

Avaliação da Viabilidade e Proliferação Celular nas Linhagens HepG2 e MRC5 em Cultura Suplementada com Ferro

Lima M.¹ Machado M.² Bordin D.² Prá D.² Arigony AL.² Henriques JAP.²

(1) Bolsista IT FAPERGS, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. (2) PPG Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento essencial nos processos fisiológicos do organismo humano, desempenhando função central no metabolismo energético celular. Os níveis de ferro comumente usados em meios de cultura estão abaixo dos níveis fisiológicos do soro sanguíneo. A única fonte de ferro para as células em cultura provém da suplementação com soro. Meios de cultura contendo de 5-10% de soro fetal bovino (SFB) têm concentrações muito baixas de ferro, sugerindo que os meios de cultura tenham um perfil anêmico para o crescimento celular. A ausência de dados investigando e otimizando as concentrações de ferro para a viabilidade celular *in vitro*, gerou a hipótese de que a suplementação com ferro inorgânico (FI) ou holo-Transferrina (h-Tf) poderia aumentar a proliferação das culturas celulares.

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi analisar a influência de FI ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ou h-Tf em culturas celulares de fibroblastos pulmonares (MRC5) e hepatocarcinoma (HepG2) humanos, avaliando o efeito destes sobre a viabilidade e proliferação celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de células: As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 . Após o plaqueamento, as células foram cultivadas nos meios suplementados com diferentes concentrações de ferro (~7,0 uM), provenientes do FI ou da h-Tf, em triplicata, por um período de tratamento de 24h (agudo) ou $\geq 96\text{h}$ (crônico). Como controle negativo foi utilizado o meio DMEM com 10% de SFB, cuja concentração de ferro foi previamente determinada.

Viabilidade celular: Ambas as linhagens foram plaqueadas e incubadas com os diferentes tratamentos por 24h ou 96h. A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico baseado na redução de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo] ao composto formazan detectado em 540 nm.

Ensaio clonogênico: As células da linhagem MRC5 foram plaqueadas em uma densidade de 250 céls/poço e incubadas nos diferentes tratamentos por 24h ou 10 dias. Após este período, o número de colônias foi contado.

Tempo de duplicação da população de células (PDT): As células foram plaqueadas em uma densidade de 10^3 /poço e incubadas nos diferentes tratamentos de ferro durante 7 dias. Após este período as células foram contadas e o tempo de duplicação da população foi calculado.

