

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

Luiz Antônio da Cunha

Avaliação da influência do dipeptídeo *N*- β -alanil-L-histidina (L-carnosina) sobre a cinética de expansão de culturas de células diplóides humanas, estirpe MRC-5.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

**Rio de Janeiro
2007**

Trabalho Realizado no Instituto de Tecnologia em
Imunobiológicos, na Vice-Diretoria de
Desenvolvimento Tecnológico, sob a orientação do
Dr. Geraldo Rodrigues Garcia Armoa.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

Luiz Antonio da Cunha

Avaliação da Influência do dipeptídeo *N*-β-alanil-L-histidina (L carnosina) sobre a cinética de expansão de culturas de células diplóides humanas, estirpe MRC-5.

Orientador: Doutor Geraldo Rodrigues Garcia Armoa

Aprovada em 12 de junho de 2007

Examinadores:

Profa. Dra. Márcia Teresinha Baroni Moraes e Souza

Prof. Dr. Maulori Curié Cabral

Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira

Rio de Janeiro,

À Cléia

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Geraldo Garcia Armoa pela imprescindível orientação e constante incentivo para realização deste trabalho;

Ao Instituto Oswaldo Cruz, na pessoa de sua atual diretora, Dra Tânia Cremonini de Araújo Jorge;

Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, na pessoa de seu atual diretor, Dr. Akira Homma, pela oportunidade de aprimoramento;

À coordenação do Mestrado Profissional de Bio-Manguinhos, representada pela professora Dra. Sheila Farage e a secretária e, adorável amiga, Zaíra Antunes, pelo esforço contínuo em favorecer o triunfo de seu corpo discente;

À amiga Mariza Cristina Ribeiro Lima, grande parceira de estudo e trabalho, pelo irrestrito apoio e incentivo;

À amiga Maria Luiza Azevedo pela indispensável parceria na execução de todas as etapas deste trabalho.

Ao corpo de funcionários do Departamento de Vacinas Virais, reconhecidos pelo codinome de família LASA, pelo grande apoio em todos os passos necessários para se alcançar este objetivo pessoal e profissional.

Ao grupo de funcionários do Laboratório de Tecnologia Recombinante pela oportunidade de conviver em um ambiente de trabalho acolhedor e produtivo.

Ao parceiro de importantes jornadas, Fernando César Ferreira pelo apoio pessoal e logístico na execução das práticas virológicas deste estudo.

A profa. Evanilce Ferreira, e aos funcionários do Setor de Potência do LACOM, pela absoluta diligência em atender nossas solicitações de apoio técnico, especialmente no suprimento de células e na titulação das amostras virais produzidas neste estudo.

A Ana Paula Correa Argondizzo, Gabriela Esteves e Danilo Parmera Vassalo pelo constante incentivo e apoio técnico na execução da parte técnica deste trabalho.

A Dra. Luciane Pinto Gaspar pela gentileza de nos fornecer as amostras de culturas de células MRC-5 usadas neste trabalho.

Ao prof. Eduardo Chaves Leal, vice-diretor do INCQS, pela sua pronta colaboração em nos fornecer amostras de culturas de células HeLa usadas neste trabalho.

Ao colega Gerson de Oliveira Silva pela espontaneidade e solicitude em nos prestar apoio no tocante ao preparo de amostras e fornecimento de informações sobre cultura de células MRC-5.

Aos amigos do MPTI, Carlos Correa, Carlos Calvet, Cátia, Cláudia Molinaro, Cristine, Danilo, Denise, Elaine, Fernanda, Henriana, Isabela, Luciana, Maria Célia, Mariza, Mauro, Pedro, Rafael, Raouf, e Wildeberg por um convívio cordial e participativo.

Não me reconheças no meu corpo.

Sou experiência;

Sou conhecimento;

Sou alma.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1- INTRODUÇÃO	1.
1.1- Cultura de células: aspectos históricos	1.
1.2- Senescência celular	6.
1.3- Carnosina e o processo de senescência	11.
1.4- Estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, um substrato celular qualificado para a produção de vacinas virais e outras aplicações	16.
1.5- Produção de cepas vacinais do vírus da rubéola em cultura de células diplóides humanas	21.
2- RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	23.
3- OBJETIVO	25.
3.1- Objetivos específicos	25.
4- MATERIAL E MÉTODOS	26.
4.1- Ambiente laboratorial para a realização dos experimentos e preparo de insumos	26.

4.2-	Cultivo da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5	26.
4.3-	Cultivo da linhagem contínua de células de rim de coelho, RK13	27.
4.4-	Cultivo da linhagem contínua de células epitelióides de carcinoma de cervix uterino humano, HeLa	28.
4.5-	Procedimentos para o subcultivo de culturas de células	28.
4.6-	Formação de banco de amostras de suspensões de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5 para o trabalho	29.
4.6.1-	Congelamento de amostras de suspensões de células	30.
4.6.2-	Descongelamento de amostras de suspensões de células	30.
4.7-	Condicionamento de culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, com carnosina	31.
4.8-	Elaboração de curvas de crescimento da população da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, em culturas condicionadas com carnosina	32.
4.9-	Avaliação da ação da carnosina na adaptação celular ao ambiente de cultivo, através da aplicação da técnica de eluição do corante de cristal violeta em culturas incipientes da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5	33.
4.10-	Avaliação da expressão protéica da enzima β-galactosidase associada à senescência em culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, condicionadas com carnosina	35.

4.10.1-	Caracterização da expressão protéica da enzima β-galactosidase associada à senescência no tapete de culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, condicionadas com carnosina, usando 5-bromo-4-cloro-3-indolil β D galactosídeo como substrato	35.
4.10.2-	Avaliação da distribuição da atividade da enzima β-galactosidase associada à senescência entre as células de suspensões obtidas pelo processamento de culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, condicionadas com carnosina, usando 5-bromo-4-cloro-3-indolil β D galactosídeo como substrato	36.
4.10.3-	Avaliação quantitativa da atividade da enzima β-galactosidase associada à senescência em extratos celulares obtidos de culturas da estirpe de células diplóides, de pulmão de feto humano, MRC-5, condicionadas com carnosina, usando o-nitrofenol-β-D-galactosídeo como substrato	37.
4.11-	Propagação de cepas vacinais do vírus da rubéola, Wistar RA27/3, em culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, condicionadas com carnosina	38.
5-	RESULTADOS	41.
5.1-	Adequação da cultura da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, ao modelo de estudo	41.
5.2-	Preparo de bancos de amostras de suspensões de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, para o trabalho	41.
5.3.	Avaliação da ação da carnosina sobre a cinética de	

	crescimento de culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, na passagem 37	43.
5.4-	Avaliação da ação da carnosina no processo adaptativo de culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, na passagem 37, ao ambiente de cultivo pelo emprego da técnica de eluição do corante cristal violeta	48.
5.5-	Caracterização da expressão protéica da enzima β-galactosidase associada à senescência no tapete de culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, condicionadas e não condicionadas com carnosina, usando 5-bromo-4-cloro-3-indolil β D galactosídeo como substrato	51.
5.6-	Avaliação da distribuição da atividade da enzima β-galactosidase associada à senescência entre as células de suspensões obtidas pelo processamento de culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, condicionadas com carnosina, usando 5-bromo-4-cloro-3-indolil β D galactosídeo como substrato	53.
5.7-	Avaliação da atividade da enzima β-galactosidase associada à senescência em extratos celulares de culturas de estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, condicionadas com carnosina usando o-nitrofenol-β-D-galactosídeo como substrato enzimático	55.
5.8-	Avaliação da propagação do vírus vacinal da rubéola, WistarRA27/3, em culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, condicionadas com carnosina	59.

6-	DISCUSSÃO	62.
6.1-	Cultura de células e implicações da senescência celular	62.
6.2-	Ação da carnosina sobre a cinética de crescimento de culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5	66.
6.3-	Avaliação dos efeitos da carnosina em culturas incipientes da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, na passagem 37 pelo emprego da técnica de eluição do corante cristal violeta	72.
6.4-	Avaliação da expressão protéica da enzima β-galactosidase associada à senescência, em culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5, condicionadas com carnosina	75.
6.5-	Propagação da cepa vacinal Wistar RA27/3 do vírus da rubéola, em culturas da estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano, MRC-5 condicionadas com carnosina.	78.
7-	CONCLUSÕES	80.
8-	PERSPECTIVAS	81.
9-	BIBLIOGRAFIA	82.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
#	passagem
%	Símbolo de porcentagem
λ	comprimento de onda
β -gal AS	enzima β -galactosidase associada à senescência
β -gal AS +	positividade de reação para a atividade da enzima β -galactosidase associada à senescência
μ L	microlitro
°C	grau Celsius ou centígrado
ADN	ácido desoxirribonucléico
AGEs	do inglês, <i>advanced glycation end products</i> = produtos finais de glicação avançada
ARN	ácido ribonucléico
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
CCID ₅₀	dose citopatogênica para 50% das culturas de células inoculadas
CCL	do inglês, <i>certified cell lines</i> = Linha de célula certificada
cm ²	centímetro quadrado
CO ₂	gás carbônico
CPE	do inglês, <i>cytopathic effect</i> = efeito citopático
CVDE	do inglês, <i>crystal violet dye elution</i> = eluição do corante de cristal violeta
DEGAQ	Departamento Garantia de Qualidade
DIAPV	Divisão de Apoio às Vacinas Virais.
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> ,
DMSO	Dimetilsulfóxido

