

## ANÁLISE DE DOIS PROTOCOLOS DE CULTURAS CELULARES PARA ESTUDOS COM MATRIZ MULTIELETRODO

AMANDA FERREIRA NEVES<sup>1a</sup>, MAURÍLIA MARTINS DE OLIVEIRA<sup>2b</sup>, SUÉLEN MOREIRA MARQUES<sup>3a</sup>, JOÃO BATISTA DESTRO-FILHO<sup>4</sup>, ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA-LACERDA<sup>5</sup>, CELINA MONTEIRO DA CRUZ LOTUFO<sup>6</sup>

**RESUMO:** Muitas células animais podem ser estudadas sob culturas, mantendo suas características fisiológicas originais. As culturas estabelecidas diretamente de tecidos de um organismo são denominadas culturas primárias. Culturas de células primárias imortalizadas, ou seja, com modificações genéticas que lhes conferem a capacidade de multiplicar-se indefinidamente, são denominadas de linhagem celular. Ambos os tipos de culturas podem ser utilizados em pesquisas de eletrofisiologia neural, por exemplo, com diferentes abordagens. Este trabalho propôs comparar o protocolo de uma cultura primária padrão de estudo em matriz multieletrodo com o protocolo de uma cultura de linhagem de glioblastoma, à luz de critérios tais como procedimentos, materiais e reagentes necessários para implementação e manutenção das culturas. Diante das especificidades de cada cultura, concluímos que compete ao pesquisador escolher a cultura mais adequada ao seu experimento, já que essas culturas possuem praticamente os mesmos custos de implementação.

**PALAVRAS-CHAVE:** cultura neural primária, cultura de linhagem, glioblastoma humano, matriz multieletrodo.

<sup>1</sup> Graduação em Ciências Biológicas - UFU, Campus Umuarama, Uberlândia - MG, <[amanda.nvs@gmail.com](mailto:amanda.nvs@gmail.com)>.

<sup>2</sup> Graduação em Biomedicina - UFU, Campus Umuarama, Uberlândia - MG, <[mauriliaoliveira@yahoo.com.br](mailto:mauriliaoliveira@yahoo.com.br)>.

<sup>3</sup> Graduação em Engenharia Elétrica - UFU, Campus Santa Mônica, Uberlândia - MG, <[sueletrica@gmail.com](mailto:sueletrica@gmail.com)>.

<sup>4</sup> Docente da Faculdade de Engenharia Elétrica - UFU, Bloco 1E, Uberlândia - MG, <[jbdestro@ufu.br](mailto:jbdestro@ufu.br)>.

<sup>5</sup> Docente do Instituto de Ciências Biológicas - UFG, Goiânia - GO, <[lislacerda@yahoo.com.br](mailto:lislacerda@yahoo.com.br)>.

<sup>6</sup> Docente do Instituto de Ciências Biomédicas - UFU, Bloco 2A, Uberlândia - MG, <[celotufu@icbim.ufu.br](mailto:celotufu@icbim.ufu.br)>.

<sup>a</sup> Bolsistas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

<sup>b</sup> Bolsistas pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

## **ANALYSIS OF TWO PROTOCOLS OF CELLULAR CULTURES FOR STUDIES WITH MULTIELECTRODE ARRAYS**

**ABSTRACT:** Many animal cells can be studied under culture, maintaining their unique physiological characteristics. Cultures which are established directly from organism tissues are called primary cultures. Immortal primary cell cultures or else genetically modified cells that have the ability to multiply for an indefinite period are called "cell line". Both cultures can be used, for example, in neural electrophysiology researches with different approaches. This paper proposed to compare a standard protocol of primary culture studied in multielectrode arrays with a cell line culture of glioblastoma, under criteria such as procedures, equipment and reagents needed for implementation and maintenance of cultures. Considering the specificities of each culture, we suggest that it is up to the researcher to choose what kind of culture is the most appropriate for his/her experiment, since the implementation costs are nearly the same.

**KEYWORDS:** primary neural culture, cell line culture, human glioblastoma, multielectrode array.

## 1. INTRODUÇÃO

Em condições adequadas, a maioria das células pode viver, se reproduzir e até mesmo expressar suas propriedades em uma placa de cultura, ou seja, *in vitro* (ALBERTS et al., 2006). As culturas de células animais são realizadas a partir do isolamento de células de tecidos vivos, que são adicionadas em placas de cultivo contendo meio nutritivo (COOPER & HAUSMAN, 2007).

As culturas estabelecidas diretamente de um tecido vivo são denominadas culturas primárias. Quando as células das culturas primárias preenchem toda a superfície da placa, parte delas deve ser removida e colocada em uma nova placa para haver a expansão celular. Esse processo é chamado de “repique” e a cultura dele derivada recebe, por alguns autores, a denominação de “cultura secundária” (ALBERTS et al., 2006). Outro tipo de cultura é aquela de linhagem, a qual é formada por células geneticamente modificadas, que se proliferam indefinidamente, porém conservando

características genóticas e fenóticas do tecido de origem (COOPER & HAUSMAN, 2007).

Existem diferentes tipos de células animais utilizadas em culturas, das quais pode-se destacar os neurônios, células especiais capazes de restabelecerem conectividade *in vitro*, semelhante àquela presente no tecido vivo. Assim é possível estudar aspectos da comunicação entre neurônios como, por exemplo, os impulsos elétricos emitidos (potenciais de ação) por meio de biossensores (LAKARD et al., 2005; GRISCOM et al., 2002).