RESULTADOS

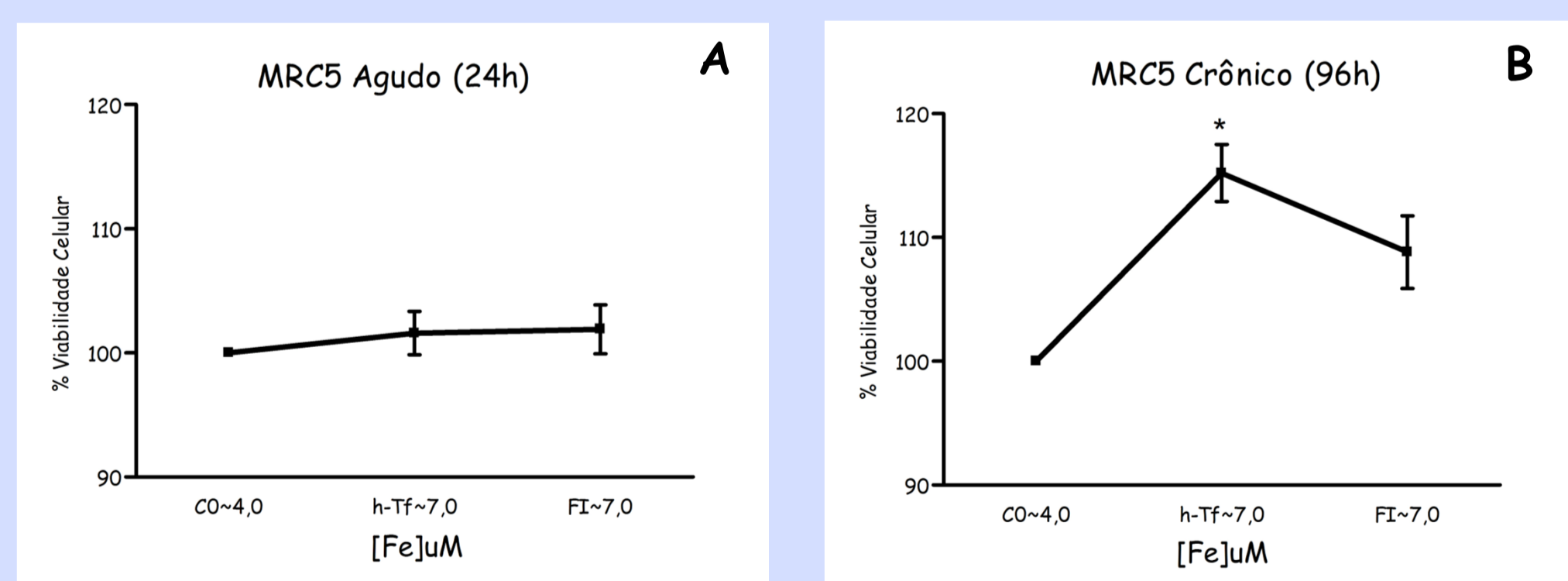


Figura1. Viabilidade celular para a linhagem MRC5 exposta aos diferentes tratamentos com ferro durante 24h (A) ou 96h (B), verificada através do ensaio MTT.

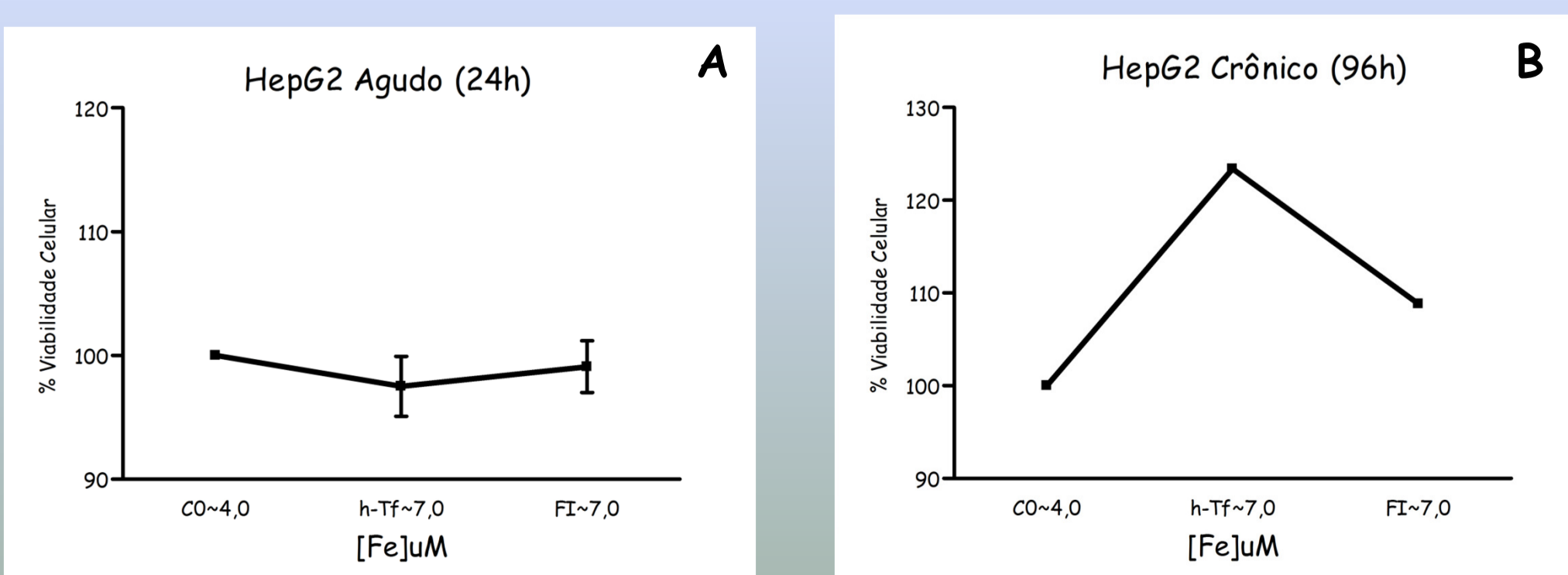


Figura2. Viabilidade celular para a linhagem HepG2 exposta aos diferentes tratamentos com ferro durante 24h (A) ou 96h (B), através do ensaio MTT.

