

Nones, J. Contribuição da técnica de cultivo celular de mamíferos para o desenvolvimento de tecnologias médico-veterinárias. PUBVET, Londrina, V. 3, N. 3, Art#494, Jan 3, 2009.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=494>>.

Contribuição da técnica de cultivo celular de mamíferos para o desenvolvimento de tecnologias médico-veterinárias

Jader Nones

Médico Veterinário, CRMV-SC nº03608. Estudante de Doutorado do curso de Morfogênese Celular, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RESUMO

As primeiras observações de células foram feitas no século XVII, por Robert Hooke, na Inglaterra, e Anton Von Leeuwenhoek, na Holanda. Em meados de 1885, com os avanços deste conhecimento, Wilhem Roux estabeleceu o princípio da técnica de cultivo celular. Graças à contribuição desta metodologia, muitas tecnologias, com aplicações médico-veterinárias, puderam ser desenvolvidas. Dentre estes importantes avanços, destacam-se a produção de vacinas, a técnica de fertilização *in vitro*, a compreensão biomolecular da interação neurônio-glia, entre outras. Dada a importância da técnica, será realizada, neste trabalho, uma breve revisão sobre a contribuição que esta proporcionou para o desenvolvimento da área biotecnológica humana e animal nos últimos anos.

Palavras-chave: células, cultivo celular, biotecnologia, desenvolvimento, medicina veterinária

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

As primeiras observações de células foram feitas no século XVII, por Robert Hooke, na Inglaterra, e Anton Von Leeuwenhoek, na Holanda. Foi Robert Hooke que, ao examinar detalhes de uma placa de cortiça, verificou que esta era constituída por cavidades, às quais denominou de *cella* (REHEN & PAULSEN, 2007). Este termo, no latim, significa pequena cavidade ou gaiola. A *cella* ou as células são as menores unidades de matéria viva, capazes de se autoduplicar. Estas podem ser encontradas isoladamente, no seres unicelulares, ou formar arranjos ordenados, os tecidos, que constituem os seres pluricelulares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000). O avanço no conhecimento destas estruturas ocorreu concomitantemente ao desenvolvimento dos microscópios. À medida que aumentava a qualidade desse instrumento, aprendia-se cada vez mais sobre a organização celular e eram desenvolvidas, paralelamente, técnicas que facilitassem essa compreensão. Uma destas metodologias desenvolvidas foi o cultivo celular.

Cultivos celulares baseiam-se em um conjunto de procedimentos capazes de manter as células vivas *in vitro*, fazendo com que as mesmas consigam preservar ao máximo suas características fisiológicas, bioquímicas e genéticas.

O início da utilização desta técnica ocorreu em meados de 1885 por um pesquisador, chamado Wilhem Roux, o qual conseguiu fazer com que uma porção da medula de um embrião de galinha cultivado em meio a um tampão contendo salina sobrevivesse durante alguns dias. Desde então, tem sido grande o interesse pelos pesquisadores na tentativa de aprimorar cada vez mais este conhecimento.

1.2 Metodologias de cultivo

As células, quando cultivadas *in vitro*, podem crescer e se multiplicar em suspensão, como é o caso das células-tronco neurais (MOLINA-HOLGADO et al., 2007) ou aderidas em plásticos de cultivo, como no caso das células obtidas a partir de ovário de hamster chinês, conhecidas como CHO (Chinese hamster ovary) (SPEARMAN et al., 2005; LAI et al., 2003).