DO	Densidade ótica
ECACC	do inglês, <i>European Collection of Animal Cell Cultures</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FDA	do inglês, <i>United States Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	aceleração da gravidade
G1	fase de crescimento (do inglês – growth) da mitose
GSK	GlaxoSmithKline
HCl	ácido clorídrico
HDCS	do inglês, <i>human diploid cells strains</i> = estirpes celulares diplóides humanas
HeLa	linhagem contínua de células epitelióides de carcinoma de cervix uterino humano.
HPV	Do inglês, <i>human papilloma virus</i> = vírus do papiloma humano
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
$K_3 Fe(CN)_6$	ferricianeto de potássio
$K_4 Fe(CN)_6$	ferrocianeto de potássio
Kb	quilobases
L	litro
LACOM	Laboratório de Controle Microbiológico
LAMEV	Laboratório de Metrologia e Validação
LANEU	Laboratório de Neurovirulência
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante
LATEV	Laboratório de Tecnologia Viroológica
Log	Logaritmo na base 10
M	molar
MDA	malondialdeído
MEM	do inglês, <i>minimum essential medium</i> = meio mínimo essencial
MG	metilglioxal
mg	miligrama

MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	miliMol
MnCl ₂	cloreto de manganês
MOI	do inglês, <i>multiplicity of infection</i> =, multiplicidade de infecção
MRC-5	estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano
Na ₂ CO ₃	carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	fosfato dibásico de hidrogênio
NaCl	cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato monobásico de hidrogênio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
nm	nanômetro
nM	nanoMol.
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONPG	o-nitro-fenol-galactosídeo
PBS	do inglês, <i>phosphate buffer salts</i> =, salina tamponada com fosfatos.
POP	Procedimentos operacionais padronizados
qsp	quantidade suficiente para
PDL	do inglês, <i>population doubling level</i>
pH	potencial de hidrogênio iônico
PNI	Programa Nacional de Imunizações
R ²	coeficiente de correlação
RK13.	linhagem celular contínua de rim de coelho
ROS	do inglês, <i>reactive oxygen species</i> = espécies reativas do oxigênio

SEMES	Setor de Meio de Cultura e Soluções
SFB	soro fetal bovino
SV40	vírus símio 40
T-25	garrafas plásticas descartáveis com 25 cm ²
T-75	garrafas plásticas descartáveis com 75 cm ²
TGF	do inglês, <i>transforming growth factors</i>
TVV	do inglês, <i>triple viral vaccine</i> = Vacina tríplice contra sarampo, rubéola e caxumba
UV	radiação ultravioleta
v/v	volume a volume
VDTEC	Vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico
WI-38	estirpe de células diplóides de pulmão de feto humano
Wistar RA27/3	cepa vacinal do vírus da rubéola
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β D galactosídeo

RESUMO

Um acordo internacional de transferência de tecnologia, firmado em 2003, entre a FIOCRUZ e a GlaxoSmithKline permitiu o acesso de Bio-Manguinhos a um moderno processo produtivo da vacina tríplice viral (TVV) contra o sarampo, a caxumba e a rubéola. A produção dessa vacina é parte do compromisso de Bio-Manguinhos com o programa nacional de auto-suficiência em imunobiológicos, tido como uma meta prioritária da política de saúde pública do governo brasileiro. A tecnologia aplicada para a produção da TVV envolve o uso de células MRC-5 como substrato celular para a produção de vírus vacinais da rubéola, particularmente da cepa Wistar RA27/3. A estirpe MRC-5 é reconhecida como um dos mais importantes substratos celulares para a produção de vacinas virais, e também tem sido adotada como modelo de estudo para senescência celular *in vitro*. A senescência celular é um estágio fisiológico complexo pelo qual, invariavelmente, qualquer população de células somáticas normais passa após atingir um determinado número de mitoses. Esse estágio fisiológico é caracterizado nas células diplóides pela contenção da capacidade de se multiplicar e pelo desenvolvimento de alterações morfológicas peculiares, especialmente quando cultivadas *in vitro*. Com o objetivo de aprimorar o monitoramento de estirpes de células diplóides humanas (HDCS – do inglês *Human Diplóide Cells Strains*) e contribuir para o estabelecimento da base de conhecimento necessário para a futura aplicação no processo de produção de TVV em Bio-Manguinhos, nós avaliamos culturas de células MRC-5 condicionadas com carnosina, em três diferentes aspectos: cinética de crescimento, propagação da cepa vacinal, Wistar RA27/3, do vírus da rubéola e a expressão do marcador biológico de senescência, a enzima β -galactosidase AS (β -gal AS). A avaliação do potencial antioxidante e antisenescente atribuído a carnosina, um dipeptídeo ubíquo à fisiologia de todos os animais superiores, sobre as células MRC-5 pode contribuir para aprimorar os procedimentos de qualificação e controle de células diplóides associados à produção de vacinas, e ainda servir para o desenvolvimento de novos produtos e a pesquisa científica. Aspectos da cinética de crescimento da cultura de células condicionadas com carnosina, observados neste estudo, são discutidos sob o ponto de vista da teoria do compromisso celular com a senescência. Todas as culturas de células MRC-5 avaliadas demonstraram a expressão da β -gal AS através do uso de X-Gal ou ONPG como substrato. Não encontramos variações no perfil de propagação de cepas vacinais do vírus da rubéola que possam ser associadas ao condicionamento das células MRC-5 com carnosina, nas condições testadas.

ABSTRACT

An international technology transfer agreement established between FIOCRUZ and GlaxoSmithKline in 2003, will provide Bio-Manguinhos with access to a modern manufacturing process for the production of the triple viral vaccine against measles, mumps and rubella (TVV). The production of TVV forms part of the Bio-Manguinhos commitment to the self-sufficiency national program in immunobiologicals, within the Brazilian government public health prioritized policies. The TVV technology employs diploid cells derived from normal human lung tissue (MRC-5) as the substrate for production of the attenuated rubella vaccine virus, Wistar RA27/3. The MRC-5 strain is one of the most important cellular substrates for viral vaccine manufacturing and in addition is widely used as a model for *in vitro* studies of cell senescence. Cellular senescence is a physiological stage which normal somatic cells beyond certain duplication level go through, invariably. Such physiological stage is characterized by growth arrest and specific morphological changes, commonly, observed in diploid cells under *in vitro* culture environment.

Aiming to contribute with the human diploid cells strains (HDCS) monitoring study and line up with the establishment of the necessary knowledge base for the conduction of the TVV production process in Bio-Manguinhos, we evaluated MRC-5 cell cultures conditioned with carnosine under three different aspects: growth kinetics, propagation of the attenuated strain of rubella virus Wistar RA27/3 and the expression of the senescence bio-marker, SA β -Galactosidase. An evaluation of the antioxidant and antisenesence features attributed to carnosine, a dipeptide, ubiquitous to the physiology of all superior animals, over MRC-5 may contribute to the improvement of the qualification and control procedures in production of vaccines, product development and scientific research. Aspects of the growth kinetics of MRC-5 cells conditioned with carnosine observed in this study are discussed in relation to the cellular commitment theory. All MRC-5 tested demonstrated SA β -Galactosidase activity, as verified by enzyme processing of X-Gal or ONPG used as substrate. Additionally, no variations in the propagation profile of the attenuated rubella virus by treating cells with carnosine could be characterized in this study.

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Cultura de células: aspectos históricos

A cultura de células é reconhecida como um dos principais baluartes da pesquisa biomédica, e em nossos dias assume a notoriedade de uma prática científica secular. O seu marco inicial é conferido ao trabalho de Ross Granville Harrison, que em 1907, descreveu a manutenção e crescimento de tecido nervoso de rã em gota pendente de linfa por um período de até 30 dias, demonstrando pela primeira vez que as funções normais da célula podem ser mantidas *in vitro*. (Witkowski, 1979; Kretzmer, 2002).

A partir deste início singular a cultura de células recebeu um grande impulso, especialmente no Instituto Rockefeller de Nova York, onde uma equipe de pesquisadores comandados por Alexis Carrel introduziu uma técnica caracterizada por uma peculiar habilidade cirúrgica para a manutenção de tecidos animais *in vitro* (Witkowski, 1979). O grau de complexidade associado ao método desenvolvido por Carrel, e o pragmatismo observado na divulgação dos resultados obtidos no Instituto Rockefeller restringiram o acesso à cultura de tecido a um limitado número de cientistas, figura 1.1 (Witkowski, 1979; Wilson, 2005). Neste contexto a manutenção de tecido animal *in vitro* desenvolveu-se em um ambiente profícuo em mistério, ritos e controvérsias, atraindo não apenas o interesse da comunidade científica da época, mas também a atenção dos jornais, da sociedade em geral e de personalidades ilustres no início do século XX (Hayflick, 1997; Wilson, 2005; Nelson, 2006).

A divulgação, em 1912, do estabelecimento de uma cultura de células de coração de galinha que poderia se expandir *ad infinitum*, impregnou os experimentos de Carrel com uma atmosfera definida por alguns como mística, porque neles estava inserido o dogma da vida permanente ou imortalidade (Witkowski, 1979). Essa cultura, posteriormente mantida por Albert Ebeling, um dos colaboradores de Carrel, foi usada para abonar a crença na perenidade da

expansão da vida de todas as células somáticas *in vitro*, e justificar a expectativa da aplicação do método desenvolvido não só no controle dos processos patológicos, mas também em fenômenos como a senectude (Witkowski, 1979; Wilson, 2005).



Figura 1.1 – Dois técnicos em operação de manutenção de tecido animal *in vitro*, no laboratório de Alexis Carrel no Instituto Rockefeller- Nova York. Imagem capturada em 27/09/2006, em *Alexis Carrel and the mysticism of tissue culture*.<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1082475>

A competência exemplar atribuída à técnica desenvolvida por Carrel é atestada pela expansão seriada das culturas de tecido animal sem os altos índices de contaminação observados nas práticas laboratoriais da era pré-antibióticos (Witkowski, 1979; Theiler & Smith, 2000). A aplicabilidade da cultura de tecido como ferramenta no estudo virológico já havia sido demonstrada pela equipe de Edna Steinhard, em 1913, com a produção de vírus da vaccinia em fragmentos de tecido de córnea de coelho (Theiler & Smith, 2000). Entretanto, atribui-se ao método de cultura de tecido introduzido por Carrel no Instituto Rockefeller de Nova

York, o mérito de ser fundamental para o sucesso de Max Theiler, na obtenção de uma vacina atenuada contra a febre amarela. Durante o processo de atenuação, a habilidade técnica para sustentar passagens seqüenciais do vírus da febre amarela em cultura de tecido foi um dos fatores determinantes do sucesso desse desafio tecnológico, que passou a representar um dos marcos mais importantes da virologia (Theiler & Smith, 2000).

