

PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE SINCRONIZAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM GMA 32 ATRAVÉS DA RESTRIÇÃO DE SORO

Isabela Gonçalves da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Maria Aparecida Fernandez (Orientador), e-mail: aparecidafernandez@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá

Área: Ciências Biológicas II/Subárea: Citologia e Biologia Celular

Palavras-chave: Soro privação, linhagem GMA 32, fibroblastos de pulmão de hamster chinês

Resumo:

O estudo do ciclo de celular de linhagens cultivadas *in vitro* tem se mostrado muito eficiente para estudos de clonagem, testes de tratamento de células tumorais e também em avaliações toxicológicas de substâncias e fármacos. Para facilitar esses estudos, ter em mãos uma metodologia de sincronização celular permite que seja analisado os efeitos dos mesmos em fases específicas do ciclo celular. Algumas linhagens passam pelo processo de transformação, as quais tornam-se imortais e podem ser estudadas por longos períodos sem redução da viabilidade. No presente estudo, foram realizados testes de sincronização celular através da restrição de soro fetal bovino para as células, o qual teve sua porcentagem reduzida de 10% para 0,5%. Os resultados obtidos não foram os esperados, visto que esta metodologia apenas reduziu a velocidade do ciclo celular. Ensaios futuros serão necessários para se chegar a uma metodologia efetiva de sincronização para esta linhagem, utilizando-se uma concentração ainda menor de soro.

Introdução

O período de interfase no ciclo celular de células eucarióticas compreende três períodos: fases G₁, S e G₂. Este é um momento em que a célula se prepara para a divisão (fase M). A fase G₁ corresponde à síntese de RNAs, proteínas e organelas; a fase S, a duplicação do DNA e a fase G₂, além da célula voltar a síntese de macromoléculas e organelas, também ocorre a preparação para a divisão celular. Por fim, a fase M, na qual uma célula mãe dá origem a duas células filhas (ALBERTS *et al.*, 2011).

Em alguns modelos de estudos celulares é necessário realizar a sincronização, como por exemplo, em clonagens (GÓMEZ *et al.*, 2018), testes de tratamento de células tumorais e também em avaliações toxicológicas de substâncias e fármacos. As formas de sincronização são particulares para cada tipo de linhagem e deve ser

levado em consideração o tempo de duração do ciclo celular e o comportamento pós tratamento (LAUAND *et al.* 2015).

Células de mamíferos tendem a se inibir por contato estacionando na fase G_0 , devido ao bloqueio de fatores de crescimento (GÓMEZ *et al.*, 2018). A sincronização também é possível com uso de agentes químicos, os quais, atuarão em pontos específicos do ciclo (GÓMEZ *et al.*, 2018). Outra forma eficiente de sincronização, é a soro privação. Esta técnica reduz o fornecimento de nutrientes e fatores de crescimento à cultura celular, parando as células em G_0 .

Existem diversos modelos de linhagens celulares e algumas delas passam por processo de transformação. Tal ação aumenta a taxa de crescimento, altera a morfologia e o número de passagens torna-se ilimitado. A GMA 32, originada da linhagem CCL39 de fibroblastos de pulmão de hamster chinês, faz parte do grupo de linhagens transformadas (LIMA NETO *et al.*, 2016). Com intuito de aumentar os conhecimentos a respeito da linhagem GMA 32 e de propiciar uma metodologia para trabalhos futuros do ciclo celular, este estudo teve como objetivo testar e padronizar a metodologia de sincronização através do método de soro privação.

Materiais e métodos

As células foram cultivadas em meio de cultura completo – DMC (DMEM + 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) + Penicilina-Estreptomicina 50 U/mL(Gibco) + Vitamina 1x + MEM Neaa 1x (Non-essential Amino Acid, Gibco) e mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO_2 e 95% de umidade. O teste de sincronização da linhagem GMA 32 este estudo foi realizado com a técnica de soro privação. No primeiro (teste A), as células tiveram o meio substituído para DMC 0,5%. Neste meio, foram mantidas por 1, 2, 3, 4 e 5 dias. No segundo teste (teste B), as células foram cultivadas por 72 h a 0,5% de soro e, posteriormente, retornou-se ao DMC a 10%, sendo mantidas em placa por 06, 12, 24 e 48 horas. Para o grupo controle, as células foram mantidas em DMC 10% sem tratamento por 24 horas. Estas foram fixadas em etanol 70% gelado e mantido a 4 °C. As amostras foram coradas com Iodeto de propídio 5 $\mu g.mL^{-1}$. Foram analisados 10.000 eventos para cada tratamento. A análise dos dados foi conduzida no software Flowjo VX 10.

Resultados e Discussão

É apresentado na Tabela 1 as amostras que foram submetidas ao teste A. Considerando-se os tratamentos realizados, o maior valor encontrado em G_0/G_1 foi de 78,47% no terceiro dia, em S obteve-se 78% com 4 dias e G_2 com 24,1% em 1 dia. O menor resultado encontrado em G_0/G_1 foi no 4º dia de soro privação com 18,1%, para S 17,6% no segundo dia e G_2 0,014 no quinto dia.

