

ASPECTOS BÁSICOS DAS LINHAGENS CELULARES MAIS UTILIZADAS CULTURE CHARACTERISTICS OF SOME CELL LINES

*Edna Bertini**
*Astréa Mennucci Giesbrecht***
*Szulim Zyngier***

RESUMO: são apresentados alguns aspectos básicos das linhagens celulares mais utilizadas nos nossos laboratórios de pesquisas. Quatro linhagens de origem humana e três linhagens de origem animal são descritas quanto à sua obtenção, meio de congelamento, meio de cultura, características de crescimento e morfologia.

UNITERMOS: HeLa, Av₃, HEP-2, Mc Coy, LLC-MK₂, BHK-21, SIRC.

SUMMARY : Some basic aspects of the main cell line cultures are described.

KEY WORDS: HeLa, HEP-2, Mc Coy, LLC-MK₂, BHK-21, SIRC, AV₃

INTRODUÇÃO

O emprego de cultura de células tem-se revelado um importante fator no desenvolvimento de diversos ramos da Ciência, principalmente da Citologia, Virologia e Oncologia. Estudos morfológicos e bioquímicos podem ser realizados com rapidez e facilidade, o que justifica a ampla utilização dessa técnica em diferentes áreas de pesquisa. Devido ao crescente uso de culturas de células por laboratórios de pesquisa de nossas instituições científicas resumimos informações sobre as principais linhagens celulares que podem ser obtidas em nosso meio.

DESCRIÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

A) CÉLULAS DE ORIGEM HUMANA

1) HeLa

a) Histórico:

HeLa foi a primeira linhagem de células humanas a proliferar em meio de cultura. Foi obtida em 1951 de uma paciente de cor negra, Helen Lane, a qual estava em tratamento por carcinoma de colo de útero. Este fato, revolucionário para a ocasião, foi conseguido por George Otto Gey². A partir de 1961 essa linhagem passou a fazer parte da coleção de culturas do ATCC.¹

b) Meio de congelamento:

Meio mínimo de Eagle (80%), soro de vitelo (15%) e Glicerol (5%).

c) Meio de cultura e características de crescimento:

Meio mínimo de Eagle com base Earle ou Hanks (90%) e soro de vitelo (10%).

Um inóculo de 0,5 a 1,0 x 10⁵ células viáveis/ml em meio a 37°C e atmosfera de CO₂ (5%) e ar (95%), multiplica-se 15 vezes em aproximadamente 7 dias. O tempo de geração (duplicação) é de 25 a 30 horas.

d) Morfologia:

Células do tipo epitelial.

Observação: A linhagem HeLa 229 deriva da anterior, da qual difere principalmente pela sua relativa resistência a poliovírus.

2) AV₃

a) Histórico:

Essa linhagem foi obtida em 1956 por F. C. Hobbins e M. I. Lepow a partir de células amnióticas humanas. Atualmente tem sido bastante utilizada para uma variedade de estudos em Virologia.

b) Meio de congelamento:

Meio 199 (75%), soro fetal bovino (25%) e glicerol (5%).

c) Meio de cultura e características de crescimento:

* Pós-graduanda de Farmacologia da USP, Secção de Cultura de Células do Lab. de Quimioterapia e Toxicologia.

** Docentes do Lab. de Quimioterapia e Toxicologia do Depto. de Farmacologia da USP.

Meio 199 (80%) e soro fetal bovino (20%).

Um inóculo de $1,0 \times 10^5$ células viáveis/ml em meio acima, à temperatura de 37°C e em atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de ar, multiplica-se 10-15 vezes em 7 dias.

d) Morfologia:

Células do tipo epitelial.