Historicamente, a expectativa de aplicabilidade da cultura de células na pesquisa médico-científica foi confirmada em 1949, no trabalho de Weller, Robbins & Enders, que lograram êxito em obter vírus da poliomielite propagados em células extraneurais cultivadas *in vitro* (Weller *et al.*, 1949). O feito de Weller, Robbins & Enders, teve um resultado catalisador sobre a evolução do processo de cultura de células e sua aplicação, inaugurando uma nova era na vacinologia viral. Em consequência dessa inovação tecnológica, rins de macacos passaram a ser fonte de tecido para a obtenção de cultura de células usadas na produção de vacina contra a poliomielite (Kretzmer, 2002; Furesz, 2006). Também passaram a ser a origem da grande preocupação da comunidade científica em relação ao risco associado ao uso de substratos celulares na produção de imunobiológicos (Furesz, 2006).

O despertar dessa apreensão foi ocasionado pela ocorrência do vírus símio 40 (SV40) em alguns lotes de vacinas, durante os primeiros anos de produção. Embora o vírus SV40 cause câncer em roedores, estudos de longa duração não confirmaram seu potencial carcinogênico para os vacinados e seus descendentes. Porém, esses eventos demandaram uma maior acuidade no monitoramento das culturas primárias de células animais usadas para a fabricação de vacinas (Furesz, 2006).

Uma importante vertente para a evolução do conhecimento e aplicação das culturas de células foi apresentada por Hayflick & Moorhead em 1961, através do estudo do cultivo seriado de HDCS. Os autores correlacionaram o comportamento e características biológicas de populações celulares derivadas de tecidos normais

e malignos quando cultivadas *in vitro*, e destacaram a impropriedade do uso de células de linhagem contínua no fabrico de vacinas, recomendando a utilização das estirpes de células diplóides para este propósito (Hayflick & Moorhead, 1961). A força dessa proposição sustentava-se no desenvolvimento de processos mais seguros para a produção de vacinas virais, baseando-se na disponibilidade de um substrato celular plenamente monitorado quanto à isenção de contaminantes endógenos ou idiosincrasias cromossômicas que, adicionalmente, oferecia uma maior proximidade à biologia das células humanas *in vivo* (Hayflick & Moorhead, 1961). A substituição das células primárias de rins de macacos por linhas de células mais seguras – estirpes de células diplóides humanas, WI-38 e MRC-5 – aumentou o número de vacinas licenciadas para uso humano: sarampo (1963), raiva (1964), caxumba (1969) e rubéola (1969) (Kretzmer, 2002).

Outro legado dos estudos de Hayflick & Moorhead (1961) foi a representação diagramática da história de uma estirpe celular (figura 1.2), onde a evolução da população de células é delineada em três fases distintas. A adaptação celular ao ambiente da cultura *in vitro* a partir do tecido de origem é descrita como a fase I, que corresponde à cultura primária e termina com a formação de uma monocamada confluyente de células. As estirpes celulares, propriamente ditas, são identificadas com a fase II, e representam o estágio de crescimento profuso da população celular a partir da cultura primária. Nessa circunstância, vários subcultivos são permitidos, e os autores destacam o possível surgimento das linhagens celulares em consequência de alterações que resultem no surgimento de células com o potencial infinito de multiplicação (Hayflick & Moorhead, 1961). Os autores definiram que para uma estirpe celular, caso não conste em sua trajetória de crescimento uma alteração genômica que lhe confira um caráter de imortalidade, a fase II determinará sua história, uma vez que a expansão da sua população original de células estará limitada a um número restrito de duplicações. Essa restrição passou a ser reconhecida como “o limite de Hayflick”, a partir do qual a população celular entra em decaimento, e caracteriza a fase III (Hayflick & Moorhead, 1961).

Ao entrar na fase III, as estirpes celulares passam por um processo degenerativo, perdem seu potencial de crescimento e definham, configurando o fenômeno conhecido como senescência celular. O envelhecimento e a morte são conseqüências inevitáveis após cerca de cinquenta duplicações da população de células cultivadas a partir do tecido de origem (Hayflick & Moorhead, 1961).

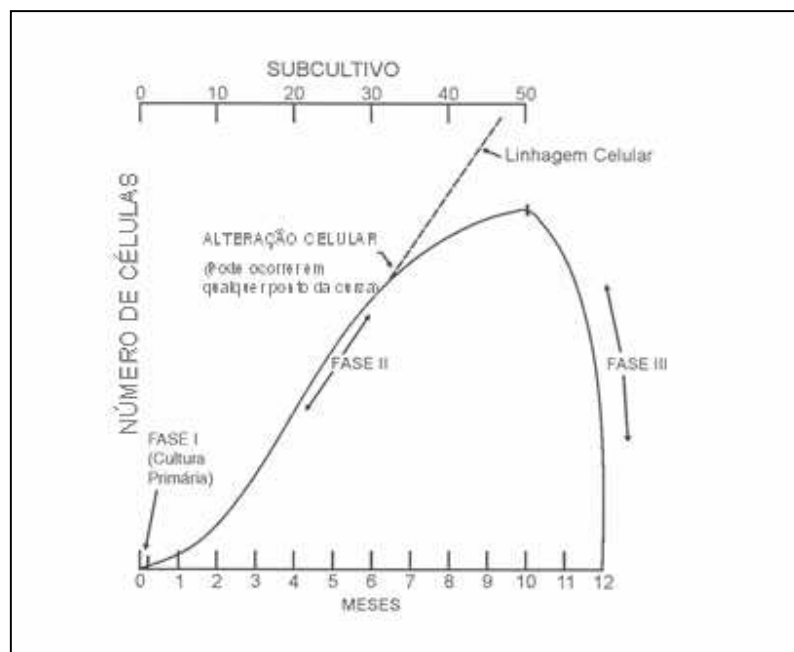


Figura 1.2. Diagrama da evolução das culturas de células diplóides *in vitro*. Adaptado de: Hayflick & Moorhead; *Experimental Cell Research* - 1961

A publicação dos estudos de Hayflick e Moorhead (1961) teve um grande impacto na comunidade científica da época porque, conceitualmente, os fenômenos observados na fase III demoliram a crença no mito da vida permanente para as culturas de tecido *in vitro*, como preconizava Carrel e seus seguidores, e que subsistia por décadas com a força de um dogma (Hayflick, 1997). Por outro lado, essa publicação proporcionou um novo modelo de sistema para o estudo do

envelhecimento em nível celular, que resultou em um grande impulso à citogerontologia (Smith & Hayflick 1974; Hayflick 1997; Katakura 2006).

1.2 - Senescência celular

As células somáticas normais, invariavelmente, após um número limitado de mitoses ou em resposta a diversos estímulos originados de estresse fisiológico, entram em um estágio irreversível de contenção da sua capacidade de crescimento conhecido como senescência celular ou senescência replicativa (Campisi, 2005). Células senescentes podem permanecer viáveis por longo período de tempo em cultura (Dimri *et al.* 1995; Wein & Wu, 2001, Campisi, 2003). Nesse estágio o metabolismo das proteínas e do ácido ribonucléico (ARN) são mantidos porém a célula não responde a estímulos mitogênicos, e a contenção do seu crescimento ocorre na fase G1 caracterizada por uma intensa atividade metabólica, porém o ácido desoxirribonucléico (ADN) não é duplicado (Dimri *et al.*, 1995).

Qual seria então a importância biológica do fenômeno de senescência, especialmente para os humanos? Que processo de sinalização determina a interrupção do crescimento celular? A limitação da capacidade de crescimento das células representa um mecanismo para prevenir a formação de tumores ou a origem dos fenótipos de doenças associadas à longevidade? São questionamentos que emergiram com os estudos de Hayflick, sobre os quais a evolução das pesquisas sobre senescência celular se fez (Greider, 1998).

A senescência celular é um fenômeno biológico de ocorrência natural entre os seres vivos. Para os animais superiores, de forma específica, a sua importância está associada à manutenção da integridade fisiológica dos tecidos. Evolutivamente, sua origem é atribuída ao aprimoramento de mecanismos direcionados a impedir a proliferação de células germinativas deficientes e controlar a morfogênese. Nos organismos complexos o fenômeno se associa à

apoptose e através de relações moleculares complexas, ainda por serem elucidadas, determinam o declínio do crescimento ou a eliminação de células não funcionais (Campisi, 2003). De acordo com as premissas contidas nos estudos de Hayflick o processo de sinalização para o desencadeamento da senescência celular dependeria da existência, em células normais, de um registrador interno de eventos que limitaria sua capacidade metabólica a um determinado tempo (Hayflick, 1997).

A percepção de um evento conhecido como: o problema do final da replicação, por Alexei Olovnikov e James Watson, de forma pouco diferenciada em tempo e enfoque, ofereceu a oportunidade para a identificação deste registrador interno. Olovnikov teorizou, de forma direta, que: o problema do final da replicação poderia acionar o limite de Hayflick, uma vez que a cada divisão celular uma parte das terminações do ADN não seria replicada (Greider, 1998).