Toda essa discussão envolve principalmente profissionais ligados à pesquisa na área biomédica. Paralelamente, pesquisadores em Engenharia Biomédica desenvolvem mecanismos nanotecnológicos que traduzem um impulso nervoso de um neurônio em informação para circuitos eletrônicos, efetuando um registro digital destes potenciais de ação e, ainda, possibilitando controlar esse impulso local através do conceito de “neuromodulação controlada” (FROMHERZ, 2003). Um exemplo desses nanodispositivos é a matriz

multieletrodo (MEA), na qual é possível estimular e fazer a aquisição de sinais elétricos a partir de culturas neurais, de maneira não-destrutiva (POTTER & DE-MARSE, 2001).

A matriz multieletrodo, desde o seu desenvolvimento nos anos 70, é considerada como uma tecnologia potencialmente útil para estudos de processamento de informações em redes do sistema nervoso (MERCER & WHITE, 1978). As MEAs representam circuitos de dimensões micrométricas (Figura 1) montados sobre um substrato transparente integrado a um número de 10-100 microeletrodos de 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, geralmente (RUTTEN, 2002).

A principal característica de uma MEA é o intercâmbio bidirecional de informação que ela proporciona, no qual atua como uma interface bioeletrônica, do mundo biológico com o eletrônico, onde células neurais são cultivadas sob um microcircuito elétrico (RUTTEN, 2002). Essa situação oferece um ambiente controlado no qual as células vão se aderir a partir de moléculas de adesão conhecidas, possibilitando seu monitoramento constante por um

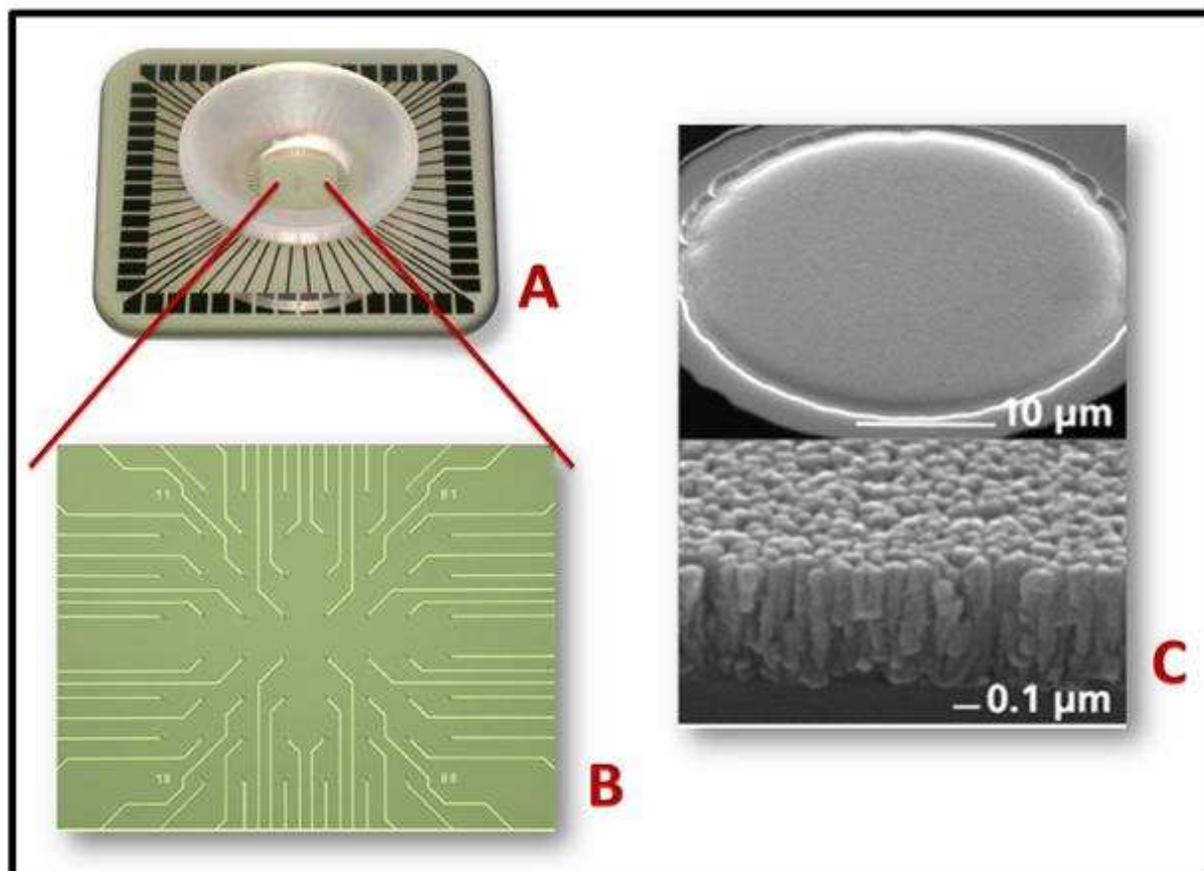
período de dias a semanas (CLAVEROL-TINTURÉ et al., 2005).