3) HEP-2 (Fig. 1)

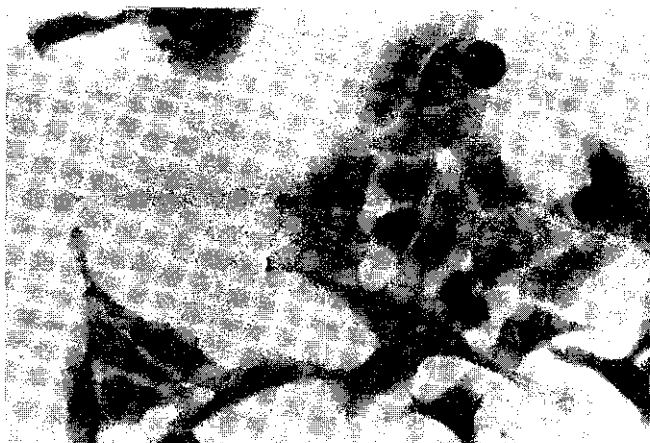


Fig. 1 - Cultura de células HEP-2. Células do tipo epitelial. Aumento de 400 vezes. Notam-se fases de mitoses em algumas células. Cultura obtida no Lab. de Cultura de Tecidos do Depto. de Farmacologia da USP.

a) Histórico:

A linhagem HEP-2 foi estabelecida em 1952 por A. E. Moore, L. Sabachevsky e H. W. Toolan⁶ a partir de tumores obtidos de ratos após injeção de células de carcinoma de laringe humana.⁷ Essa linhagem foi incluída no ATCC a partir de 1961.

b) Meio de congelamento:

Meio de Eagle (80%), soro de vitelo (15%) e glicerol (5%).

c) Meio de cultura e características de crescimento:

Meio de Eagle com base Earle ou Hanks (90%) e soro de vitelo (10%).

Um inóculo de $1,0 \times 10^5$ células viáveis/ml multiplica-se em aproximadamente 5 a 6 dias. O tempo de geração é de 26 horas.

d) Morfologia:

Células do tipo epitelial.

4) Mc Coy

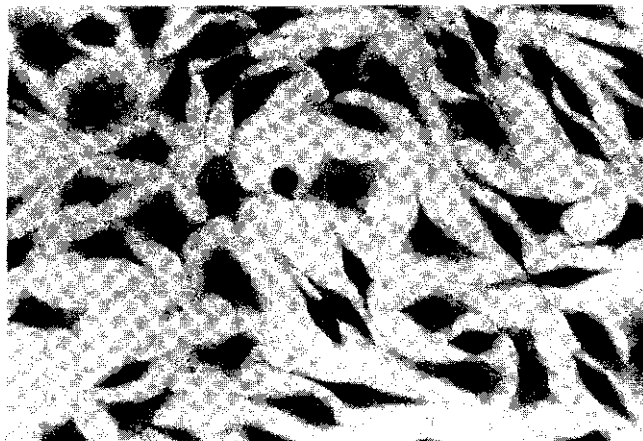


Fig. 2 - Cultura de células Mc Coy. Células do tipo fibroblasto. Aumento de 400 vezes. Lab. de Cultura de Tecidos do Depto. de Farmacologia da USP.

a) Histórico:

A linhagem Mc Coy foi obtida em 1976 por Darongar a partir de células sinoviais humanas.

b) Meio de congelamento:

Meio mínimo de Eagle (80%), soro de vitelo (15%) e glicerol (5%).

c) Meio de cultura:

Meio mínimo de Eagle (90%) e soro de vitelo (10%).

d) Morfologia:

Células do tipo fibroblasto.