De acordo com a forma em que os cultivos são realizados, estes podem ser classificados como primários, secundários, explantes, ou de linhagens celulares. Culturas celulares primárias são provenientes de células que foram diretamente obtidas a partir de um organismo, as quais, depois de devidamente preparadas, são diretamente cultivadas em uma placa de cultura celular. Quando essas células são retiradas desta placa, através de uma técnica denominada de repique celular, e colocadas em outra placa, se estabelece uma nova cultura de células. Neste caso, após este procedimento, obtêm-se uma cultura secundária. Quando novamente o procedimento de repique celular é repetido, se obtém uma cultura terciária e assim sucessivamente, até a senescência das mesmas. Fragmentos de tecidos ou órgãos que, colocados em uma placa de cultivo, se aderem e mantêm suas células vivas durante alguns dias nessa condição, são denominados de explantes. Linhagens celulares são tipos específicos de células que já foram "acostumadas" a viverem no ambiente *in vitro* e que, por isso, conseguem sobreviver, se devidamente cultivadas, durante longos períodos de tempo. Muitas dessas linhagens podem, inclusive, serem geneticamente alteradas, para se adequarem melhor as condições *in vitro*. Diversas linhagens celulares já foram estabelecidas em laboratório, nas mais diversas áreas de estudo.

Um fator importante para o sucesso na realização de cultivos celulares está relacionado com o conhecimento das necessidades físico-químicas dos diferentes tipos de células. No entanto, a compreensão destas condições sempre foi um dos grandes desafios para a realização da técnica.

Variações no pH, na osmolaridade, concentração das substâncias, presença ou ausência de glicose, de fatores antioxidantes, fatores de crescimento, entre outros, são alguns dos exemplos que podem alterar a sobrevivência e o desenvolvimento celular *in vitro* (LEWINSKA et al., 2007). Condições específicas de temperatura e quantidade de gases também precisam ser consideradas para a realização de um adequado cultivo celular (YASUNO et al., 1981).

2 DESENVOLVIMENTO

Um dos primeiros grandes avanços clínicos obtidos graças à técnica de cultivo celular ocorreu nas décadas de 40 e 50, a qual possibilitou realizar a produção de extratos de vírus purificados e, por consequência, desenvolver e otimizar a produção de vacinas. O controle da poliomielite foi uma das primeiras vacinas produzidas pelos pesquisadores John Franklin Enders, Thomas Huckle Weller, e Frederick Chapman Robbins e obtidas devido aos conhecimentos dessa técnica. Desde aquela época, até os dias atuais, o cultivo celular ainda vem sendo utilizado para a produção de determinadas vacinas. Em 2006, o Instituto de Tecnologia do Paraná, por exemplo, começou a produzir uma vacina anti-rábica para imunizar animais utilizando a técnica de cultivo celular. Com ela tem sido possível a obtenção de uma vacina mais pura e capaz de induzir maior criação de anticorpos dos animais e, com isso, maior proteção.

Graças aos avanços no conhecimento da técnica de cultivo celular uma verdadeira revolução biológica também ocorreu no final da década de 1970, quando se conseguiu obter com sucesso, na Inglaterra, o primeiro bebê de proveta do mundo. Quatro anos depois, a área veterinária também deu um grande passo em direção ao futuro e iniciou sua revolução biotecnológica, ao conseguir obter o nascimento do primeiro bezerro a partir da técnica de cultivo e fertilização *in vitro* de embriões (BRACKETT et al., 1982 apud FREITAS et al., 2003).

Desde o nascimento do primeiro animal através da fertilização *in vitro* e do início das técnicas de transgenia, diferentes metodologias de maturação *in vitro* de oócitos, sua fertilização por espermatozoides capacitados *in vitro* e o cultivo em meio celular através de monocamadas ou meios definidos evoluíram. Com isso, essa biotécnica tem possibilitado, além da produção de animais transgênicos, estudos de clonagem e da preservação e multiplicação de animais de excelente nível genético (TRALDI et al., 2006).

Com os avanços de melhoramento genético, associados à técnica de produção *in vitro* de embriões, têm sido possível selecionar características de grande interesse econômico e se multiplicar essas características de forma vertiginosa quando comparado à velocidade determinada pelos padrões naturais de multiplicação dos animais (monta natural).