Tabela 1 - Apresentação dos dados obtidos em porcentagem para o teste A

	Controle	1 dia	2 dia	3 dia
G_0/G_1	88,58	48,10	74,30	78,47
S	4,70	27,80	17,60	21,33
G2	6,71	24,10	8,00	0,18

* Células mantidas em tratamento de soro privação durante 1, 2 e 3 dias mantidas em meio de cultura suplementado com 0,5% de Soro Fetal Bovino.

Por mais que 3 dias de privação de soro tenham mostrado o maior valor para G_0/G_1 , no entanto, nos tempos seguintes (4 e 5 dias) foi possível observar que as células continuaram em crescimento, indicando que não houve o bloqueio do ciclo celular conforme o esperado. A privação de soro apenas desacelerou a proliferação celular. Quando comparado ao controle, os tratamentos tiveram valores significativamente inferiores para G_0/G_1 do que o encontrado na amostra controle (88,58%). Este alto valor de G_0/G_1 da amostra controle indicou que, apesar de ser uma linhagem transformada, ocorreu a inibição por contato, diferido do que é citado por Vitolo *et al.* (2015).

Na Tabela 2, é apresentado os dados obtidos para as células mantidas em 3 dias de restrição de soro com posterior retorno a 10% (teste B). Em 0 h é possível confirmar a não sincronização das células da linhagem GMA 32, devido à baixa quantidade de células em G_0/G_1 . A linhagem GMA 32, diferentemente de sua linhagem precursora (CCL39), não mostrou alta dependência de soro para sua proliferação (Pérez-Rodriguez *et al.*, 1982).

Tabela 2 - Apresentação dos dados obtidos em porcentagem para o teste B

	Controle	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
G_0/G_1	88,6	24,06	62,9	24,6	66,5
S	4,7	75,5	37	70,9	33,4
G ₂	6,7	0,42	0,09	4,5	0,04

* Células mantidas em tratamento de soro privação (0,5% SFB) durante 3 dias. Após esse período o cultivo foi voltado para a suplementação de 10 % do Soro Fetal Bovino e mantido nas placas por 0, 6, 12, 24 e 48 horas.

Por mais que as células não tenham sido sincronizadas com êxito, estes resultados permitem observar que esta linhagem possui um ciclo celular rápido, próximo às 15h encontradas por Pérez-Rodriguez *et al.* (1982) para a linhagem CCL39. Comparando-se o intervalo de 24 h entre os tempos 24-48 h, tempo médio do ciclo celular de uma célula de mamífero (ALBERTS *et al.*, 2011), pôde-se verificar que neste intervalo as células completaram aproximadamente um ciclo e meio.

Conclusões

É possível inferir, a partir dos dados obtidos, que esta metodologia de soro privação não se mostrou como um método eficiente para a sincronização desta linhagem celular. Futuros experimentos, com uma concentração ainda menor de soro, serão

necessários para se chegar a uma metodologia efetiva de sincronização para esta linhagem.

As amostras testadas com o retorno ao meio suplementado com 10% SFB apresentaram características de possível diminuição da viabilidade. Foi observado a formação de pequenos grumos, porém estes também podem ser decorrentes de erro de manuseio na hora da homogeneização e fixação das amostras. Portanto, para melhor análise e resultados mais certos, recomenda-se testes mais minuciosos com esta linhagem.

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores e amigos de laboratório pelo suporte durante o desenvolvimento do trabalho e ao CNPq pelo apoio a ciência na graduação.

Referências

ALBERTS, B., BRAY, D.; HOPKIN. K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da biologia celular. ArtMed Editora LTDA, Porto Alegre, 3 ed. 2011.

GÓMEZ, N. A.; RAMÍREZ, M. M.; RUIZ-CORTÉS, Z. T.; Primary Fibroblast Cell Cycle Synchrononization and Effects on Handmade Cloned (HMC) Bovine Embryos **Ciência Animal Brasileira.**, Goiânia, v.19, p. 1-17, 2018.

LAUAND, C.; NIERO, E.L.; DIAS, V. M.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cell cycle synchronization and BrdU incorporation as a tool to study the possible selective elimination of ErbB1 gene in the micronuclei in A549 cells. [s.l], **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.48, n.5, p. 382-391, 2015.

LIMA NETO, Q. A. DE, JUNIOR, F. F. D., BUENO, P. S. A., SEIXAS, F. A. V., KOWALSKI, M. P., KHEIR, E., KRUDE, T.; FERNANDEZ, M. A. Structural and functional analysis of four non-coding Y RNAs from Chinese hamster cells: identification, molecular dynamics simulations and DNA replication initiation assays. **BMC Molecular Biology**, [s.l], v. 17 n. 1, p. 1-9, 2016.

PÉREZ-RODRIGUEZ, R., FRANCHI, A., POUYSSÉGUR, J., & DEYS, B. F. Evidence that hamster fibroblast tumors emerge in nude mice through the process of two in vivo selections leading to growth factor “relaxation” and to immune resistance. **International Journal of Cancer**, France, v29, n.3, p. 309–314, 1982.