A tecnologia da MEA é comumente utilizada para estudar a atividade e a plasticidade do sistema nervoso durante o desenvolvimento das redes neurais em culturas celulares ou em fatias cerebrais (RUTTEN, 2002; RUTTEN et al., 2001). Isso é possível a partir da aquisição de potenciais elétricos extracelulares, visando à análise de aglomerados, pequenos grupos de células neurais (FREEMAN, 2000).

A tecnologia da MEA pode ser aplicada em qualquer tecido eletrofisiológico, ou seja, que exibe características elétricas, por exemplo, neurônios, cardiomiócitos e células musculares. Uma aplicação prática da MEA são os neuroimplantes, dispositivos protéticos que controlam e ou substituem as funções de um tecido danificado no sistema nervoso (LAKARD et al., 2005; GRISCOM et al., 2002). Além disso, a MEA constitui um sistema *in vitro* ideal para monitorar os efeitos de drogas e toxinas, promovendo conclusões importantes sobre a atuação bioquímica específica para o estudo

também de novos fármacos (POTTER & DE-MARSE, 2001). Ao mesmo tempo, a MEA também permite monitorar facilmente o desenvolvimento da morfologia das células, já que possui um substrato

transparente, adequado para se fazer visualizações em microscópios invertidos, de fluorescência, confocal ou de varredura dupla (POTTER & DE-MARSE, 2001).



**Figura 1.** A- Foto de uma matriz multieletrodo (MEA) sem a cultura. B- Substrato da MEA destacando os microeletrodos ao centro. C- Micrografia dos eletrodos dispostos sobre o substrato, indicando suas dimensões (MULTI CHANNEL SYSTEMS, 2005).

Muito embora as novas opções de culturas baseadas em linhagem celular imortal já incluam alguns tipos de neurônios, os experimentos atuais em MEA utilizam quase sempre

culturas primárias de neurônios (FROMHERZ, 2003; NOVELINO et al., 2003; RUTTEN, 2002; POTTER, 2001). Na montagem dessas culturas, vários animais são sacrificados a fim de se

obter células suficientes para um experimento. Deve-se destacar ainda que uma cultura primária é inviável por longos períodos (NOVELINO et al., 2003), geralmente não sobrevivendo por mais de dois meses, mesmo em ambiente limpo de estufa (POTTER, 2001). Tais culturas são, portanto, descartadas e assim novos animais devem ser sacrificados para montar outro experimento, gerando um prejuízo tanto em termos bioéticos (quantidade de animais sacrificados), quanto em termos econômicos, incluindo-se também o próprio tempo despendido pelos pesquisadores.

Atualmente grupos de pesquisa que estudam as respostas neuronais, via MEA, ainda utilizam a cultura primária de neurônio (NOVELINO et al., 2003; POTTER, 2001). Como essas células não sobrevivem mais do que algumas semanas, as culturas são descartadas e os procedimentos iniciais de extração devem ser refeitos freqüentemente para manter a pesquisa (ALBERTS et al., 2006). Dessa maneira, deve-se destacar que a atual abordagem de culturas MEA exige vários animais, acarretando

muito tempo de preparo e maiores custos com materiais e reagentes.

É necessário, então, encontrar novas possibilidades para a implementação dessa cultura como as linhagens de células imortalizadas, que permanecem viáveis por vários anos, o que agiliza o processamento dos resultados e reduz os custos de preparo. Somada a isso, a utilização de culturas associadas a outros tipos de células neurais, por exemplo as células da glia (células de suporte dos neurônios), implica também em novas investigações fisiológicas, as quais podem gerar resultados mais coerentes com o contexto biológico envolvido na atividade dos neurônios.

## **1.1 Objetivos**

O objetivo desse trabalho foi comparar dois tipos principais de protocolos de culturas, analisando as principais semelhanças e diferenças existentes entre estes. Ao final da comparação foi possível confrontar as diferentes abordagens e, portanto, visualizar aquelas que são mais coerentes com as questões bioéticas e com o contexto brasileiro de pesquisa.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

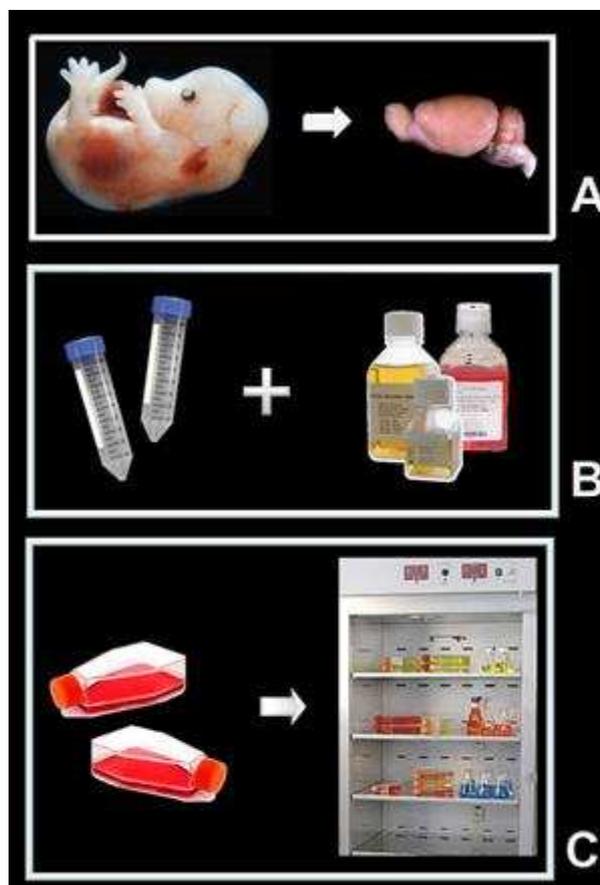
Neste trabalho, foram abordados dois tipos principais de protocolos de culturas: uma cultura primária de neurônios e uma cultura de linhagem de células gliais. É importante destacar que as culturas de linhagem de glioblastoma não são utilizadas em MEA, visto que são células da glia e não participam diretamente dos impulsos elétricos emitidos pelos neurônios. Porém, estudando seu protocolo, é possível extrapolar o conhecimento adquirido acerca dos procedimentos, materiais e reagentes para os diferentes tipos de culturas de linhagens neuronais já existentes.