B) CÉLULAS DE ORIGEM ANIMAL

1) LLC-MK₂

a) Histórico:

A linhagem celular LLC-MK₂ foi obtida em 1956 por R. N. Hull, W. R. Cherry e I. S. Johnson a partir de rim de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*).³ Essas células são suscetíveis a uma variedade de vírus como enterovírus, rinovírus e adenovírus. A linhagem LLC-MK₂ original foi adaptada ao meio 199 com 1,68g/ml de bicarbonato e 1% de soro de cavalo. Nessas condições essas culturas possuem crescimento lento. Afim de aumentar a velocidade de crescimento, o meio acima foi substituído por meio mínimo de Eagle (95%) suplementado com soro de vitelo (5%). As células

desenvolvidas nesse meio guardam as mesmas características da linhagem original e foram classificadas pelo ATCC como LLC-MK₂ derivada.

b) Meio de congelamento:

Meio de Eagle (80%), soro de vitelo (15%) e glicerol (5%).

c) Meio de cultura e características de crescimento:

Meio mínimo de Eagle com base Earle (95%) e soro de vitelo (5%).

Um inóculo de 0,5 a 1,0 x 10⁵ células viáveis/ml no meio acima à temperatura de 37°C e em atmosfera de CO₂ (5%) e ar (95%), multiplica-se aproximadamente 10 vezes em 7 dias.

d) Morfologia:

Células do tipo epitelial.

2) BHK-21

a) Histórico:

A linhagem celular BHK-21 foi isolada em 1961 por I. A. Macpherson⁵ a partir de rim de hamster (*Mesocricetus auratus*) recém-nascido.

b) Meio de congelamento:

Meio de Eagle modificado (60%), soro de vitelo (20%), caldo de triptose fosfato (10%) e DMSO (10%).

c) Meio de cultura e características de crescimento:

Meio de Eagle modificado (80%), soro de vitelo (10%)

e caldo de triptose fosfato (10%).

Um inóculo de 4 x 10⁵ células viáveis em 8 ml de meio de cultura em atmosfera de CO₂ (5%) resulta em 1,5 x 10⁶ células viáveis em 4 dias. O tempo de geração é de aproximadamente 12 horas.

d) Morfologia:

Células do tipo fibroblasto.

3) SIRC

a) Histórico:

A linhagem celular SIRC foi obtida em 1957 por M. Volkert a partir de córnea de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Em 1965, J. Leerhoy verificou sua susceptibilidade ao vírus da rubéola.⁴ Essa linhagem pode ser utilizada para o isolamento e doseamento do referido vírus.

b) Meio de congelamento:

Meio descrito abaixo (90%) e DMSO (10%).

c) Meio de cultura e características de crescimento:

Solução de Earle com 10% de soro de vitelo inativado, hidrolizado de lactoalbumina (1,7 g/l), extrato de levedura Difco (0,57 g/l) e NaHCO₃ (0,84 g/l).

Um inóculo de 4,0 x 10⁵ células viáveis/ml resulta em 2,5 x 10⁶ células em 7 dias. O meio deve ser substituído por meio novo no 3º dia.

d) Morfologia:

Células do tipo fibroblasto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. *Registry of animal cell lines*, certified by Cell Culture Collection Committee. Rockville, 1964. (Inclui suplemento: 1st, 1965, 2nd, 1967, 3rd 1968) p. CCL2, 7, 10, 21, 23, 60, 71.
2. GEY O. G.; COFFMAN W. D. & KUBICEK M. T. - Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*, 12: 264, 1952.
3. HULL R. H.; CHEREY W. R. & JOHSON J. S. - The adaptation and maintenance of mammalian cells to continuous growth in tissue culture. *Anat. Rec.*, 124: 490, 1956.

4. LEERHOY Y. Cytopathic effect of rubella virus in a rabbit-cornea cell line. *Science*, 149: 633-634, 1965.
5. MACPHERSON I. A. & STOKER M. Polyoma Transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*, 16: 147-151, 1962.
6. MOORE A. E.; SABACHEWSKY L. & TOOLAN H. W. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.*, 15: 598-605, 1955.
7. TOOLAN H. W. Transplantable human neoplasm maintained in cortisonetreated laboratory animals: HS-1; HEp-1; HEp-2; HEp-3; and H. Emb. Rh-1. *Cancer Res.*, 14: 660-673, 1954.