A descoberta dos telômeros em 1978, e da enzima telomerase em 1984 deram sustentação científica à teoria de Olovnikov (Greider, 1998). Telômeros são extensas repetições de curtas seqüências de nucleotídeos - TTAGGG, nos humanos - situadas nas terminações dos cromossomos e às quais são conferidas funções especializadas em nível de eficiência de replicação, proteção do genoma contra seu próprio sistema de reparo do ADN e registrador do número de ciclos de divisão celular (Alberts *et al.*, 2002). A célula perde um segmento de seus telômeros a cada divisão, e o encurtamento dessas seqüências representa um mecanismo de registro do seu número de mitoses (Alberts *et al.*, 2002). As células proliferam, perdendo aproximadamente 65 nucleotídeos a cada ciclo de divisão, até que a extensão de seus telômeros seja reduzida a um nível crítico – 4 a 6 quilobases (Kb) - que determinará o acionamento da resposta senescente (Rubin, 2002; Campisi, 2003). Assim a primeira causa da senescência celular passou a ser associada ao progressivo encurtamento de seus telômeros. Sem eles os términos dos cromossomos não são distintos das fitas em pareamento e estarão sujeitos à degradação ou fusão pela maquinaria de reparo de ADN. A

informação genética pode se perder e o genoma ser desestabilizado (Campisi, 2003).

Nas células somáticas o mecanismo de senescência se instala naturalmente durante a diferenciação, com o desligamento gradual da expressão da telomerase, uma enzima com características de transcriptase reversa, que atua sobre os telômeros fazendo sua reconstituição. A manutenção da atividade da telomerase representa uma forma de preservação da capacidade proliferativa em leveduras ou em alguns tipos de células tronco e germinais nos humanos (Alberts *et al.*, 2002). A atividade telomérica também é frequentemente detectada em vários tipos de tumor e em células imortalizadas oriundas de culturas em crise (Holliday, 2001; Rubin, 2002). Entretanto a abrangência deste comportamento está limitada por exceções e o encurtamento dos telômeros nem sempre se correlaciona com a presença ou iminência de um estado de senescência, especialmente porque grande parte dos estudos sobre senescência replicativa tem como modelo células em cultura, que estão distantes do intrincado fluxo de sinalização observado nos tecidos *in vivo* (Holliday, 2001; Rubin, 2002).

O avanço do entendimento sobre o processo de sinalização associado à senescência celular tem colocado esse fenômeno no centro de um complexo programa molecular que integra mecanismo de defesa contra o câncer e a origem de fenótipos de doenças associadas à longevidade (Campisi, 2005; Katakura, 2006). Nesse complexo programa de sinalização admite-se que a presença de telômeros curtos, conseqüentemente não funcionais, seja o elo central da cadeia de eventos que caracteriza a senescência replicativa, enquanto uma outra vertente de estímulos originados de formas diferenciadas como estresse oxidativo, células em condições inadequadas de cultivo, expressão significativa de elementos da família dos *Transforming Growth Factors* beta (TGF β) e super-expressão de genes oncogênicos resulte em estado de senescência, dito prematuro (Lodygin, Menssen & Hemeking, 2002; Katakura 2006). A família dos TGF β são isoformas protéicas, que na forma de citocinas, atuam como inibidores de crescimento, moduladores do fenótipo das células e reguladores da adesão celular (Massague,

et al., 1992). Apesar da diversidade dos estímulos capazes de desencadear o processo de senescência, a efetivação do fenômeno envolve basicamente o acionamento das duas principais vias fisiológicas de supressão de tumores, centralizadas nas proteínas p53 e p16, para conter a capacidade de multiplicação das células (Alberts *et al.*, 2002; Campisi, 2005). Não obstante a existência de controvérsias, esse entendimento tem fomentado estudos no sentido de se induzir a senescência em células cancerosas através da inibição da telomerase ou agentes supressores de tumor, como os elementos da família dos TGF β , como terapia para o câncer (Lodygin, Menssen & Hemeking, 2002; Rubin, 2002; Buckley *et al.*, 2004). Vários desses estudos foram monitorados através da pesquisa de um marcador fisiológico de senescência, a β -galactosidase associada à senescência (β -gal AS) cuja expressão diferencia células senescentes de células quiescentes ou tumorais (Dimri *et al.*, 1995; Buckley *et al.*, 2004; Katakura, 2006).

A β -gal AS, originalmente descrita por Dimri e colaboradores (1995), diferencia-se das suas correlatas; β -gal constitutiva aplicada como expressão de gene repórter bacteriano em técnicas de expressão heteróloga de proteínas e da β -gal lisossomal, por ter sua atividade no potencial de hidrogênio iônico (pH) 6.0. A maioria das células expressa a enzima β -gal lisossomal cuja atividade é melhor detectada no pH 4.0 enquanto nas técnicas de engenharia genética a atividade da β -gal constitutiva é pesquisada no pH 7.5 (Dimri *et al.*, 1995). Esses autores também demonstraram que linhas de células imortalizadas, como a linhagem contínua de células epitelióides de carcinoma de cervix uterino humano, HeLa, não expressam a β -gal AS. A linha de células HeLa foi estabelecida a partir de amostras de tecido de um carcinoma cervical que acometeu uma senhora de 31 anos, de nome Henrietta Lacks, falecida em 1951 (Masters, 2002). Entre as características das células HeLa destacam-se: a inserção genômica de genes do vírus do papiloma humano do tipo 18 (HPV18), um número modal de 82 cromossomos e a atividade telomerásica [Masters, 2002; *American Type Culture Collection* (ATCC), 2005].

A detecção do marcador fisiológico, β -gal AS, para senescência (figura 1.3) é uma ferramenta com um enorme potencial para o monitoramento e qualificação de estirpes celulares em procedimentos de pesquisa, desenvolvimento e produção de imunobiológicos, especialmente quando são consideradas as recomendações do *United States Food and Drug Administration* (FDA) quanto às propriedades das células usadas na produção de vacinas virais (FDA, 2006). O FDA recomenda que as propriedades de crescimento *in vitro* dos substratos celulares devam ser plenamente caracterizadas e se as células têm uma expectativa finita de sobrevivência, deve-se determinar o número necessário de duplicações da população celular para se atingir a senectude. Ainda neste seguimento, o FDA orienta os fabricantes no sentido de que a aparência microscópica de um substrato celular deva ser estável desde o banco primário de células até a produção (FDA, 2006). De uma forma mais abrangente o FDA idealiza que todos os estágios de desenvolvimento de um produto candidato a vacina sejam feitos em células bem caracterizadas e, na falta de experiência com novos substratos celulares, os fabricantes devem desenvolver e aplicar a melhor tecnologia disponível para garantir que esses sejam seguros (FDA, 2006).

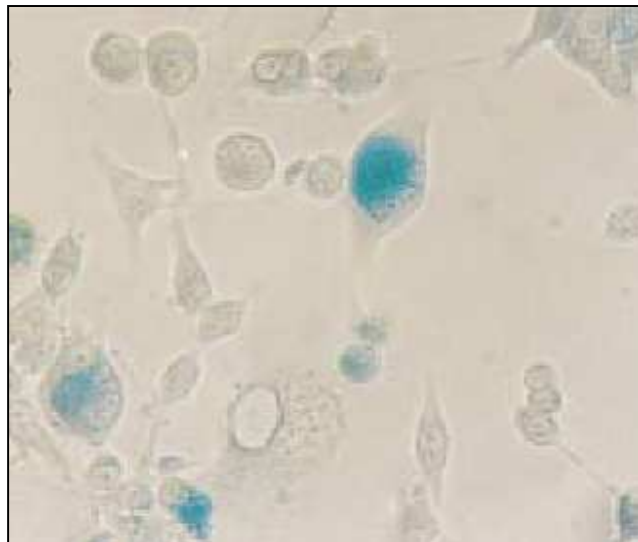


Figura 1. 3 - Células mamárias de murinos, senescentes, marcadas pela atividade da β -gal AS. Capturado em 29/09/2006 em <http://www.springerlink.com/content/u1788q22308621r4/fulltext.pdf>

1.3 - Carnosina e o processo de senescência.

Carnosina ou *N*-β-Alanil-L-histidina é um dipeptídeo de ocorrência natural, identificado originalmente em 1900, na Rússia, por Gulewitsch & Amiradzibi a partir de extrato de carne bovina (*The Merck Index*, 1983; Gariballa & Sinclair, 2000). Esse dipeptídeo é encontrado, principalmente, na musculatura esquelética e tecido nervoso do homem e outros mamíferos (*The Merck Index*, 1983). O teor desses dipeptídeos pode chegar a 50 milimolar (mM) em tecidos sob regime de permanente estímulo, como a musculatura cardíaca e esquelética e áreas específicas do sistema nervoso, inserindo-os entre os mais abundantes compostos nitrogenados não protéicos encontrados nos animais (Nardiello & Cataldi, 2004; Park, Volpe & Decker, 2005).

Em ambiente fisiológico a carnosina é formada a partir de monômeros de β alanina e L histidina, que se ligam pela ação da enzima carnosina sintetase. Essa enzima também é responsável pela síntese de análogos estruturais da carnosina, e contribui para a formação de um grupo de dipeptídeos envolvidos no metabolismo da histidina, entre eles a anserina (alanil-L-1-metilhistidina), ofidina (alanil-L-3-metilhistidina) e homocarnosina (α-aminobutirilhistidina) (Gariballa & Sinclair, 2000). A anserina é o componente equivalente a carnosina na musculatura de alguns animais, particularmente de pombos e gansos (*The Merck Index*, 1983).

Desde a sua primeira descrição, os estudos sobre a carnosina e sua aplicação terapêutica tornaram-se um concurso de expectativas sobrepujadas, até o presente, pela inconsistência das teorias sobre a sua função biológica (Gariballa & Sinclair, 2000).

A presença da carnosina no sistema nervoso central preenche requisitos para caracterizá-la como um neurotransmissor ligado à modulação de processos sinápticos, mas também pode estar envolvida em neuroproteção (Guiotto *et al.*, 2005).

Por outro lado, é possível que a carnosina atue como fonte de seus constituintes, e como participante do metabolismo da histidina, esteja envolvida na modulação da resposta inflamatória e reação alérgica (Gariballa & Sinclair, 2000).