### 2.1 Cultura Primária de Neurônios

#### (A) Origem das células

São utilizados neurônios do córtex e do hipocampo cerebral, obtidos de seis a oito embriões de ratos Wistar em seu 18º dia de desenvolvimento (NOVELINO et al., 2003). Os procedimentos para a preparação do protocolo dessa cultura estão resumidos na Figura 2. Os materiais e reagentes utilizados em

cada etapa de preparação da cultura primária de neurônios estão em destaque na Tabela I.



**Figura 2.** Resumo esquemático da preparação da cultura primária de neurônios (NOVELINO et al., 2003). A- Etapa de dissecação: os cérebros de cada embrião são extraídos para então isolar os tecidos corticais e hipocampo. B- Etapa de dissociação: os tecidos são tratados três vezes com soluções enzimáticas e com meio nutritivo. C- Etapa de manutenção: as células e o meio nutritivo são adicionados em recipientes de cultura, os quais serão armazenados em estufas.

**TABELA I**  
 **Materiais e Reagentes Utilizados na Cultura Primária**

	<b>Dissecação</b>	<b>Dissociação</b>	<b>Manutenção</b>
<b>Materiais</b>	• Oito Ratos	• Eppendorf	• Microscópio óptico
	• Tesoura peq.	• Centrífuga	• Estufa úmida
	• Fórceps peq.	• Fluxo laminar	• Fluxo laminar
	• Placas-de-Petri	• Recipiente de cultura	
	• Fluxo laminar	• Pipeta	
	• Banho-maria		
	• Pipeta		
<b>Reagentes</b>	• Solução salina HBSS	• Tripsina (enzima)	• Meio Neurobasal
		• Meio Neurobasal	• B-27 e Glutamax-1
		• Soro fetal bovino	• Ara-C

*(B) Dissecação*

Os embriões são retirados de uma ou mais ratas grávidas. As partes do cérebro que serão utilizadas são removidas com a ajuda de um fórceps afiado e, em seguida, são cortadas em pedaços menores (NOVELINO et al., 2003). Todo o procedimento de dissecação ocorre em ambiente esterilizado, como aquele de uma capela de fluxo laminar (Figura 2a).

*(C) Dissociação*

Nessa etapa, o córtex e o hipocampo de cada cérebro passam por diversos momentos de digestão enzimática e subsequente maceração (NOVELINO et al., 2003). Esse procedimento é importante para que as células sejam isoladas, permitindo maior homogeneidade na amostra final, onde a concentração de células

deve ser  $8 \cdot 10^5$  neurônios/mL (Figura 2b).

#### (D) *Manutenção*

A cultura é mantida em uma estufa umedecida a  $37^\circ\text{C}$ , com atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ . O meio nutritivo é trocado a cada quatro dias por meio fresco e o cultivo das células é realizado em monocamada, com inibição do crescimento de células da glia (NOVELINO et al., 2003). Os experimentos são executados somente após duas semanas (Figura 2c).

## 2.2 Cultura de Linhagem de Glioblastoma

Glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais comum de tumor maligno no cérebro, de difícil tratamento efetivo e se caracteriza pelo crescimento anormal de células gliais (MENDONÇA et al., 2005). O GBM tem origem nos astrócitos, células da glia responsáveis por diversos mecanismos de filtração sanguínea, que protegem o cérebro (AVGEROPOULOS, 2001).

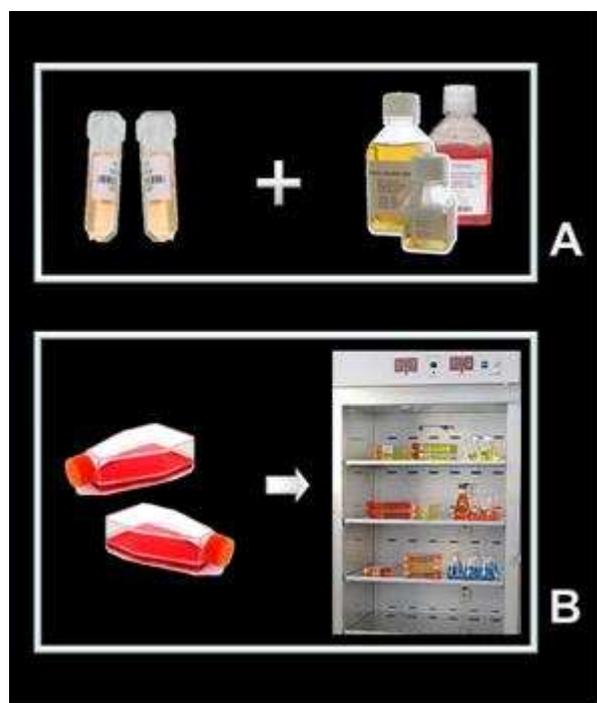
A partir de um glioblastoma maligno de um homem de 33 anos,

