

---

# Caracterização de Linhagens Celulares I. Verificação de espécie de origem. Análise dos padrões de migração da enzima LDH e cariótipo

---

Mayla LEANDRO\*, Aurea Silveira CRUZ

Núcleo de Cultura de Células – Centro de Procedimentos Interdisciplinares – Instituto Adolfo Lutz

\*Programa Institucional Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq)

---

As linhagens celulares têm apresentado ampla aplicação em diversas áreas da saúde, como virologia, bacteriologia, toxicologia, genética, entre outras, por isso é essencial que elas sejam certificadas, já que usar células com identificação errada, contaminada por outras, ou por micro-organismos, pode levar a conclusões equivocadas e invalidar todo o trabalho.

A certificação envolve uma série de metodologias que fornecem dados indispensáveis sobre as características das células, como a presença de contaminantes microbiológicos, morfologia, citogenética, suscetibilidade a diferentes agentes virais, além da comprovação da espécie animal e tecido de origem. Com o objetivo de garantir a qualidade das culturas de células do NCC-IAL, este estudo vem sendo realizado, implantando metodologias reconhecidas para a identificação da espécie de origem de linhagens celulares, utilizando duas técnicas: eletroforese de isoenzimas e cariótipo.

A determinação do padrão de isoenzimas é baseada na existência de enzimas com especificidades idênticas ou similares ao substrato, mas diferentes estruturas moleculares, apresentando padrões de mobilidade que são específicos para cada espécie<sup>1,2</sup>. Neste estudo, a enzima utilizada

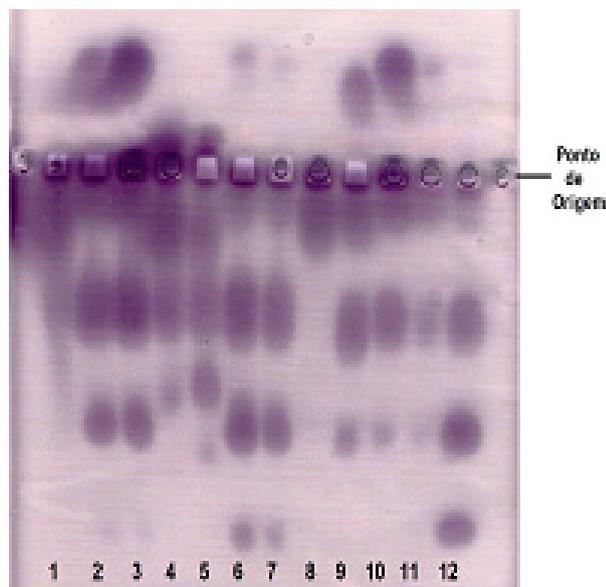
foi a lactato desidrogenase (LDH) em eletroforese horizontal com gel de agarose 2%. As bandas foram reveladas com solução de coloração composta por lactado de sódio, MTT e PMS. Nesta técnica, foram utilizadas linhagens celulares de diferentes espécies animais, tais como: humanas (HeLa, RD, MRC-5, NCI-H292 e Caco-2), camundongo (NCTC clone 929), coelho (SIRC), bovina (MDBK), macaco (FRhK-4 e Vero), hamster (BHK-21/13S) e canina (MDCK).

O cariótipo permite conhecer o número de cromossomos, verificar a presença de cromossomos marcadores característicos e alterações citogenéticas durante o período de cultivo da linhagem celular. Neste ensaio, foram utilizadas as linhagens celulares de origem humana (HeLa e RD), camundongo (NCTC clone 929), coelho (SIRC) e macaco (Vero).

Para obtenção das metáfases, as linhagens na fase exponencial de crescimento foram cultivadas por 4 a 6 horas com solução de colchicina na concentração final de 0,08 µg/ mL. Após este período, as células em metáfase foram lisadas com solução hipotônica (KCl 0,075 M), os cromossomos fixados com solução de metanol/ ácido acético na proporção de 3:1. A suspensão celular obtida foi pingada em lâminas histológicas previamente

lavadas. As metáfases foram coradas com solução de Giemsa a 0,5%, capturadas por câmera acoplada ao microscópio óptico e o número de cromossomos registrados<sup>4,5</sup>

Na Figura 1, pode-se observar os padrões de migração da enzima LDH obtidas na eletroforese. Comparando-se com a literatura, verifica-se que a maioria das linhagens celulares analisadas apresentaram a mesma posição e número de bandas. As outras apresentaram pequenas variações com relação ao número e/ou direção de migração. A linhagem Vero, de rim de macaco, apresentou 4 bandas, mas na literatura são citadas 5 bandas<sup>1,4,5</sup>. Nas linhagens celulares de origem humana, espera-se a presença de 5 bandas e isto foi observado para a maioria das linhagens analisadas, com exceção das linhagens NCI-H292 e CaCo<sub>2</sub>, que apresentaram, respectivamente, 3 e 4 bandas, todas migrando para o pólo positivo. A linhagem celular MDCK, de rim de cachorro, apresentou 4 bandas, diferentemente do encontrado na literatura, na qual verificam-se estudos descrevendo a presença de 5 ou 3 bandas<sup>1,4</sup>.



**Figura 1.** Eletroforese para aisoenzima LDF nas seguintes linhagens celulares: NCTC done 929 (1), HeLa (2), RD (3), SIRC (4), MDBK (5), FrhK (6), MRC-5 (7), BHK-21/13S (8), MDCK (9), Vero (10), NCI-H292 (11) e CaCo<sub>2</sub> (12)

Na Tabela 1, pode-se observar os resultados obtidos para as linhagens analisadas. Comparando-se estes resultados com os dados da literatura, observa-se que a linhagem NCTC clone 929 e Vero apresentaram aproximadamente os mesmos valores modais. Nas outras linhagens celulares, este valor não foi o mesmo, mas apresentou pouca variação<sup>1</sup>.

**Tabela 1.** Número de metáfases obtidas nas diferentes linhagens celulares, número mínimo e máximo de cromossomos por metáfase e seus respectivos números modais

Linhagem celular	Metáfases analisadas	Número mín. e máx.	Número modal
NCTC clone 929	128	36-83	66-67
RD	45	54-90	85
Vero	51	51-166	58-63-64
HeLa	50	66-91	78
SIRC	50	36-66	63

Com base nestes resultados, verifica-se que estas técnicas, após uma melhor padronização, podem ser usadas na autenticação das linhagens celulares pertencentes ao acervo do Núcleo de Cultura de Células, NCC-IAL.

## AGRADECIMENTOS

Ana Cristina Scarparo de Miranda, Cláudia Regina Gonçalves e Tamiko I. Ikeda pelo desenvolvimento das técnicas de eletroforese e cariótipo.

## REFERÊNCIAS

1. ATCC quality control methods for cell lines. 2. ed. Rockville: American Type Culture Collection; 1992.
2. Stacey GN, Bolton BJ, Doyle A. DNA fingerprinting transforms the art of cell authentication. *Nature*. 1992;357:261-2.
3. Montes de Oca F, Macy ML, Shannon JE. Isoenzyme characterization of animal cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1969;132:462-9.
4. Fernandes MJB, Simoni IC. Caracterização de linhagens celulares: I- Identificação de espécies por análise isoenzimática. *Arq Inst Biol*. 1995;62(1/2):59-63.