Graças à técnica de cultivo celular e fertilização *in vitro*, associadas ao melhoramento das técnicas de transfecção, muitos animais transgênicos puderam ser criados (HAMMER et al., 1985; KRIMPENFORT et al., 1991; WRIGHT et al., 1991; WALL ET al., 2005). A principal promessa no uso destes animais geneticamente modificados são pelo fato dos mesmos poderem ser utilizados para produção de substâncias farmacológicas. Com esta técnica é possível realizar alterações genéticas que alterem a quantidade ou a qualidade de determinado produto animal. Além disso, cientistas também têm pensado na realização da técnica de transgenia para a melhoria da qualidade de vida. Por exemplo, com ela já foi possível produzir animais que não sintetizam o glicídio lactose, o qual causa certo desconforto intestinal em pessoas que possuem dificuldade para digerir essa substância (JOST et al., 1999). A técnica também já permitiu aumentar a produção de substâncias com alto valor financeiro e/ou nutricional, como por exemplo, a caseína do leite, importante para a produção de queijos (BROPHY et al. 2003).

Com os avanços nessas áreas de pesquisa, em 1996, foi realizado a clonagem da ovelha Dolly a partir de células mamárias de uma ovelha adulta com cerca de seis anos de idade. Essa técnica, realizada através da transferência somática de núcleo, na cidade de Edimburgo, no interior da

Escócia, serviu para dar continuidade a essa revolução biotecnológica que vem ocorrendo nos últimos anos.

O cultivo celular tem contribuído também para a compreensão de como as células utilizam os mecanismos de organização, estruturação e a organogênese e, com isso, proporcionado uma maior compreensão sobre o que acontece com a organização celular quando alguma destas formas de expressão falha. Além disso, tem possibilitado criar maneiras de interferência nesses mecanismos, de forma a prevenir e/ou curar determinadas doenças. Muitas questões referentes às interações das células neurais entre si, seja neurônio-neurônio, ou ainda, neurônio com célula glial, e o entendimento de como células tumorais nervosas, especialmente glioblastomas, interagem com neurônios e como estes se comportam perante estas células tumorais já puderam ser respondidas através do emprego da técnica de cultivo celular (GOMES et al., 2001; ABREU et al., 1995; GIESE et al., 1995). Esta metodologia também possibilitou identificar fatores envolvidos na regulação de diversos mecanismos biológicos (FREIRE et al., 2004; SOUZA et al., 2004; DE SAMPAIO E SPOHR et al., 2002; GOMES et al., 1999;), bem como tem permitido testar a eficácia de novas drogas *in vitro*, como é o caso atual do uso das células-tronco embrionárias (POUTON & HAYNES, 2005; AHUJA et al., 2007; THOMSON et al., 2007).

Células de mamíferos mostraram ter potencial elevado como veículo para produção de biofármacos biologicamente ativos, muitos dos quais, devido à complexidade da sua estrutura, não podem ser produzidos por outros tipos celulares, como bactérias e leveduras. Estas células são as únicas capazes de sintetizar proteínas com todos os elementos pós-traducionais necessários à sua atividade biológica *in vivo*. Através da utilização do cultivo de linhagens celulares, a área de engenharia de proteínas tem produzido fármacos fundamentais para o controle de diversas patologias. Estes normalmente são produzidos em grande escala através da realização de cultivos em bioreatores (PRENTICE et al., 2007). Dentre os biofármacos mais produzidos, encontra-se

a insulina, interferon, o hormônio do crescimento e a eritropoetina (FOX et al., 2005; BOUNEMRA-BEM et al., 1997).