Um dos principais obstáculos para o entendimento da função biológica da carnosina é a presença da enzima carnosinase que, em nível plasmático e tecidual, cliva o dipeptídeo em seus constituintes β alanina e L histidina (Hipkiss & Browson 2000; Guiotto *et al.*, 2005).

A utilidade dessa enzima constitui um paradoxo, uma vez que até o momento, não se pode atribuir a carnosina um caráter prejudicial à fisiologia que se possa comparar à toxicidade da histidina livre (Hipkiss & Browson 2000; Guiotto *et al.*, 2005). Essa questão assume maior complexidade quando se observa a inexistência da carnosinase na circulação sanguínea de eqüídeos, cujos níveis de carnosina sérica são muito mais altos que os encontrados nos humanos (Dunnett *et al.*, 2002; Park, Volpe & Decker, 2005).

A aplicação terapêutica da carnosina tem apresentado resultados promissores em dois seguimentos: como adjuvante no processo cicatrização por injúria tecidual (Roberts *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2005) e como solução oftálmica para o tratamento de catarata, ceratites e erosão da córnea (Gariballa & Sinclair, 2000; Wang *et al.*, 2000).

O interesse pelo estudo sobre as propriedades da carnosina tomou um grande impulso com a publicação dos estudos de McFarland & Holliday (1994 e 1999), que demonstraram a capacidade deste dipeptídeo de retardar o processo de senescência de fibroblastos diplóides humanos em cultura.

Foi comprovado que a carnosina, em concentrações fisiologicamente compatíveis, poderia estender a longevidade dessas culturas por aproximadamente dez duplicações do número de células, e mesmo em casos onde o processo de senescência havia se instalado o fenótipo de culturas senescentes poderia ser revertido (McFarland & Holliday 1994 e 1999). Essa descoberta teve um grande impacto sobre os estudos da senescência celular, e em particular sobre o aspecto de irreversibilidade da fase III inserido no conceito do limite de Hayflick, considerando-se que fatores ambientais, como a presença

de carnosina, podem interferir na manifestação do fenômeno (McFarland & Holliday, 1999). A extensão da longevidade celular ou a alteração do fenótipo senescente nas culturas, na forma como foram descritas, não poderiam ser relacionadas a mecanismos intrínsecos à fisiologia celular, que se baseassem no conceito de um relógio molecular, tal como o encurtamento dos telômeros. No entanto, o procedimento poderia alterar o ritmo do mecanismo do relógio por um efeito indireto (McFarland & Holliday, 1999). Este efeito indireto foi associado à atividade antioxidante da carnosina, que atuaria através da depuração de radicais livres, apontados como causa de perda da homeostase celular e, em última análise, de desencadeadores da sua senescência (McFarland & Holliday, 1994).

A função biológica da carnosina pode ter uma correlação evolutiva com sua atividade antioxidante, uma vez que para a adaptação dos organismos à vida em um ambiente aeróbico foi necessário o desenvolvimento de mecanismos de defesa contra os danos induzidos pelo oxigênio, especialmente pelas espécies reativas de oxigênio (ROS- *reactive oxygen species*). As espécies reativas de oxigênio podem interagir com ADN, ARN, lipídeos e proteínas e têm sido apontadas como a causa de senescência, câncer, e outras doenças (Kohen *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 2000).

A carnosina por ser solúvel em água, em contraste aos antioxidantes lipossolúveis, tem maior fluidez no ambiente citossólico e pode oferecer uma proteção mais abrangente para a organização celular. A ação da carnosina também pode envolver o bloqueio da formação de radicais livres, a remoção de oxidantes, a estabilização de membranas pela inativação de ROS, ou a remoção de metabólicos intermediários que promovam a formação de tais compostos (Kohen *et al.*, 1988; Stuerenburg & Kunze, 1999; Bogardus & Boissonneault, 2000; Gariballa & Sinclair, 2000).

A natureza hidrofílica da carnosina permite a aderência da molécula às fissuras na bicamada lipídica das membranas biológicas, atenuando de forma efetiva os produtos de peroxidação formado nas áreas lesadas destas estruturas celulares. A atividade antioxidante é uma propriedade compartilhada por vários derivados da histidina, e está associada à presença do anel imidazólico na

molécula deste aminoácido. Entre esses compostos há uma diferenciação quanto à eficiência na depuração de radicais peróxidos, particularmente em função de alterações do pH, uma vez que a acidificação do ambiente prejudica essa atividade (Kohen *et al.*, 1988). A carnosina e a anserina, de maneira particular, apresentam grande capacidade de tamponamento em pH fisiológico acentuando a importância de suas funções durante o estresse oxidativo provocado pelo exercício físico, onde em consequência do catabolismo anaeróbico da glicose, o ambiente intracelular é acidificado pelo lactato. Nessa situação o declínio do pH do ambiente é acompanhado pelo surgimento de produtos intermediários capazes de promover reações de peroxidação (Gariballa & Sinclair, 2000). Entre os mecanismos de ação propostos para os antioxidantes está a capacidade de interagir com metais pesados evitando a sua participação em reações que resultem na formação de peróxidos (Kohen *et al.*, 1988).

A carnosina também é reconhecida como quelante de metais pesados, entre eles o cobre (Bogardus & Boissonneault, 2000; Quinn, Boldyrev & Formazuyk, 1992; Diez & Baran, 2003). A coexistência dos maiores teores corpóreos de cobre e carnosina na musculatura esquelética dos mamíferos, onde se registra altos índices de estresse oxidativo, pode ser um indicativo da importância da propriedade antioxidante deste dipeptídeo para a atividade muscular (Kohen *et al.*, 1988).

O potencial antioxidante em associação com a capacidade de preservar a função dos proteossomas são características compartilhadas por agentes reconhecidos como anti-senescentes, tais como aminoguanidina, carnosina, cinetina e α fenil-N-*t*-butilnitrona (Hipkiss *et al.*, 2002). A atividade dos proteossomas é prejudicada em células senescentes pelo acúmulo de um grande número de proteínas aberrantes que se interagem para formar estruturas complexas, do tipo resultante de ligações cruzadas, que por não serem passíveis de reciclagem tendem a colapsar o sistema proteolítico celular (Brownson & Hipkiss, 2000; Hobart *et al.*, 2004).

Geralmente, as alterações nas proteínas têm implicações conformacionais devido a inserção de radicais carbonilas em suas estruturas (Hipkiss *et al.*, 2002).

Esses radicais carbonilas são originados a partir da glicação não enzimática, de reações com aldeídos e cetonas tais como malondialdeído (MDA) e metilglioxal (MG), ou mesmo com intermediários da glicólise e podem levar a formação de compostos mais tóxicos como os conhecidos produtos finais de glicação avançada (AGEs - *Advanced glycation end products*) (Brownson & Hipkiss, 2000; Hobart *et al.*, 2004). A molécula da carnosina apresenta uma estrutura que mimetiza os sítios de glicação das proteínas, porém apresenta maior afeição para grupamentos carbonilas, o que lhe permite atuar como uma barreira protetora para agentes danosos como o MDA e MG, ou interagir com proteínas oxidadas fazendo sua carnosinação (Brownson & Hipkiss, 2000; Seidler & Yeargans, 2002; Yeargans & Seidler, 2003). A carnosinação é um mecanismo que favorece a reciclagem de proteínas oxidadas e promove a formação de aductos, o que representa uma forma de inibir o acúmulo de estruturas resultantes de ligações cruzadas como as placas β amilóide (Brownson & Hipkiss, 2000; Hipkiss, 2002; Yeargans & Seidler, 2003; Hobart *et al.*, 2004). A atividade antioxidante da carnosina também pode representar um mecanismo de proteção contra as quebras da molécula de ADN induzidas por ROS e AGEs (Kang, 2005).

Muitos estudos sobre a atividade anti-senescente da carnosina foram elaborados em células em cultivo, uma situação onde o estresse oxidativo é elevado em razão do alto teor de oxigênio envolvido, e o estado de senescência replicativa pode se originar por diferentes causas (Campisi, 2003). No entanto, a carnosina tem demonstrado ser eficiente em manter a homeostase celular em diferentes condições de cultivo, mesmo onde as culturas foram submetidas a insulto nutricional por longos períodos (McFarland & Holliday, 1994 e 1999; Kantha *et al.*, 1996; Hipkiss *et al.*, 2002).

Nesse contexto, estudos sobre a ação da carnosina sobre a cinética de crescimento das células MRC-5 podem constituir um importante investimento na área de produção e de desenvolvimento de imunobiológicos, especialmente para aqueles envolvendo a manutenção de culturas de células diplóides, dado o caráter de agente preservador da homeostase celular, ou inibidor do processo de senescência replicativa atribuído a este composto.

1.4 - MRC-5, um substrato celular qualificado para a produção de vacinas virais e outras aplicações.

O estabelecimento das primeiras estipes de células diplóides humanas teve entre seus motivos uma busca por substratos celulares seguros para produção de vacinas virais para uso humano (Hayflick & Moorhead,1961; Jacobs, Jones & Baille,1970). O advento dessas estirpes celulares foi acompanhado pelo aumento do número de vacinas virais licenciadas para uso humano (Fletcher, Hessel & Plotkin,1998; Kretzmer 2002).

Entre as estipes celulares estabelecidas, as células MRC-5 vieram a se constituir no modelo de cultivo celular mais largamente aceito para o fabrico de vacinas (figura 1.4) em razão de suas características culturais e fisiológicas, bem como pela sua capacidade de permitir a propagação de diferentes espécies virais (Jacobs,Jones & Baille,1970; Fletcher, Hessel & Plotkin,1998; Bio-Manguinhos 2004; ATCC, 2005; ECACC, 2006).