pesquisadores isolaram e estabeleceram duas linhagens de células: a M059J e a M059K (ALLALUNIS-TURNER et al., 1993). As duas linhagens foram retiradas concomitantemente do mesmo tumor e se diferem principalmente em relação às suas sensibilidades para radiação ionizante e em quimioterápicos (BELENKOV et al., 2002). A partir disso, ambas as linhagens celulares representam um modelo útil para estudar o desenvolvimento e a replicação de células tumorosas (ATCC, 2009).

#### (A) *Origem das células*

São utilizados glioblastomas da linhagem M059J obtidas da ATCC® comercialmente (ATCC, 2009). Como as células de linhagem M059J já foram estabelecidas anteriormente e podem ser comercializadas, as etapas de dissecação e dissociação não são realizadas para esta cultura. No entanto, como as células são adquiridas congeladas, existem outras etapas como descongelamento, expansão celular e manutenção da cultura. A Figura 3 resume os procedimentos para a preparação dessa cultura e a Tabela II mostra os

materiais e reagentes utilizados em cada etapa de preparação da cultura.



**Figura 3.** Resumo esquemático dos procedimentos para a preparação da cultura de linhagem M059J (ATCC, 2009). A- Etapa de descongelamento: as células compradas são descongeladas, passando por um processo de climatização o qual consiste em adicionar meio nutritivo algumas vezes para lavar as células. B- Etapa de manutenção: as células e o meio nutritivo são adicionados em recipientes de cultura, os quais serão armazenados em estufas.

#### *(B) Descongelamento*

Nessa etapa as células passam por um processo de retirada do meio de congelamento. Logo após elas

serão distribuídas em novos recipientes com novos meios de cultura e suplementos (Figura 3a).

#### *(C) Manutenção*

A cultura é mantida em estufa umedecida a 37°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. O meio nutritivo é trocado a cada dois ou três dias (Figura 3b). Para os experimentos, foram utilizadas culturas em crescimento, de três dias a uma semana após a preparação (DALPIZZOL & RITTER, 2003).

### **2.3 Análise dos Protocolos**

Os protocolos foram comparados entre si seguindo os critérios descritos a seguir.

#### *(1) Aspectos Procedimentais*

Foi analisado o grau de dificuldade/simplicidade para a realização das etapas de cada procedimento. Além disso, avaliou-se o intervalo de tempo estimado para efetuar todas as etapas.

#### *(2) Representatividade Fisiológica da Cultura:*

Para cada cultura, discutiu-se a sua flexibilidade para viabilizar diversos tipos de estudos, ou seja, se haveria outras maneiras ou outros experimentos para estudar essas células, além daqueles em que são utilizadas normalmente.

*(3) Custos de Implementação:*

Neste critério foram discutidas as questões referentes à quantificação de animais, aquisição das células de linhagem e reagentes utilizados. Além disso, também foi considerada a infraestrutura e a mão-de-obra necessárias ao laboratório, para cada uma das culturas.

*(4) Viabilidade da Cultura:*

Foi analisado o tempo de vida útil para cada cultura, ou seja, sua durabilidade para a realização de experimentos. Somado a isso, foi avaliado a facilidade/dificuldade de se manter a cultura viva por um período maior de tempo.

*(5) Aspectos Bioéticos:*

Discutiu-se a burocracia e a possibilidade de realizar experimentos com cada cultura, no que diz respeito aos comitês de bioética animal e humana.

*(6) Biossegurança:*

Neste critério foi analisado o grau de risco à vida do operador durante a realização dos experimentos, adicionado à facilidade de utilização dos equipamentos necessários.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Aspectos Procedimentais**

O estabelecimento da cultura primária de neurônios é complexo, pois envolve as etapas de dissecação do animal, de dissociação do tecido obtido, além da etapa de manutenção das células. A etapa de dissecação requer do pesquisador um adequado conhecimento anatômico do animal utilizado no experimento e uma habilidade especial para se extrair o tecido de interesse. A implementação deste tipo de cultura é demorada e por isso, os experimentos são executados somente após duas semanas.

Por outro lado, a implementação da cultura de linhagem estabelecida é mais simples, uma vez que envolve somente as etapas de descongelamento e manutenção das células adquiridas. Devido a essa facilidade, os experimentos podem ser realizados de três dias a uma semana após o estabelecimento da cultura.

Além disso, as células de linhagem são imortalizadas. Dessa forma, existe um crescimento exponencial dessas células, enquanto que a cultura primária teria um limite máximo para o número de células em proliferação, as quais começariam a morrer, mesmo em meio nutritivo adequado.

