

IMPLEMENTAÇÃO DE CULTURA CELULAR DE CARDIOMIÓCITOS NEONATAIS

BRUNA L. BECKER¹; JULIANA O. RANGEL², BIANCA M. FRACASSO², MICHAEL E. ANDRADES^{2,3}



1 Acadêmica em Ciências Biológicas - UFRGS 2 PPG Cardiologia - UFRGS 3 Laboratório de Pesquisa Cardiovascular – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

INTRODUÇÃO

A cultura celular é utilizada para os estudos na área da fisiologia e bioquímica celular. Na área da cardiologia, ela permite aos pesquisadores estudar e compreender características morfológicas, bioquímicas e eletrofisiológicas do coração. Embora linhagens celulares cardíacas imortalizadas já estejam comercialmente disponíveis, culturas primárias são mais relevantes do ponto de vista estrutural e funcional.

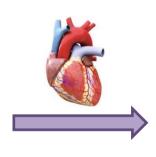
OBJETIVO

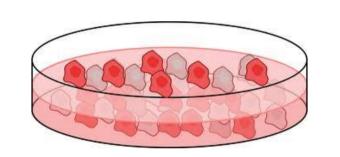
Estabelecer a cultura de cardiomiócitos a partir de ratos neonatos, com vista a fornecer uma metodologia para o estudo da fisiopatologia e bioquímica do cardiomiócito no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular.

METODOLOGIA

1° dia (1h)

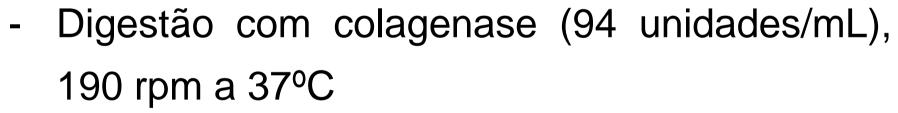
Ratos neonatos com até dois dias de idade





Overnight a 4°C em tripsina (50 µg/mL)





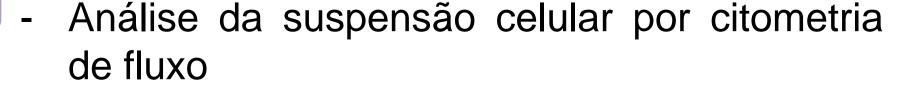
- Pré-plaqueamento por 1h para aderência e remoção dos fibroblastos (sobrenadante com cardiomiócitos coletados)
- 2° dia (4,5h)
- Contagem com azul de tripan



- Plaqueamento em placa de 6 poços pré-semedas com gelatina= 2.10⁵/ poço*
- Meio DMEM com BrdU, para inibir crescimento de fibroblastos, mais 10% SBF
- * Manutenção em estufa a 37°C, 5%CO



Troca de meio: DMEM/MEM c/ BrdU, 5% SBF





Meio DMEM/MEM <u>sem</u> BrdU, 5% SBF

Pronta para uso

RESULTADOS

Foi realizado um total de três culturas celulares com um rendimento médio de 15 x 10⁶ células. Uma análise morfofuncional microscopia foi feita por comprovação dos tipos celulares, e pôde-se visualizar a morfologia característica das estrias dos cardiomiócitos com contrações espontâneas, a partir de 24h de plaqueamento. Em 72h, a confluência atingida foi de cerca de 85% (figura 1). A suspensão celular foi analisada por citometria de fluxo, com a qual se obteve duas populações celulares principais (figura 2). Por tamanho e complexidade celular é possível inferir que a maior se trata dos cardiomiócitos e a segunda, seriam fibroblastos cardíacos. A duração média das culturas foi de 7 dias.

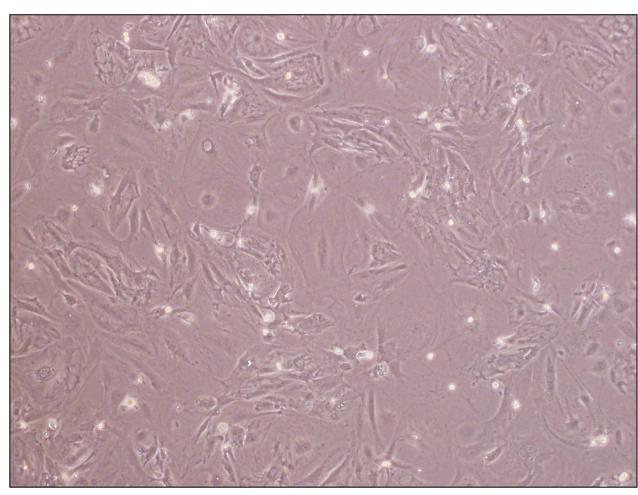


Figura 1: Cultura de caridomiócitos (3ºdia) Aumento de 40x.

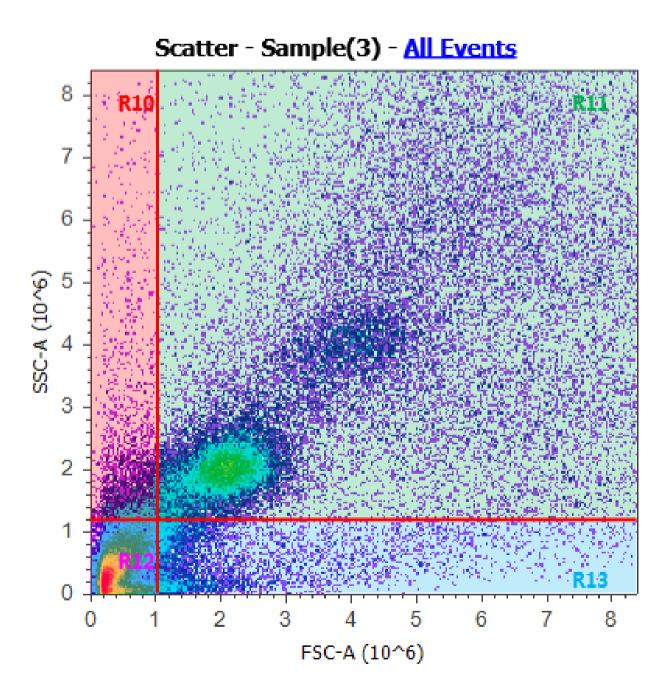


Figura 2: Distribuição celular avaliada por citometria de fluxo (Attune, Life Technologies). R12 apresenta a população de fragmentos celulares, enquanto que R11 apresenta duas populações distintas de células. FSC: forward scatter; SSC: side scatter

PERSPECTIVAS

A confirmação da pureza das próximas culturas se dará por meio de imunofenotipagem com citometria de fluxo, usando anticorpo primário específico (anti-troponina T) marcado com sonda fluorescente, juntamente com marcador de viabilidade celular.