

Avaliação da Densidade Celular de Linhagem de Células Vero

Victor Cassano, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiiana
Suzane Rossato Soares, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa, Campus
Uruguaiiana

Ingrid Leticia Trindade Vieira, discente de graduação, Universidade Federal do Pampa,
Campus Uruguaiiana

Camila Cupper, doutoranda, Universidade Federal de Santa Maria

Joana Closs, mestranda, Universidade Federal do Pampa

Fernando Mesquita, docente, Universidade Federal do Pampa

victorcassano.aluno@unipampa.edu.br

A linhagem celular Vero é considerada de linha contínua, possuindo uma grande capacidade de passagem dentro dos meios de cultivo e foi obtida primariamente do epitélio renal do *Cercopithecus aethiops* e são utilizadas para a produção de vacinas por serem susceptíveis a muitas espécies virais. O presente estudo tem por objetivo avaliar a densidade inicial de sementeira no crescimento da linhagem celular Vero. As células Vero foram cultivadas em meio DMEM/F12 da SIGMA, com 10% de soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (100U/10mg/ml), pH 7,4, sendo feito em dois momentos com o preparo do meio estoque e da solução de 100mL. Com o objetivo de propagar as células em preparação ao experimento, estas foram descongeladas em banho maria a 37°C, e imediatamente centrifugadas a 200xG por 5 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e as células ressuspendidas em 1mL de meio DMEM/F12 em frasco de 25cm², em um volume final de 4mL de meio. O cultivo celular foi realizado em incubador a 37°C e 5% de CO₂, com substituição de meio 24 horas após sementeira e posteriormente, a cada 48 horas. Para analisar o efeito da densidade no crescimento celular ao longo do tempo as células foram semeadas em placas de 24 poços com um volume de 1mL por poço. No primeiro experimento utilizou-se uma densidade de 0,3x10⁴ células viáveis. Antes da sementeira as células foram coradas com Trypan Blue e contadas em Câmara de Neubauer para identificação das células viáveis, pois dessa forma as células que estão rompidas são coradas. Cada placa de 24 poços foi dividida em 4 dias (D1-I, D2-I, D3-I e D4-I), com 3 poços (réplicas) por dia. Para a determinação da densidade, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspendidas e processadas em câmara de Neubauer. No segundo experimento foram utilizadas duas densidades iniciais diferentes (0,2x10⁴ e 0,4x10⁴), seguindo a mesma divisão de dias e réplicas, utilizando a mesma técnica para a contagem das células. As médias dos grupos experimentais foram comparadas por análise de variância seguida do teste de Tukey, através do programa de estatística JMP Pro 14, estabelecendo a densidade celular como variável dependente, e o dia e a réplica como variáveis independentes. A diferença estatística foi considerada quando o valor de p ≤ 0,05. Os gráficos foram gerados pelo programa GraphPad Prisma, sendo construído com a média e desvio padrão de cada tratamento. No primeiro experimento, a densidade inicial de sementeira de 0,3x10⁴ células houve diferença estatística entre os dias, sendo o D1 aquele com menor número de células e os demais dias (D2-I, D3-I e D4-I) iguais entre si.

Considerando as densidades de $0,2 \times 10^4$ e $0,4 \times 10^4$, ambas apresentaram maior número de células no D4-II em comparação aos demais dias, bem como D3-II sendo maior que D2-II e D1-II, as quais foram iguais entre si. A comparação entre o efeito da densidade inicial de semeadura no número de células dentro de cada dia revelou que nos dias 3 e 4 o número de células foi maior quando a densidade inicial foi de $0,4 \times 10^4$ células por poço, em comparação com as médias obtidas nos poços cuja densidade inicial foi de $0,3 \times 10^4$ e $0,2 \times 10^4$ células por poço. Concluímos que quanto maior a densidade inicial de semeadura, maior o crescimento celular e que nas densidades testadas não houve cessação do crescimento em função de confluência celular precoce, mas levamos em consideração também que as densidades iniciais de semeadura foram realizadas em momentos diferentes e sendo assim o resultado final é passível de alteração pelas condições do meio em que as células estão inseridas.

Agradecimentos: FAPERGS; UNIPAMPA

Palavras-chave: Células Vero; cultivo; densidade; contagem;