**TABELA II**  
**Materiais e Reagentes Utilizados na Cultura de Linhagem**

	<b>Descongelamento</b>	<b>Manutenção</b>
<b>Materiais</b>	• Células de glioblastoma M059J	• Garrafa de cultura
	• Banho-maria	• Pipeta
	• Pipeta	• Microscópio óptico
	• Eppendorf	• Estufa úmida
	• Centrífuga	• Fluxo laminar
	• Fluxo laminar	
<b>Reagentes</b>	• Tripsina (enzima)	• Meio DMEM ou Ham's F-12 suplementado com sais e aminoácidos
	• Solução salina EDTA	• Soro Fetal Bovino

### **3.2 Representatividade Fisiológica da Cultura**

Tanto a cultura primária de neurônios como a cultura de linhagem

de glioblastoma podem viabilizar diversos tipos de estudos, dependendo do fenômeno que se deseja investigar. A cultura de linhagem, por exemplo, pode ser útil em pesquisas celulares

que frequentemente necessitam de grandes quantidades de células, visto que células de linhagem têm a propriedade de proliferar por tempo indefinido. Porém, essas células, quando injetadas em animais susceptíveis, podem causar tumores. Outra desvantagem é que como as culturas de linhagem são geneticamente modificadas, as características apresentadas pela cultura não correspondem necessariamente às características fenotípicas das células *in situ*. Nesse sentido, a cultura primária pode ser mais útil, uma vez que é mais estável, em relação à manutenção das características fenotípicas do que alguns tipos de linhagens geneticamente modificadas com características neoplásicas. Ademais, a cultura primária é mais eficaz em experimentos em que se deseja avaliar os efeitos da injeção de células em um animal, sem o risco acentuado do desenvolvimento de tumores.

Portanto, dependendo do objetivo do experimento, ambas as culturas podem ser aplicadas na produção de vacinas anti-virais, no estudo da imunologia, em ensaios de

fármacos e cosméticos *in vitro* ou na compreensão de fenômenos de neoplasia (ALBERTS et al., 2006).

### 3.3 Custos de Implementação

Conforme podemos observar nas tabelas I e II, os dois protocolos citam materiais e reagentes semelhantes para fazer a cultura. No entanto, a cultura primária de neurônios necessita de alguns materiais diferentes e de uma quantidade maior de reagentes, uma vez que seu procedimento é mais longo e trabalhoso. Além disso, na cultura primária também existe a necessidade de comprar os animais necessários para o experimento e ainda há um custo para mantê-los (alimentação, limpeza, armazenamento em locais específicos, infra-estrutura). Então, em experimentos que necessitam de pequenas quantidades de células, a cultura primária apresenta-se mais viável, visto ser necessário a compra de poucos animais, ficando o valor total de implementação mais barato que o da cultura de linhagem. No entanto, se o experimento requer muitas células, a cultura primária é desvantajosa, uma vez que a compra

de um grande número de animais eleva o seu custo. Nesse caso, a cultura de linhagem é mais viável.

### **3.4 Viabilidade da Cultura**

Tanto as linhagens celulares quanto as células da cultura primária podem ser estocadas em temperatura de nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , por um período indefinido e continuarem viáveis, quando descongeladas (ATCC, 2009; ALBERTS et al., 2006). Entretanto, o tempo médio de vida útil de uma cultura primária de neurônios é de dias a semanas, enquanto que uma cultura de linhagem de glioblastoma pode ser mantida por meses ou anos (NOVELINO et al., 2003; BELENKOV et al., 2002).

### **3.5 Aspectos Bioéticos**

Para a realização de pesquisas com culturas primárias é necessária a aprovação do comitê de ética da instituição, visto que as células são retiradas diretamente de tecidos animais. No caso de células retiradas diretamente do paciente humano, além da aprovação do comitê de ética, é preciso que o paciente ou um familiar

assine um termo de consentimento. Para trabalhos com culturas de linhagens celulares, esses aspectos burocráticos não são necessários, pois as células são adquiridas de um banco de células e não diretamente de animais ou de pacientes. Assim, as culturas com células de linhagem facilitam os estudos com células humanas.

### **3.6 Biossegurança**

Em qualquer tipo de experiência laboratorial o pesquisador está exposto a riscos biológicos, físicos e químicos, devendo estar atento a utilização dos equipamentos de proteção individual (luvas, jaleco, calçados fechados) e coletivos (por exemplo, capelas de fluxo laminar). Experimentos com animais para a obtenção da cultura primária exigem uma atenção maior do pesquisador a fim de se evitar mordidas, arranhaduras, estresse e fuga do animal. Já para experiências realizadas com culturas de linhagens, basta seguir as normas padrão de biossegurança.