A partir da década de 80, cultivos celulares, associados às técnicas de engenharia genética, permitiram o desenvolvimento de células contendo genes recombinantes e surgiu, a partir daí, a produção de biofármacos recombinantes. As células mais comumente utilizadas na produção de biofármacos são as células CHO (SPEARMAN et al., 2005; LAI et al., 2003). O gene da eritropoetina, por exemplo, foi clonado e transfectado em células CHO, as quais, através do seu cultivo, sintetizam esse hormônio, o qual é importante para estimular a produção de hemácias. (FANDREY et al., 1992) O fator inibidor de leucemia, conhecido como LIF, também vem sendo produzido a partir das células CHO geneticamente modificadas para maximizar a produção dessa substância (MING-TANG et al., 2006). O LIF, por exemplo, é um fator utilizado, entre outras coisas, para a manutenção das células-tronco embrionárias de camundongo em cultura.

Futuramente, o cultivo celular provavelmente também despontará como uma grande ferramenta de aplicação clínica através da realização de terapias celulares, tanto em animais, quanto na clínica humana, uma vez que poderá favorecer o tratamento de diversas doenças, muitas delas consideradas incuráveis até o momento, incluindo distrofias musculares, lesões medulares e isquêmicas, acidentes vasculares cerebrais, traumas cranianos, doenças hepáticas, renais, auto-imunes, cegueira, câncer etc. Estas patologias apresentam grande potencial regenerativo e, por esse motivo, poderão, hipoteticamente, ser curadas através do uso associado das técnicas de cultivo e terapia celular (GOYA et al., 2007; JOANNIDES & CHANDRAN, 2008).

É importante destacar que, dentre as vantagens da realização de cultivos celulares em pesquisa, estão o controle preciso das culturas e a homogeneidade das amostras obtidas. No entanto, alguns problemas existem com relação a sua utilização. O principal deles é pelo fato de que a aplicação dos conhecimentos obtidos *in vitro* nem sempre podem ser transferidos para o modelo *in vivo*. Estes últimos, por serem mais complexos e por envolverem

diferentes mecanismos desconhecidos e não controlados, acabam muitas vezes apresentando uma resposta diferente da observada nas células cultivadas em laboratório. Outra desvantagem diz respeito ao custo de produção destes tecidos *in vitro*, que é muito mais dispendioso do que a produção do mesmo no próprio animal. Também devido ao fato de que muitas células, quando cultivadas em laboratório, apresentarem alterações genéticas importantes, como por exemplo, aneuploidia.

Ainda com relação aos aspectos econômicos, é importante ressaltar que, embora os custos de produção de tecidos *in vitro* são caros, esta técnica se torna viável economicamente ao se pensar em testes toxicológicos, onde se podem economizar substâncias, uma vez que as quantidades requeridas são muito mais baixas. Eticamente, também é mais aceito pela sociedade e pelos cientistas se realizar pesquisas *in vitro* do que em um modelo animal e/ou humano.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo celular recebeu grande impulso por ter sido verificado que poderia ser viabilizado sob condições artificiais. Por todo o potencial de aplicação que este representa para a espécie humana e animal, como pela sua expressividade tanto para a ciência básica quanto para a aplicada, tem sido muito difundido e utilizada em diversos modelos de pesquisa e de aplicação clínica, inclusive no Brasil.

Felizmente, diversos avanços relacionados a essa técnica já foram realizados e muitos estão em andamento. No entanto, ainda existe um longo caminho a ser percorrido no intuito de se compreender melhor quais são as condições mais eficazes de se realizar esses cultivos, na tentativa de se aperfeiçoar cada vez mais as condições do mesmo.

No livro "Admirável mundo novo", uma ficção escrita por Aldous Huxley, os bebês eram cultivados em laboratório e, de acordo com os meios de cultivo em que eram mantidos, podiam dar origem a pessoas com determinadas

Nones, J. Contribuição da técnica de cultivo celular de mamíferos para o desenvolvimento de tecnologias médico-veterinárias. *PUBVET*, Londrina, V. 3, N. 3, Art#494, Jan 3, 2009.

características e finalidades específicas. Talvez chegará o dia em que os cultivos celulares estarão tão avançados que a ficção de Huxley venha a se tornar realidade.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. G.; CAVALCANTE, L. A.; MOURA NETO, V. Differential patterns of laminin expression in lateral and medial midbrain glia. **Neuro Report**, v.6, p.761-764, 1995.

