



PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE RESPOSTA CELULAR AO ESTRESSE EM CULTURA PRIMÁRIA DE LINFÓCITOS¹

**Luis Felipe Pedrolo Hickmann², Laura Braun Eickhoff³, Anna Karolina Kretschmann
Florencio de Souza Bagetti⁴, Luciana Mori Viero⁵, Samara Cristine Knebel⁶, Thiago
Gomes Heck⁷**

¹ Projeto de pesquisa institucional do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI).

² Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, bolsista PIBIC-FAPERGS, Curso de Medicina, luis.hickmann@sou.unijui.edu.br

³ Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, bolsista CNPq, Curso de Medicina, laura.eickhoff@sou.unijui.edu.br

⁴ Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, Bolsista PIBIC-UNIJUI, acadêmica do curso de Medicina, anna.bagetti@sou.unijui.edu.br

⁵ Curso de Medicina Veterinária, UNIJUI, luciana.viero@unijui.edu.br

⁶ Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde, Mestranda do projeto, samara.knebel@sou.unijui.edu.br

⁷ Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, Docente no Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde e Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional, thiago.heck@unijui.edu.br

Introdução: Decorrido mais de um século após os primeiros experimentos de cultivo de células, o uso desta técnica manteve-se como uma importante ferramenta de pesquisa na área da saúde. Os primeiros testes realizados foram com tecidos fragmentados mecanicamente e alocados em recipientes contendo fluidos dos próprios animais. Com o decorrer de mais experimentos, a dinâmica que envolve o cultivo de células foi sendo aprimorada e questões referentes a testes de respostas de defesa celular têm sido utilizadas na pesquisa em saúde. Dessa forma, torna-se importante uma padronização do método de cultura de células e teste de resposta celular ao estresse a fim de permitir a execução e reprodutibilidade de experimentos e minimizar os erros metodológicos, elevando a confiabilidade dos dados obtidos. **Objetivos:** Descrever as etapas da padronização dos métodos de teste de resposta ao estresse celular em cultura de linfócitos. **Metodologia:** Os preparos iniciais para a cultura de células incluem um criterioso processo para evitar a contaminação do material biológico. Esse processo engloba lavagens do material a ser utilizado com água destilada (6x) e autoclavagem dos materiais (Autoclave Stermax de 30 litros nº7, ciclos de 30 minutos, 121°C, pressão de 2 bar). Ademais, antes de utilizar a cabine de segurança biológica (classe II A1) e a sala de cultura, há exposição do ambiente à radiação ultravioleta por pelo menos 1 hora. Além disso, higieniza-se as mãos e todo material que é introduzido dentro da cabine de fluxo laminar com álcool 70°. Em primeiro plano, a cultura primária de linfócitos é obtida de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar machos, eutanasiados com sobredose de anestésicos Xilazina (~30 mg/kg) e Cetamina (~300 mg/kg) via i.p. (CEUA nº 028/24). Após, realiza-se um corte medial longitudinal da pele na região abdominal do animal. A fim de encontrar os linfonodos mesentéricos, deve-se localizar o ceco intestinal, afastar o intestino e, após, encontrar a cadeia



de linfonodos que se posiciona paralela ao íleo, começando na junção cecal. Como os linfonodos estão envoltos em gordura, esta é retirada com pinças e filtros de papel autoclavados e coloca-se os linfonodos em microtubos de 2ml. Posteriormente, na cabine de biossegurança, os linfonodos são colocados em um tubo cônico de 15ml contendo 10ml de tampão fosfato (PBS) para serem macerados com um obtentor gradeado dentro de um béquer de 50ml. Filtra-se o PBS contendo os linfócitos em um funil com filtro (whatman nº2105-841). O macerado filtrado é centrifugado (10 minutos, 1.500 RPM, 358G), o sobrenadante é desprezado, e o precipitado de células é quebrado por impacto mecânico. Após, é adicionado o meio de cultura RPMI 1640, com 5% de soro fetal bovino, glicose (5,5mM) e antibióticos (penicilina 100 U/ml - estreptomicina 100µg/ml). A suspensão de células no meio é homogeneizada com uma pipeta (ponteira de 1ml), sendo aliquoteados 50 µl para realizar contagem e análise da viabilidade celular. São aliquoteados 4 ml, divididos em dois microtubos de plástico (2ml) para a realização do teste de resposta celular ao estresse, no qual um tubo é incubado em banho-maria seco por 2 horas à 37°C e o outro à 42°C (choque térmico). Após o banho-maria, as células são levadas à cabine de fluxo novamente e as células ressuspensas (2ml por poço) em placas de cultura de 6 poços, previamente identificados. Então, as placas permanecem na incubadora (37°C, 5%CO₂) por 6 horas. Após, a amostra é homogeneizada e colocada em outro microtubo de 2ml para a nova contagem e análise da viabilidade celular. Para a viabilidade celular, utiliza-se uma solução de 1:5 contendo a amostra (10µl), o corante azul de tripan (10µl), previamente filtrado e o meio PBS (30µl). Coloca-se uma lamínula na câmara de Neubauer e a solução é inserida. A contagem é realizada visualmente no microscópio (40x), avaliando no quadrante central da câmara. As células mortas são coradas em azul, pois o corante azul de tripan é internalizado por linfócitos que perderam a viabilidade. O cálculo da viabilidade celular é o nº cél vivas/nºtotal expresso em percentual e o nº total de células é calculado considerando o nº cél vivas x10⁴ multiplicado pela diluição utilizada para contagem (geralmente 1:5). As viabilidades foram expressa em média ± dp, e foram comparadas por ANOVA de uma via (P<0,05). **Resultados:** No tempo zero (logo após a extração), a viabilidade obtida foi de 94,17 ± 4,19%. Após a incubação em banho maria, a viabilidade da amostra a 37°C foi mantida, pois apresentou-se em 95,60 ± 3,97%, assim como ocorreu após as amostras serem submetidas ao teste de resposta celular ao estresse (42°C), nas quais a viabilidade foi de 95,18 ± 4,13%. Não houve diferença na viabilidade celular entre as condições testadas (P= 0,685). **Conclusões:** O protocolo utilizado representa um método adequado para o teste de resposta celular ao estresse em cultura primária de linfócitos e pode ser considerado aplicável a futuros experimentos na pesquisa em fisiologia celular. **Palavras-chave:** “Cultura Primária de Células”, “Linfócitos”, e “Resposta ao Choque Térmico”. **Agradecimentos:** CNPq, Proc. 407329/2016-1 444286/2024-1, 403136/2024-5, 405546/2023-8, 307926/2022-2 de TGH, CAPES, FAPERGS e UNIJUÍ. **Referências:** ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde: Cultivo Celular. Rio de Janeiro:EPSJV/Fiocruz, 2010; PERES, Carmen Maldonado. CURI, Rui. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. HECK, Thiago Gomes et al. Acute exercise boosts cell proliferation and the heat shock response in lymphocytes: correlation with cytokine production and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio. Cell Stress & Chaperones, v. 22, p. 271-291, 2017