**TABELA III**  
**Comparação Entre as Características Principais das Culturas**

<b>Critério</b>	<b>Cultura Primária de Neurônios</b>	<b>Cultura de Linhagem M059J</b>
<b>A</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento complexo e demorado</li> <li>• Exige conhecimentos na anatomia do animal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimento simples, as células já estão prontas</li> </ul>
<b>B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células mantêm as características fenotípicas</li> <li>• Crescimento limitado e pouca durabilidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células geneticamente modificadas por neoplasia</li> <li>• Crescimento exponencial e de longa duração</li> </ul>
<b>C</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior gasto com reagentes</li> <li>• Gastos para manter animais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto custo com a compra das células</li> </ul>
<b>D</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vida útil de dias a meses</li> <li>• Pode ser estocada a <math>-196^{\circ}\text{C}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vida útil de meses a anos</li> <li>• Pode ser estocada a <math>-196^{\circ}\text{C}</math></li> </ul>
<b>E</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células animais: aprovação do comitê de ética</li> <li>• Células humanas: comitê de ética e termo de consentimento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células adquiridas em um banco de células</li> <li>• Facilitam os estudos com células humanas</li> </ul>
<b>F</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipamentos de proteção individual e coletiva</li> <li>• Atenção com os animais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipamentos de proteção individual e coletiva</li> </ul>

Comparando-se os dois protocolos foi possível constatar que a viabilidade e o menor custo de implementação da cultura dependem do experimento a ser realizado. Assim, a cultura primária fica mais barata que a de linhagem quando poucas células são necessárias para se realizar os procedimentos, ao passo que a cultura de linhagem é mais viável quando o

estudo requer uma grande quantidade de células.

As células da cultura primária são mais frágeis e por isso possuem um tempo de vida menor. Devido a isso, existe a necessidade de se repetir os procedimentos toda vez que uma cultura for descartada, ocasionando em maiores gastos com animais, materiais e reagentes. Enquanto isso, na preparação da cultura de linhagem

economiza-se reagentes, uma vez que estas células foram geneticamente modificadas para aumentar sua vida útil.

Outro fator agravante nos custos da cultura primária é a compra e a manutenção dos animais que serão utilizados para o fornecimento das células. Para qualquer estudo que necessite de animais, podem existir empecilhos com o comitê de ética, que exigem dos pesquisadores a observância de uma série de normas para a execução dos experimentos, como redução do número de animais e conforto desses em laboratórios. Tais exigências são muito mais brandas para as culturas com células de linhagem.

Além dos custos financeiros, é importante também discutir o tempo de preparação e de repouso das culturas antes dos experimentos, porque protocolos mais rápidos agilizam as pesquisas. A cultura primária, neste caso, possui maior tempo tanto de preparação quanto de repouso, uma vez que existem mais procedimentos de preparação. Além disso, esses procedimentos são relativamente mais complexos que aqueles da cultura de

linhagem, pelo fato do pesquisador necessitar de habilidades e de estudos aprofundados da anatomia do animal, o que pode retardar os experimentos.

Considerando a preparação das culturas, em qualquer laboratório, é necessário seguir algumas normas de biossegurança. Essas normas dependem do nível de risco dos reagentes utilizados. Através da análise dos dois protocolos, verificou-se então que ambos possuem um nível de risco semelhante e relativamente pequeno, embora o pesquisador esteja mais exposto a ferimentos durante a manipulação dos animais.

#### **4. CONCLUSÕES**

Este trabalho discutiu as diferentes abordagens de dois protocolos de culturas celulares para então visualizar aquelas mais simples, econômicas e que sejam coerentes com as questões bioéticas. Para isso, estabeleceram-se alguns critérios de análise: 1) aspectos procedimentais, 2) representatividade fisiológica da cultura, 3) custos de implementação, 4) viabilidade, 5) aspectos bioéticos e 6)

biossegurança. A Tabela III compara de maneira sintética as principais características da cultura primária de neurônios com a cultura de linhagem de glioblastoma M059J, de acordo com os critérios estabelecidos acima.

Ambas as culturas são amplamente utilizadas e possuem grande importância nos estudos científicos atuais, cada uma com sua especificidade. Entretanto, estão surgindo novas obrigações para os estudos com culturas celulares e cada vez mais as culturas de linhagem assumem o espaço das culturas primárias. Do outro lado, são poucos os tipos celulares existentes como linhagem e não se sabe ao certo se será possível imortalizar todas as células animais existentes, por isso as culturas primárias ainda são amplamente utilizadas. Portanto, compete a cada pesquisador estudar as características da cultura desejada para então escolher uma que seja adequada aos objetivos e aos recursos financeiros do seu experimento.

Por fim, em termos do critério de representatividade, ambas as culturas

podem ser utilizadas em diversos experimentos. A cultura de linhagem glioblastoma, ao contrário da cultura primária de neurônios, não pode ser usada na MEA. No entanto, já existem linhagens de neurônios que podem ser adquiridas e estudadas sob uma MEA, mas para isso é necessário aprofundar os estudos nesse sentido para verificar se elas podem ser utilizadas nos nanodispositivos.

## **5. AGRADECIMENTOS**

As autoras principais agradecem a DIRPE/UFU pela compreensão e esforço, bem como à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) que promoveu apoio financeiro através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e à Universidade Federal de Uberlândia que também promoveu apoio financeiro através do Programa Institucional de Bolsas do Ensino de Graduação (PIBEG).

