos cromossômicos, e assim ser usados como biomarcadores dos efeitos genotóxicos. Nos últimos 20 anos, vários pesquisadores desenvolveram ensaios como os de Aberrações cromossômicas, Micronúcleo, Trocas entre Cromátides Irmãs, Cometa, FISH, Metilação, Estresse oxidativo e Polimorfismo a partir da cultura de linfócitos humanos.

A cultura de linfócitos é amplamente utilizada para o ensaio do MN e Cometa. O ensaio do MN foi proposto inicialmente por Countryman e Heddle (1976), como alternativa de análise de quebras cromossômicas. Este ensaio permite avaliar a alteração do material genético pela exposição de agentes químicos, físicos e biológicos que podem acarretar em danos à saúde devido ao seu potencial genotóxico (FENECH, 2000). Além do teste do MN é possível aplicar o ensaio do Cometa. Também conhecido como eletroforese de célula única em gel (*Single Cell Gel Electrophoresis*, SCGE), é um método para o estudo de danos na fita de DNA, induzidos por agentes físicos, químicos e biológicos (OSTLING; JOHANSON, 1984; OLIVE; BANÁTH, 2006).

A cultura de linfócitos humanos é essencial para o desenvolvimento de diversos ensaios e testes biológicos, como por exemplo o do micronúcleo, desse modo padronizar essa técnica é extremamente importante para a realização de pesquisas científicas.

Materiais e métodos

Para obtenção dos linfócitos, foi retirado uma amostra de 5mL de sangue total. O material foi armazenado por 24h, separando o plasma das hemoglobinas. Foi adicionado meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), fitohemaglutinina [30µg/mL] e quatro gotas de *Buffy Coat*, em cada frasco. Após isso, os frascos foram levados para a estufa (37°C) por 44h, onde houve leve agitação nesse intervalo. Após esse período, foi adicionado 1,2µL/mL de citocalasina e mantido em estufa por 28h. O material foi transferido para tubos e centrifugados por 10 minutos a 800rpm, o sobrenadante foi retirado e adicionado 8mL de KCl (gelado) e levado a geladeira por 5 minutos. Após isso, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 800rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionado 3mL de fixador. O material foi ressuspenso, centrifugado por 5 minutos a 800rpm, descartado o sobrenadante e adicionado 2mL de fixador + formaldeído 1% (5mL de fixador + 3 gotas de formaldeído). Logo após, houve a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso possibilitando a deposição do material em lâminas de vidro, previamente lavadas e imersas em água destilada gelada.

As lâminas foram coradas com Giemsa devidamente filtrado e diluído em tampão Sorensen (1 Giemsa : 30 Sorensen) por 8 minutos. As lâminas, foram lavadas e analisadas previamente em microscópio de luz no aumento de 200x a 400x para a localização de campos de boa qualidade e com células individualizadas. E com a objetiva de 1000x vezes para análise das células.

Resultados e Discussão

No trabalho em questão foi possível padronizar todos os parâmetros relacionados a cultura de linfócitos humanos, desde a coleta do material até a fixação e coloração

do mesmo. Não houve nenhum tipo de tratamento com algum agente químico ou com indutores de danos.

Os linfócitos cultivados cresceram e permitiram a análise de possíveis micronúcleos ou células binucleadas, pois foram obtidas células individualizadas e bem coradas (Figura 03).

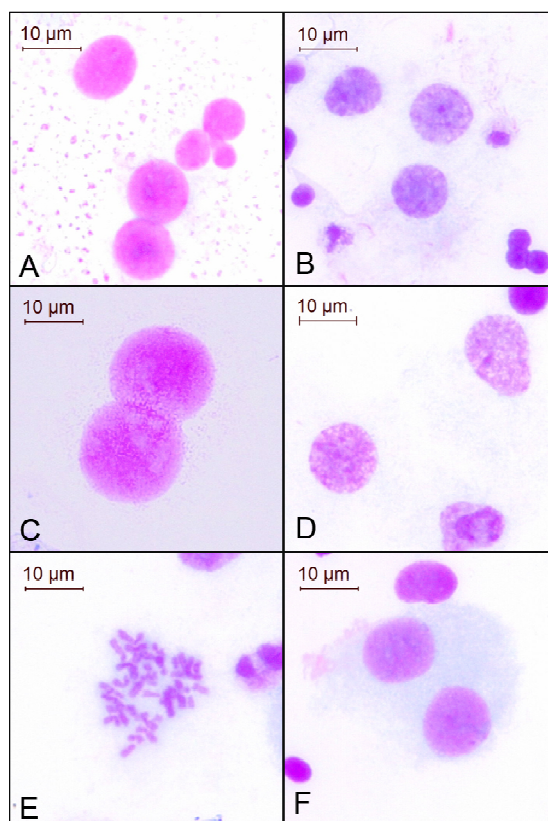


Figura 01 - Cultura de Linfócitos humanos em aumento de 1000x A, B, C, D e F, e E – Cromossomos.

Além das células individualizadas, a coloração final das lâminas possui um papel fundamental na identificação dos diversos tipos celulares. A coloração não deve apresentar um tom azulado (Figura 01) e sim tom róseo (Figura 02).

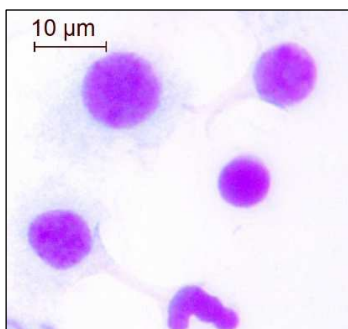


Figura 02 - Cultura de Linfócitos humanos com coloração azulada no aumento 1000x.

Diante disso, a cultura de linfócitos humanos é uma técnica que exige a padronização e experimentação dessas variáveis, desde a coleta de material até a preparação das lâminas e coloração.

Conclusões

Pequenos ajustes na concentração de fitohemaglutinina, quantidade de amostra adicionada nos frascos de cultura, adição de menores quantidades de fixador, ajuste do tempo de coloração, apresentaram êxito na padronização da cultura de linfócitos humanos e do teste do MN para esses tipos celulares, no Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental (LMMA), do DBC, da Universidade Estadual de Maringá. Apesar disso, é necessário padronizar o tratamento com agentes indutores de danos e ainda com outros compostos, para se certificar acerca da técnica de cultivo de linfócitos.

Agradecimentos

Agradeço ao Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental e todos os envolvidos por me oportunizar o desenvolvimento desse projeto, especialmente a orientadora Coordenadora Prof^a Dr^a Veronica Elisa Pimenta Vicentini e ao Coorientador Igor Vivian de Almeida, por todo o suporte. E ao CNPq pelo financiamento da bolsa.

Referências

COUNTRYMAN, P.; HEDDLE, J. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 41, n. 2-3, p. 321-331, 1976.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 2, p. 291-298, 1984.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 23-29, 2006.