AHUJA, Y. R., V. VIJAYALAKSHMI e K. POLASA. Stem cell test: a practical tool in toxicogenomics. **Toxicology**, v.231, n.1, Feb 28, p.1-10, 2007.

TRALDI, A. S. Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. **III FEINCO** - 17/03/2006. Departamento de Reprodução Animal – FMVZ/USP, SP – Brasil.

BOUNEMRA-BEN, G. A.; CHERIF, W.; LAMBIN, P.; JENHANI, F.; BOUKEF, K. A human recombinant erythropoietin produced in human lymphoblastoid cells. **J Pharm Belg.**, v.52, p. 177-80, 1997.

BROPHY, B., SMOLENSKI, G., WHEELER, T., WELLS, D., L'HUILLIER, P., LAIBLE, G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. **Nat Biotechnol.**, v.21, p.157–162, 2003.

DE SAMPAIO E SPOHR, T. C. L.; MARTINEZ, R.; FEDEROWICZ, E. S.; MOURA-NETO, V.; GOMES, F. C. A. Neuron-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-b1. **European Journal of Neuroscience**, v.16, p.2059-2069, 2002.

FANDREY, J. K.; JELKMANN, W. E. Chemical structure, biotechnical production and clinical use of recombinant erythropoietin. **Z Gesamte Inn Med.**, v. 47, p.231-8, 1992.

FREIRE E.; GOMES, F. C. A.; JOTHA-MATTOS, T.; MOURA NETO, V.; COSTA E SILVA, F.; COELHO-SAMPAIO, T. Sialic acid residues on astrocytes regulate neuritogenesis by controlling the assembly of laminin matrices. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 4067-4076, 2004.

FREITAS, C.P.; MARTINS JR., A.; BRACKETT, B.G.; TAKADA, L.; VENTUROLI, S.H. Aumento da produção de embriões bovinos após maturação de ovócitos com r-EGF, Rev. **Bras. Reprod. Anim.**, v.27, n.3, p.400-402, 2003.

FOX, S. R.; TAN, H. K.; TAN, M. C.; WONG, S. C.; YAP, M. G.; WANG, D. I. A detailed understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon-gamma by Chinese-hamster ovary cells. **Biotechnol Appl Biochem.**, v.41, p.255-64, 2005.

GIESE, A.; RIEF, M. D.; TRAN, N. L.; BERENS, M. E. Specific attachment and migration of human astrocytoma cells on human but not murine laminin. **Glia**, v.13, p.64-74, 1995.

GOMES, F.C. A.; SPOHR, T.C.L.S.; MARTINEZ, R.; MOURA NETO, V. Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. **Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.611-620, 2001.

Nones, J. Contribuição da técnica de cultivo celular de mamíferos para o desenvolvimento de tecnologias médico-veterinárias. *PUBVET, Londrina, V. 3, N. 3, Art#494, Jan 3, 2009.*

GOMES, F. C. A.; MAIA, C. G.; MENEZES, J. R. L.; MOURA NETO, V. Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. **Glia**, v. 25, p. 247-255, 1999.

GOYA, R. L.; KUAN, W. L.; BARKER, R. A. The future of cell therapies in the treatment of Parkinson's disease. **Expert Opin Biol Ther**, v.7, p.1487-98, 2007.

HAMMER, R. E.; PURSEL, V. G.; REXROAD, C. E.; WALL, R. J.; BOLT, D. J.; EBERT, K. M. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. **Nature**, v. 315, p. 680-683, 1985.

HUXLEY, A. Admirável Mundo Novo. São Paulo, **Globo**, 2000.

JOANNIDES, A. J.; S. CHANDRAN. Human embryonic stem cells: An experimental and therapeutic resource for neurological disease. **J Neurol Sci**, v.265, n.1-2, p.84-8, 2008.