## 6. ANEXO - FONTES DE INFORMAÇÃO PARA A COTAÇÃO DE PREÇOS, ASSOCIADA ÀS TABELAS I E II.

<b>Empresa</b>	<b>Sítio Oficial da Empresa Online</b>
BUNKER - Equipamentos para laboratório.	Disponível: < <a href="http://www.bunker.ind.br">http://www.bunker.ind.br</a> > Acesso em: 03 de Março de 2009.
CIENLAB - Equipamentos Científicos	Disponível: < <a href="http://www.cienlab-loja.com.br">http://www.cienlab-loja.com.br</a> > Acesso em: 03 de Março de 2009.
CIRÚRGICA PASSOS - A Casa do Profissional da Saúde	Disponível: < <a href="http://www2.ciashop.com.br/cpassos">http://www2.ciashop.com.br/cpassos</a> > Acesso em: 03 de Março de 2009.
INVITROGEN CORPORATION	Disponível: < <a href="http://www.invitrogen.com.br">http://www.invitrogen.com.br</a> >. Acesso em: 03 de Março de 2009.
LABMAIS - Comércio, assistência técnica e artigos para laboratórios	Disponível: < <a href="http://www.labmais.com.br/catalogo">http://www.labmais.com.br/catalogo</a> > Acesso em: 03 de Março de 2009.
LGC Biotecnologia	Disponível: < <a href="http://www.lgcbio.com.br">http://www.lgcbio.com.br</a> > Acesso em: 03 de Março de 2009.
LOJALAB - Equipamentos para Laboratórios	Disponível: < <a href="http://www.lojalab.com.br">http://www.lojalab.com.br</a> > Acesso em: 03 de Março de 2009.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- radiation and chemotherapeutic drugs. *Radiation Research*, v. 134, p. 349-354, 1993.
- ALBERTS, B. et al. *Fundamentos da biologia celular*. Porto Alegre: Artmed, 2006. 866 p.
- ATCC<sup>®</sup> - *The Global Bioresource Center*. Disponível: <<http://www.atcc.org>>. Acesso em: 02 de Março de 2009.
- ALLALUNIS-TURNER, M.J.; BARRON, G.M.; DAY III, R.S.; DOBLER, K.D.; MIRZAYANS, R. Isolation of two cell lines from a human malignant glioma specimen differing in sensitivity to
- AVGEROPOULOS, N.G. Focal treatments for glioblastoma multiforme: a brief review. *American Brain Tumor Association*. October, 2001.

BELENKOV, A.I.; PAIEMENT, J.P.; PANASCI, L.C.; MONIA, B.P.; CHOW, T.Y.K. An Antisense Oligonucleotide Targeted to Human Ku86 Messenger RNA Sensitizes M059K Malignant Glioma Cells to Ionizing Radiation, Bleomycin, and Etoposide but not DNA Cross-Linking Agents. *Cancer Research*, v. 62, p. 5888-5896, 2002.

CLAVEROL-TINTURÉ, E.; GHIRARDI, M.; FIUMARA, F.; ROSELL, X.; CABESTANY, J. Multielectrode arrays with elastomeric microstructured overlays for extracellular recordings from patterned neurons. *Journal Of Neural Engineering*, vol. 2, p. L1-L7, 2005.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. *A célula - uma abordagem molecular*. Porto Alegre: Artmed, 2007. 736 p.

DAL-PIZZOL, F.; RITTER, C. Modulation of oxidative stress in response to gamma-radiation in human glioma cell lines. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 61, p. 89-94, 2003.

FREEMAN, W. J. *Neurodynamics: An Exploration in Mesoscopic Brain Dynamics*. Londres: Springer, 2000. 408 p.

FROMHERZ, P. Semiconductor chips with ion channels, nerve cells and brain. *Physica*, vol. 16, p. 24-34, 2003.

GRISCOM, L.; DEGENAAR, P.; LEPIOUFLE, B.; TAMIYA, E.; HIROYUKI, F. Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays. *Sensors and Actuators B*, vol. 83, p. 15-21, 2002.

LAKARD, S.; HERLEM, G.; VALLES-VILLAREAL; MICHEL, G.; PROPPER, A.; GHARBI, T.; FAHYS, B. Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, p. 1946-1954, 2005.

MENDONÇA, R.; SILVA DE LIMA, L.G.; FERNANDES, L.N.T.; FERREIRA, N.P.; DE NAPOLI, G. Glioblastoma primário de cone medula. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 63, n. 2B, p. 539-542, 2005.

MERCER, H.D.; WHITE, R.L. Photolithographic fabrication and physiological performance of microelectrode arrays for neural

stimulation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 25, n. 6, p. 494-500, November 1978.

#### MULTI CHANNEL SYSTEMS.

*Microelectrode Array (MEA) - User Manual*. Germany, 2005, 54p. Disponible: <[http://www.multichannelsystems.com/fileadmin/user\\_upload/Manuals/MEA\\_Manual.pdf](http://www.multichannelsystems.com/fileadmin/user_upload/Manuals/MEA_Manual.pdf)>

NOVELINO, A.; CHIAPPALONE, M.; VATO, A.; BOVE, M.; TEDESCO, M.B.; MARTIONIA, S. Behaviors from an electrically stimulated spinal cord neuronal network cultured on microelectrode arrays. *Neurocomputing*, vol. 52, p. 661-669, 2003.

POTTER, S. M. "Distributed processing in cultured neuronal networks", in M.A.L. NICOLELIS (ed.) - *Progress in Brain Research*, vol. 130, p. 49-62, 2001.

POTTER, S.M; DE-MARSE, T.B. A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 110, p. 17-24, 2001.

RUTTEN, W.L.C. et al. Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a culture probe. *Proceeding of the IEEE*, vol. 89, p. 1013-1029, 2001.

RUTTEN, W.L.C. Selective electrical interfaces with the nervous system. *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 4, p. 407-452, 2002.