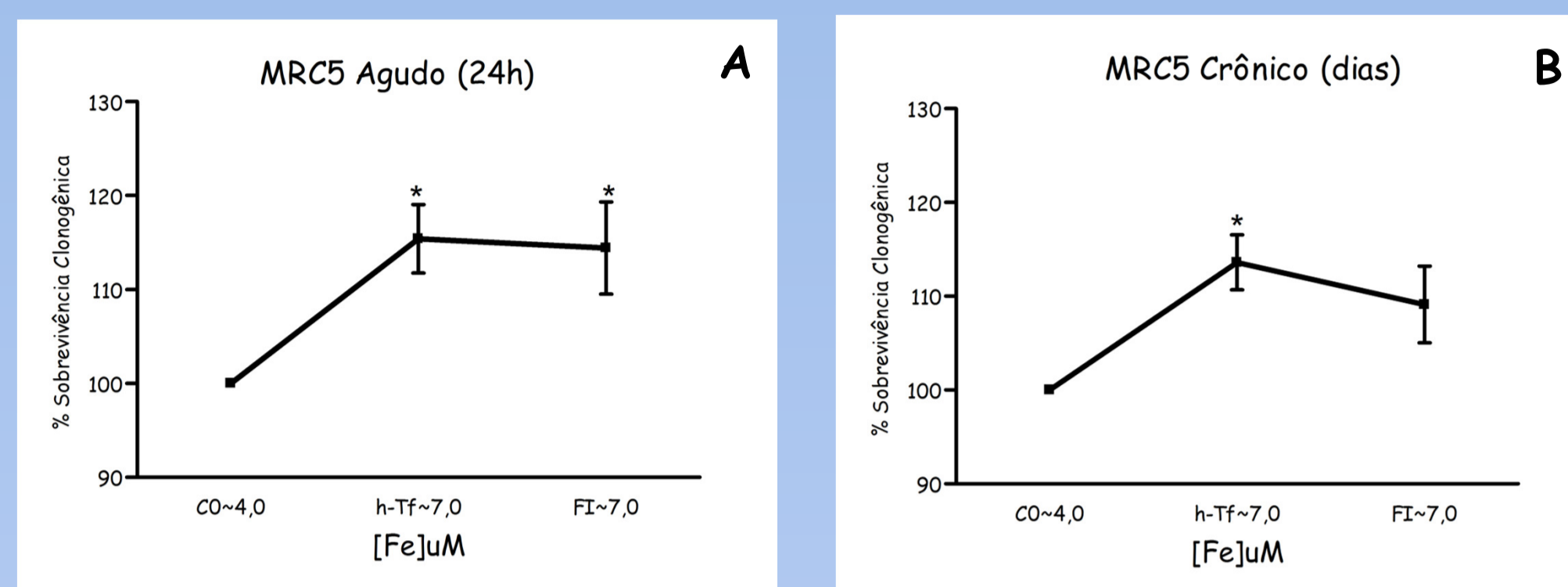


Figura 3. Ensaio clonogênico para a linhagem MRC5 exposta aos diferentes tratamentos com ferro durante 24h (A) ou 10 dias (B).