Figura 1.4- Modernas tecnologias de produção de vacinas contra a rubéola aplicam sistemas de produção de células MRC-5 em larga escala. (Cell factory) <http://www.nuncbrand.com/page.aspx?ID=10172#top>

A estirpe MRC-5 é constituída por uma população de células fibroblastóides e foi estabelecida a partir do tecido pulmonar de um feto masculino humano normal, de 14 semanas de gestação, removido de uma mulher de vinte sete anos por razões psiquiátricas. A partir da cultura seriada desse tecido formou-se um banco celular com 481 ampolas mantidas em nitrogênio líquido (Jacobs 1970 e 1976, Jacobs, Jones & Baille, 1970). Aspectos morfológicos das células MRC-5 em cultivo podem ser observados na figura 1.5

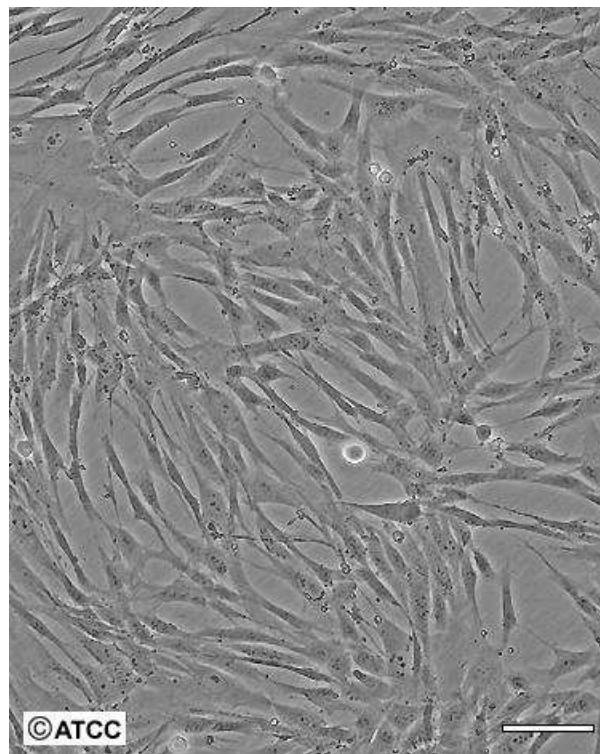


Figura 1.5 Aspecto da monocamada células MRC-5, onde se caracteriza a morfologia celular assumida em culturas confluentes. barra = 100 μ m
Fonte www.atcc.org/common/images/cell/ccl-171_mg.jpg

Durante a fase de caracterização das células MRC-5, a diversidade de suas possíveis aplicações foi evidenciada, não só pela variedade dos vírus propagáveis por esta HDCS, mas também pela propriedade desta estirpe celular se manter por longos períodos em cultura, sem apresentar sinais de degeneração (Jacobs,

1970). Assim, também se pode referir às células MRC-5 como uma importante ferramenta para o isolamento de vírus em estudos epidemiológicos ou no diagnóstico de viroses (Jacobs 1970; Shinohara *et al.*, 2002).

As culturas de células MRC-5 têm, assim como outras estirpes de fibroblastos humanos estudadas, uma limitada capacidade de expansão, e o início do declínio de seu potencial proliferativo ocorre ao atingir um patamar entre 42 e 46 duplicações da população celular (Jacobs, 1970; Jacobs, Jones & Baille, 1970; ATCC, 2005; ECCAC, 2006). O declínio da capacidade de proliferação e o surgimento de alterações no padrão cromossomal observados nessas culturas, depois de ultrapassarem determinados níveis de duplicações da população de células (PDL- do inglês, *Population Doubling Level*), chamaram a atenção da comunidade científica para a necessidade de um estrito monitoramento das características genéticas dessas células quando usadas na produção de vacinas [Jacobs 1970; Smith & Hayflick, 1974; World Health Organization (WHO), 2004]. Nesse aspecto, e por questão de segurança biológica, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o estabelecimento de bancos celular certificados, a partir dos quais, apenas culturas com um número limitado de passagens sejam aplicadas na produção de vacinas virais para uso humano (WHO 2004) Esse limite de utilização corresponde, em PDL, a dois terços da expectativa média de vida da estirpe celular, que na prática, é atingido entre 35 e 40 duplicações da população original de células (Fletcher, Hessel & Plotkin, 1998).

Entretanto, o grau de senescência das células diplóides em cultivo pode variar mesmo em populações com o número de PDL monitorado, em razão da coexistência de clones celulares diferenciados quanto ao grau de senescência e, conseqüentemente, quanto potencial de multiplicação, dentro de uma mesma estirpe (Merz & Ross 1973; Smith & Hayflick 1974, McFarland & Holliday, 1994).

Essa heterogeneidade foi demonstrada em células WI-38, a primeira HDCS estabelecida e reconhecida como um dos substratos celulares mais bem caracterizados para a produção de vacinas virais (FDA, 2006), quando se verificou que apenas aproximadamente 50% dos clones obtidos dessas culturas, entre a oitava e nona passagem (#), apresentavam potencial para se expandir além de

oito PDL (Smith & Hayflick, 1974). Contudo, têm-se identificado culturas que atingem números superiores a sessenta duplicações da população de células (Smith & Hayflick, 1974; McFarland & Holliday, 1999). As condições de manutenção dessas células em estado vegetativo são fatores determinantes para abreviar ou estender o advento da fase III do diagrama de Hayflick, uma vez que podem interferir em parâmetros tão essenciais quanto à preservação de altos índices de viabilidade e aderência à superfície de cultivo (McFarland & Holliday, 1999).

Em razão da diversidade da aplicação dessas células muitos são os protocolos descritos para a manutenção de suas culturas, e envolvem diferentes meios nutrientes, suplementos nutricionais e taxas de expansão da população celular (Jacobs 1970; Agostini *et al.*, 1980; McFarland & Holliday, 1999; ATCC, 2005; Wu *et al.*, 2005; ECACC, 2006). Estudos direcionados à padronização de procedimentos para o cultivo de células MRC-5 aplicados na produção de vacinas, ressaltam a importância da valorização de parâmetros como o estabelecimento de relações fixas entre o número de células semeadas, área de cultivo e volume de meio nutriente para que se obtenha maior rendimento celular e de antígenos vacinais (Agostini *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 2005).

Tais estudos contrariam as recomendações onde se preconiza manter fixas as taxas de expansão das culturas, e valorizam a estabilidade da relação disponibilidade de nutrientes por célula e o monitoramento da evolução do PDL durante passagens seqüenciais, que de outra forma poderiam variar em função do rendimento da etapa anterior (Agostini *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 2005; ATCC, 2005; ECACC, 2006). Deve-se ter em conta que o controle do número de PDL é um requisito tão primordial quanto o controle cariológico para salvaguardar a qualificação de uma população de células diplóides para uso em produção de vacinas virais (WHO 2004; FDA, 2006). Parâmetros como tensão de oxigênio e o pH no ambiente da cultura também são muito valorizados em padronização de processos de cultura de células MRC-5 para a produção de vacinas virais (Wu *et al.*, 2005). Esses são fatores básicos para a formação do potencial oxidativo no ambiente da cultura e conseqüentemente determinantes para a pressão ambiental

no desencadeamento do fenômeno da senescência replicativa nas células em cultura (Campisi, 2003; McFarland & Holliday, 1999).

Estudos têm evidenciado que a evolução do perfil de senescência celular é acompanhada por alterações fenotípicas, envolvendo aspectos morfofisiológicos como tamanho e volume celular, carga elétrica em nível de membrana, velocidade de crescimento e mesmo capacidade de replicar vírus (Yamamoto & Yamamoto, 1991; Dimri *et al.*, 1995, Faragher & Kipling, 1998; Campisi, 2003). O monitoramento desses parâmetros em cultura de células diplóides pode exprimir o perfil de senescência das mesmas, entretanto a capacidade de expressar a enzima β -gal AS (figura 1.6) é definida como o marcador biológico mais apropriado para este propósito (Dimri *et al.*, 1995).

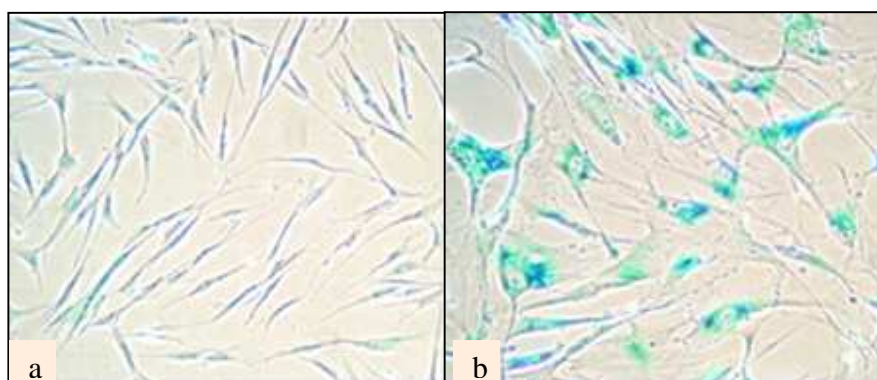


Figura 1.6. Células MRC-5 - a) PDL 28 b) PDL 63 - expressando marcador de senescência β -gal AS. Adaptado de Pedeux *et al.*, 2005.

Neste estudo, a forma como a carnosina interfere em parâmetros associados ao cultivo de células MRC-5 é abordado de maneira preliminar no contexto de cinética de crescimento, propagação de cepas vacinais do vírus da rubéola e expressão da enzima β -gal AS, como uma possível contribuição para os procedimentos de qualificação de estirpes fibroblastóides, usadas no desenvolvimento e produção de imunobiológicos e na pesquisa.

1.5 - Produção de cepas vacinais do vírus da rubéola em cultura de células diplóides humanas

A escolha da amostra vacinal RA27/3 do vírus da rubéola para avaliar a ação da carnosina sobre a propagação viral em células MRC-5 baseou-se, entre outros fatores, na identificação desta amostra vacinal com a tecnologia de produção da vacina TVV, em fase de implantação em Bio-Manguinhos; um esforço institucional para se alcançar a auto-suficiência em vacinas, no Brasil (Bio-Manguinhos, 2004). Nesta opção também está inserido o objetivo de contribuir para a formação da base de conhecimento necessária para se alcançar esse propósito, especialmente no que tange as relações biológicas envolvidas na infecção de células MRC-5 por essa amostra de vírus vacinal.