JOST, B.; VILOTTE, J. L.; DULUC, I.; RODEAU, J. L.; FREUND, J. N. Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. **Nat Biotechnol.**, v.17, p.160-164, 1999.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. **Guanabara Koogan**, 540 p., 2004.

KRIMPENFORT, P.; RADEMAKERS, A.; EYESTONE, W.; VAN DER SCHANS, A.; VAN DEN BROEK, S.; KOOIMAN, P. Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. **Biotechnology**, v.9, p. 844-847, 1991.

LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v.34, p.781-6, 2007.

MING-TANG L.; YONG, J.; SHUM-MEI, W.; YONG-MINGL, L.; FANG, W.; XIA, C.; HONG, Y.; TONG-HOI, M. cDNA Cloning, Prokaryotic and Eukaryotic Expression and Characterization of Porcine Leukemia Inhibitory Factor. **Chem. Res. Chinese U.**, v. 22, p. 145-149, 2006.

MOLINA-HOLGADO F.; RUBIO-ARAIZ, A.; GARCIA-OVEJERO, D.; WILLIAMS, R. J.; MOORE, J. D.; AREVALO-MARTIN, A.; GOMEZ-TORRES, O.; MOLINA-HOLGADO, E. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. **EUA J Neurosci**, v.25, p.629-634, 2007.

POUTON, C. W.; HAYNES, J. M. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. **Adv Drug Deliv Rev**, v.57, n.13, p.1918-34, 2005.

PRENTICE, H.L.; EHRENFELS, B.N.; SISK, W.P. Improving performance of mammalian cells in fed-batch processes through "bioreactor evolution". **Biotechnol Prog.**, v.23, p. 458-64, 2007.

REHEN, S. K.; PAULSEN, B. Células-tronco embrionárias. O que são? Para que servem? Rio de Janeiro. **Vieira e Lent**, 90 p., 2007.

SOUSA, V. O.; ROMÃO, L.; MOURA NETO, V.; GOMES, F. C. A. GPAP gene from astrocytes from distinct brain regions is distinctly modulated by TGF- β 1. **European Journal of Neuroscience**, v.19, p. 1721-1730, 2004.

SPEARMAN, M.; RODRIGUEZ, J.; HUZZEL, N.; BUTLER, M. Production and glycosylation of recombinant beta-interferon in suspension and cytopore microcarrier cultures of CHO cells. **Biotechnol Prog.**, v. 21, p.31-9, 2005.

THOMSON, H. Bioprocessing of embryonic stem cells for drug discovery. **Trends Biotechnol**, v.25, n.5, p.224-30, 2007.

Nones, J. Contribuição da técnica de cultivo celular de mamíferos para o desenvolvimento de tecnologias médico-veterinárias. PUBVET, Londrina, V. 3, N. 3, Art#494, Jan 3, 2009.

WALL, R. J.; POWELL, A. M.; PAAPE, M. J.; KERR, D. E.; BANNERMAN, D. D; PURSEL, V.G. Genetically enhanced cows resist intramammary taphylococcus aureus infection. **Nat Biotechnol.**, v.23, p. 445-451, 2005.

WRIGHT, G.; CARVER, A.; COTTOM, D.; REEVES, D.; SCOT, A.; SIMONS, P. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. **Biotechnology.**, v.9, p.830-834, 1991.

YASUNO, H.; SOTOMATSU, S.; MAEDA, M.; SATO, M.; NISHIMURA, A.; MATSUBARA, M. Organ culture of adult human skin; effect of culture temperature. **J Dermatol.**, v.8, p. 267-75, 1981.

LAI, D.Z.; FU, L.; YU, C. M.; QI, L. Q.; WENG, S. J.; YU, T.; WANG, H. T.; CHEN, W. Construction of an anti-apoptosis CHO cell line for biopharmaceutical production. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.**, v.19, p. p. 322-6, 2003.