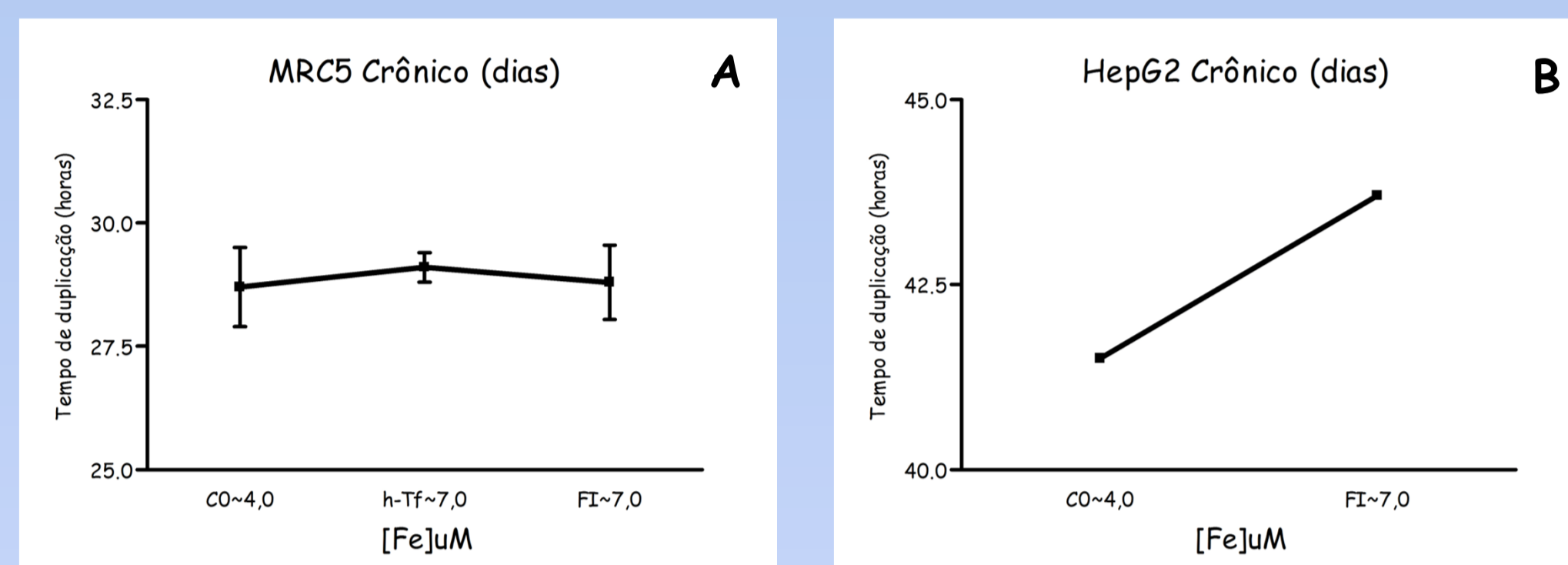


Figura 4. Tempo de duplicação da população (PDT) das linhagem MRC5 (A) e HepG2 (B) cultivadas em diferentes tratamentos com ferro durante 6 dias.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

- Os resultados preliminares demonstram que a suplementação com h-Tf foi capaz de aumentar a viabilidade das células MRC5, principalmente quando expostas ao tratamento crônico.

- No teste de redução de MTT, h-Tf demonstrou aumentar a viabilidade celular das MRC5, sendo que em 96h houve significância estatística em relação ao controle. Para HEPG2 os resultados ainda são inconclusivos para ambos os tratamentos e estudos complementares estão sendo realizados. No entanto, até o momento, é possível observar que, em tratamento agudo, existe tendência a um pequeno aumento da viabilidade nas células tratadas com FI enquanto em período de exposição crônica, h-Tf demonstra ter maior influência na viabilidade celular.

- No ensaio clonogênico, realizado apenas para MRC5, houve aumento na viabilidade, sendo que, no teste agudo, verificou-se inclusive, diferença estatística para ambos tratamentos. Para o período de exposição crônica, pelas h-Tf demonstrou significância estatística.

- Em relação ao PDT para MRC5, não foram observadas diferenças no tempo de duplicação da população celular em relação ao grupo controle em nenhum dos tratamentos empregados. Para a linhagem HepG2, novos testes se fazem necessários para complementação dos dados para análise.

- Contudo, com base nos resultados obtidos, é possível verificar que a suplementação do meio de cultura com concentração de ferro próximas a fisiológica, numa faixa de ~7,0 uM (de 6,0 uM a 8,0 uM) demonstra ser benéfica para a viabilidade das células, sendo que, no organismo *in vivo*, concentrações abaixo de 5,0 uM caracterizam anemia.

- Após os testes de viabilidade celular, pretende-se avaliar se a suplementação está gerando dano ao DNA ou se de alguma forma está interagindo com as vias de reparo, ou ainda, se pode contribuir com o aumento do estresse oxidativo nas células.

- Além disso, ainda são necessários mais estudos para definir qual a forma de ferro mais adequada para uma suplementação dos meios de cultura, se como sal inorgânico ou h-Tf.

- Mesmo que a demanda *in vitro* por micronutrientes seja distinta do organismo *in vivo*, quando se pretende mimetizar o microambiente celular para modelos de estudo, se deve levar em consideração essas variações e buscar adaptá-las para que os resultados finais sejam mais próximos dos reais.

Agradecimento: aos técnicos, analistas e gerência do Laboratório de Análises Regulatórias (LAR) do Regional Product Centre da Souza Cruz/BAT, pela quantificação de ferro nos meios de cultura e SBF.