Bio-Manguinhos ao adotar um modelo tecnológico, onde é empregada cultura de células MRC-5 para produzir o componente rubéola da vacina trivalente viral, oferece ao Brasil a oportunidade de se alinhar com um número crescente de países que adotam o uso de vacinas combinadas para promover a imunização contra infecções virais (Plotkin & Reef, 2004; CDC, 2006). Atualmente, a maioria das vacinas mais modernas, contra a rubéola, utiliza a amostra vacinal Wistar RA27/3 como princípio ativo, por ser segura e mais imunogênica que suas precedentes (Plotkin & Beale, 1976; Chantler, Wolinsky & Tingle, 2001; Plotkin & Reef, 2004; CDC, 2006). Essa amostra vacinal, RA27/3, foi estabelecida em 1965 a partir de um explante de tecido renal de um feto abortado durante a epidemia de rubéola nos Estados Unidos. Os vírus do sobrenadante do quarto subcultivo desse explante foram submetidos a uma série de passagens em cultura de células WI-38, que resultaram em sua atenuação (Plotkin & Beale, 1976; Plotkin & Reef, 2004).

As diferentes cepas de vírus da rubéola, vacinais e selvagens, constituem um único sorotipo, entretanto o processo de atenuação pode diferenciá-las fenotipicamente, em relação a padrões de produtividade de vírus, termosensibilidade, tamanho de placa, e especialmente nos aspectos de infecciosidade, fato que evidencia a eficiência da profilaxia através de vacinação (Chantler, Wolinsky & Tingle, 2001).

Frey (1994) reporta variações na relação de produtividade de vírus da rubéola por célula infectada em função do tipo de célula usada ou das condições de infecção, o que destaca a importância desta relação como fator determinante para se avaliar a eficiência de determinados substratos celulares, entre eles as células MRC-5, na produção de imunobiológicos. A eficiência da produção de vírus da rubéola por culturas de tecido não depende apenas da espécie animal ou do tecido de origem, mas também, de forma circunstancial, do encontro da partícula viral infectante com uma fisiologia celular competente para a sua replicação (Frey, 1994). Assim, presume-se que avaliar ação da carnosina, como agente rejuvenescedor da fisiologia de células MRC-5 possa trazer algum aspecto importante para avaliar o processo de produção de vírus vacinal da rubéola. Esse argumento pode ser mais bem embasado, relacionando-se as acentuadas alterações da morfologia e fisiologia induzidas pelo vírus da rubéola nas células infectadas (Lee & Bowden, 2000; Risco, Carascosa & Frey, 2003) e as propriedades bioquímicas atribuídas à carnosina, descritas anteriormente

2 - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Em 2003, Bio-Manguinhos e a GSK, uma renomada empresa multinacional que atua no ramo de produção de imunobiológicos, estabeleceram um acordo para a transferência de tecnologia de produção da vacina polivalente, TVV para a FIOCRUZ, que até então, estava entre os poucos imunógenos incluídos no Programa Nacional de Imunização (PNI) do Ministério da Saúde não produzidos no Brasil.

Entre as especificidades do processo produtivo dessa vacina está a obtenção do princípio ativo para imunização contra a rubéola, a cepa de vírus vacinal Wistar RA 27/3 (Plotkin & Beale, 1976; Plotkin & Reef, 2004), em cultura de células MRC-5. Adicionalmente, o domínio da tecnologia de produção de células diplóides humanas em escala industrial, entre elas a estirpe MRC-5, oferece oportunidades de desenvolvimento e produção de vacinas virais importantes para combater outros males que assolam a população infantil brasileira, como a varicela e as rotavíruses.

As estirpes de células diplóides humanas, onde se incluem as células MRC-5, são reconhecidas como as mais seguras para a produção imunobiológicos, entretanto, no sentido de assegurar a ausência de riscos biológicos associados aos produtos deles originados, organizações como a OMS e FDA recomendam o estrito monitoramento de propriedades intrínsecas à natureza das estirpes celulares usadas na produção de vacinas virais.

O pleno conhecimento das características de crescimento das culturas de células diplóides usadas na produção industrial de vacinas virais é uma condição recomendável, e especialmente nos casos onde a expectativa de expansão da população de células seja limitada.

Assim, este estudo, ao focar a cinética de crescimento da população de células diplóides e a expressão da β -gal AS como parâmetros passíveis de aplicação no processo de qualificação desses substratos celulares, contribui para formação do conhecimento tecnológico e vivência prática necessários para o sucesso da produção da TVV em Bio-Manguinhos.

A inclusão da carnosina neste estudo, como um elemento diferenciador de parâmetros, oferece perspectivas de desenvolvimento técnico na área de cultivo, qualificação e aplicação das células diplóides, no contexto industrial, uma vez que se trata de um composto natural, ubíquo à fisiologia dos animais superiores, com um importante caráter antioxidante, ao qual se atribui uma ação inibitória no processo de senescência celular.

3 - OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da carnosina sobre cultura de células diplóides humanas, estirpe MRC-5, no contexto da cinética de crescimento, capacidade de propagar a cepa vacinal, Wistar RA 27/3 do vírus da rubéola e expressão da enzima β -gal AS.

3.1- Objetivos específicos

- Analisar o perfil de crescimento de culturas de células MRC-5 condicionadas com carnosina.
- Avaliar o processo de adaptação celular ao ambiente de cultivo, durante a etapa inicial do subcultivo de culturas de células MRC-5 tratadas com carnosina, utilizando o método de eluição do corante cristal violeta.
- Avaliar a expressão da β -gal AS em culturas de células MRC-5 condicionadas e não condicionadas com carnosina, utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo (X-gal) e o-nitrofenol- β -D-galactosídeo (ONPG) como substrato.
- Avaliar o efeito do condicionamento de células MRC-5 pela carnosina sobre a propagação da cepa vacinal, Wistar RA 27/3, do vírus da rubéola.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Ambiente laboratorial para a realização dos experimentos e preparo de insumos

Os experimentos relativos a manipulação de cultura de células foram realizados no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) vinculado a Vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), e aqueles que demandaram a manipulação de amostras vacinais do vírus da rubéola foram realizados no Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM), pertencente ao Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos.

As instalações e os equipamentos utilizados foram certificados de acordo com as normas de qualidade do Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV), do Departamento Garantia de Qualidade (DEGAQ) de Bio-Manguinhos.

Este estudo contou com a colaboração do LACOM para executar os testes de potência viral de suspensões de amostras vacinais de vírus da rubéola, e do Setor de Meio de Cultura e Soluções (SEMES), da Divisão de Apoio a Virais (DIAPV) para preparar soluções e os meios nutrientes usados para o cultivo de células, e com o laboratório de Neurovirulência (LANEU) vinculado a VDTEC para o processamento de imagens obtidas nos ensaios.

4.2 - Cultivo de células MRC-5.

As células MRC-5 usadas nos experimentos deste estudo procederam de um banco de células sementes preparado a partir de amostras de culturas gentilmente fornecidas pela Dra. *Luciane Pinto Gaspar* do Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) de Bio-Manguinhos.

No LATEV as células MRC-5 foram cultivadas em um meio nutriente composto por uma mistura volume a volume (v/v) de meio mínimo essencial [(MEM – do inglês, *Minimum Essential Medium- Gibco/Invitrogen* – Estados Unidos da América (EUA)] e meio Leibovitz L-15 (Gibco/Invitrogen – EUA)

suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco/Invitrogen, EUA), 0,15% de bicarbonato de sódio (NaHCO₃ - Merck, Alemanha) e incubadas a 37 graus centígrados (°C). Essas culturas foram mantidas através de subcultivos regulares, a cada cinco ou sete dias, com um regime de expansão caracterizado como passagens (#), pelo qual se preservava uma taxa de duplicação da área de cultivo, e assim relacionava-se o número de passagens com o PDL da estirpe celular.

Culturas de células MRC-5 (#31 e #33), ao serem recebidas no LATER, foram adaptadas ao cultivo em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - do inglês - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco/Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de SFB, dois mM de glutamina (Sigma-Aldrich- EUA), oito miligramas por litro (mg/L) de sulfato de gentamicina (Schering-Plough - Alemanha) e 0,22% NaHCO₃. No presente estudo, as células MRC-5 foram cultivadas em garrafas plásticas descartáveis contendo, respectivamente 75 ou 25 cm² de área cultivável (T-75 ou T-25 - Corning, EUA) e, volumes, de 30 e 10 mL de meio nutriente, respectivamente, de acordo com a finalidade proposta. As culturas foram incubadas a 37°C em estufa com ambiente úmido e uma atmosfera contendo 5% gás carbônico (CO₂). Para os experimentos envolvendo a aplicação da técnica de eluição do corante cristal violeta, as culturas foram preparadas em microplacas de 24 poços (Falcon – EUA).

4.3 - Cultivo de células RK13.

A linhagem celular contínua de rim de coelho RK13, que estão incluídas entre linhagens certificadas pelo ATCC (CCL37- *Certified Cell Lines 37*), exibe um perfil fisiológico adequado para a replicação de vírus da rubéola.

Em Bio-Manguinhos, exemplares dessas culturas, originadas da ECACC/lote 04K20, são usadas pelo LACOM para testar a potência das suspensões de vírus vacinais da rubéola. Neste trabalho, culturas de células RK13, gentilmente fornecidas pela professora *Evanilce Ferreira* responsável do Setor de Potência do LACOM, foram usadas para propagar cepas vacinais do vírus da rubéola.

A manutenção das células RK13 em cultivo foi feita com meio MEM suplementado com 10% de SFB, dois mM de glutamina e oito mg/litro de gentamicina. Para o controle do pH do meio de cultivo foi usado NaHCO_3 na concentração final de 0,15%, acrescentado ao meio de cultivo antes da incubação das culturas em estufa com temperatura ajustada para 37°C. As culturas foram preparadas em garrafas do tipo T-75 e tipo T-25 com volumes de 30 e 10 mililitros (mL) de meio nutriente, respectivamente, de acordo com a finalidade do trabalho.

4.4 - Cultivo de células HeLa

Neste estudo foram utilizadas células HeLa, cultivadas a partir de amostras do banco de referência de células do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), gentilmente fornecidas pelo vice-diretor daquele instituto, professor *Eduardo Chaves Leal*, para serem usadas como controle negativo de expressão de β -gal AS.

Para o cultivo das células HeLa seguiu-se as orientações contidas no certificado 9/06 emitido pelo Laboratório de vacinas virais e cultura de células do INCQS. As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB, dois mM de glutamina, oito mg/L de gentamicina e 0,22% NaHCO_3 . As culturas foram preparadas em garrafas do tipo T-75 ou T-25, de acordo com a finalidade do trabalho, incubadas a 37°C, e subcultivadas a cada cinco dias.

4.5. Procedimentos para o subcultivo das culturas de células.

Neste trabalho, para manter as culturas de células MRC-5, HeLa e RK13, em crescimento continuado, visando preservar as células de um estado de repressão metabólica em consequência da depleção de nutrientes e acúmulo de detritos, empregou-se um procedimento padronizado de subcultivo descrito, em linhas gerais, a seguir.

As culturas tiveram o meio de crescimento removido, e o tapete celular foi lavado com pelo menos dois volumes de solução salina tamponada com fosfatos no pH 7.4 (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) preparado pelo SEMES [0,15 M de cloreto de sódio (NaCl - Merck, Alemanha) 7,2 mM de fosfato dibásico de hidrogênio (Na₂HPO₄ - Merck, Alemanha), 2,8 mM de fosfato monobásico de hidrogênio (NaH₂PO₄ - Merck, Alemanha) q.s.p 1000 de água purificada] Para dispersão celular, as culturas foram incubadas, por um tempo entre três e cinco minutos a 37°C, com 10 mL de solução 0,125% de tripsina (Gibco Invitrogen, EUA), 0,1% de verseno [ácido etileno di-amino-tetra-acético (EDTA) - Sigma-Aldrich, EUA] e 0,0001% de vermelho de fenol (Merck, Alemanha) em PBS (pH 7.6). A continuidade da atividade enzimática da tripsina sobre as células foi interrompida pela adição de 10 mL de meio de cultivo sem NaHCO₃ e 0,5 mL de SFB. As suspensões de células obtidas foram homogeneizadas, com auxílio de pipetas, e subsequentemente, centrifugadas (400 x g) por quatro minutos (min) à temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). Para a reconstituição da condição de cultivo anterior, as células sedimentadas foram ressuspensas em volumes e composições de meios de cultivo adequados para cada tipo de cultura, itens 4.2, 4.3 e 4.4.

4.6 - Formação de banco de amostras de suspensões de células MRC-5 para o trabalho

O estabelecimento de um banco de células para trabalho se fez necessário para contemporizar os ensaios biológicos programados neste estudo à disponibilidade de culturas de células com um mesmo número de passagens e, conseqüentemente, equivalentes quanto ao potencial fisiológico. Para isso, uma série de culturas de células com o mesmo perfil de densidade celular foi processada para adequar sua população a um meio propício ao congelamento.

A utilização desse banco de células se fez através da reconstituição de exemplares crio-preservados, conforme a demanda de trabalho deste estudo.

4.6.1 - Congelamento de amostras de suspensões de células

O congelamento das amostras de suspensões de células foi feito de forma a manter uma relação direta entre a área do cultivo original e a quantidade de células contidas em cada frasco de congelamento, com capacidade para dois mL (Nalgene, EUA), preservando-se o número de passagens das culturas.

Neste trabalho, a amostra de células contida em cada frasco de congelamento foi constituída por um mL de suspensão celular com aproximadamente 4 500 000 células, que correspondia ao resultado do processamento de uma cultura em garrafas do tipo T-75. Para o congelamento as células foram suspensas em meio DMEM com 50% SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich - EUA), um agente crioprotetor, que preserva a integridade celular durante o processo de congelamento.

Para se fazer o congelamento lento das amostras (1°C por minuto) em *freezer* com temperatura ajustada a -70°C usou-se o artefato *Cryo 1°C Freezing container* (Nalgene, EUA). O banco de células para trabalho foi preservado em *freezer* ajustado para manter sua temperatura interna a -70°C.

4.6.2 - Descongelamento de amostras de suspensões de células

Para a reconstituição das culturas a partir das amostras de suspensões de células do banco de trabalho, empregou-se, de forma padronizada, o conjunto de ações descritas na forma subsequente: os frascos de congelamento contendo as amostras celulares foram transferidos rapidamente, da temperatura de -70°C em que estavam conservadas, para um recipiente contendo água na temperatura de 37°C. Após o descongelamento, as suspensões de células eram recolhidas através de uma agulha 25/7 milímetros (mm) para uma seringa contendo um mL de SFB, e transferidas para uma garrafa do tipo T-75. Para se reconstituir a composição do meio nutriente acrescia-se ao meio, de forma ordenada, SFB, meio

de cultivo e 0,11% de NaHCO_3 , em um volume final de 30 mL. A incubação das culturas foi feita nas condições usuais, descritas anteriormente (itens 4.2., 4.3. e 4,4). Para se evitar efeitos indesejáveis atribuídos à presença de DMSO no meio de cultivo, trocava-se o meio de descongelamento após um período 24 horas de incubação, que constitui um tempo adequado para a aderência das células à superfície de cultivo. Os meios usados nessa troca foram definidos, em termos de volumes e composições adequados para o cultivo de cada tipo de célula (Ver itens 4.2., 4.3. e 4,4).

4.7. Condicionamento de culturas de células MRC-5 com carnosina

O condicionamento de células com carnosina (Sigma-Aldrich - EUA) foi estabelecido como um procedimento básico para, de forma comparativa a padrões não condicionados, avaliar a interferência dessa substância sobre a fisiologia celular e a evolução das culturas.

O processo de seleção das culturas para condicionamento foi efetuado com 48 horas de antecedência ao preparo de cada ensaio, tomando por base a observação ao microscópio de culturas na fase final de crescimento exponencial, onde eram valorizados o estágio de confluência e o aspecto morfológico das células.

Uma vez constituído o padrão de condicionamento, este era mantido até o final de cada ensaio, de forma que, para o estabelecimento da base de comparação programada para cada ensaio, a quantidade de parâmetros avaliados foi usada para determinar o número de conjuntos de garrafas com culturas de células tratadas e não tratadas com carnosina.

Para o condicionamento, o meio de crescimento das culturas selecionadas era retirado, o tapete de células lavado com PBS, e adicionava-se um novo meio para a manutenção das culturas. O meio para a manutenção das culturas teste (carnosina 20 ou 40 mM, com 2% de SFB e 0,22% NaHCO_3) foi preparado a partir de uma solução mãe, estéril, de carnosina 200 mM diluída em DMEM. O meio das culturas controles continha as mesmas concentrações de SFB e NaHCO_3 usadas

nas culturas tratadas com carnosina. Após o tratamento, as culturas eram reconduzidas à estufa para incubação até o preparo dos ensaios.

4.8 - Elaboração de curvas de crescimento da população de células MRC-5 em culturas condicionadas com carnosina

A avaliação do perfil de expansão de culturas de células MRC-5 condicionadas e não condicionadas com carnosina, através de curvas de crescimento foi concebida como uma etapa inicial para o desenvolvimento dos experimentos posteriores. Para esses ensaios empregavam-se dois conjuntos de culturas de células MRC-5 #37, condicionadas e não condicionadas com carnosina 20 mM, para se preparar duas suspensões distintas. Essas suspensões foram usadas para se preparar novas culturas, em garrafas T-25, que evoluíam a partir de uma semeadura padrão de 20 000 células por cm² de área cultivável. A cada período de 24 horas, durante sete dias, tomavam-se duas garrafas de culturas de cada parâmetro, que eram processadas para fornecer suspensões individualizadas, e ter o rendimento celular avaliado através da contagem de núcleos. Para fazer contagem de núcleos pelo método de coloração pelo cristal violeta adaptou-se o procedimento para determinar o número total de células em culturas em suspensão, aplicado no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para as culturas estacionárias de células MRC-5 (Castilho & Medronho - comunicação oral - 2006). O método aplicado consistiu de preparação das suspensões celulares individualizadas de cada cultura, sedimentação das células por centrifugação, conforme descrito no item 4.5. As células foram ressuspensas em solução 0,5% de corante cristal violeta (Merck – Alemanha) com 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, EUA) em solução 0,1M de ácido cítrico (Sigma-Aldrich, EUA) e homogeneizadas com auxílio de pipetas até a observação da exclusão dos núcleos. Os núcleos foram contados em câmara de Neubauer (Doyle & Griffiths, 1998). Para a consolidação dos resultados considerou-se o valor médio do número de células de cada duas culturas.

O perfil de crescimento da população de células em cultivo foi definido, com auxílio do programa Excell (Microsoft professional XP, EUA) para o cálculo das médias e desvios padrão dos valores encontrados, bem como representá-los graficamente e avaliar o grau de confiança dos dados usados para traçar a reta representativa da fase de crescimento da curva de crescimento pelo coeficiente de correlação de Pearson.

4.9 - Avaliação da ação da carnosina na adaptação celular ao ambiente de cultivo, através da aplicação da técnica de eluição do corante de cristal violeta em culturas incipientes de células MRC-5

Neste trabalho, a técnica de eluição do corante cristal violeta (CVDE- do inglês, *Crystal Violet Dye Elution*) foi aplicada, para investigar a ação da carnosina em culturas incipientes de células MRC-5, por se incluir entre os métodos colorimétricos mais confiáveis para a avaliação do número de células viáveis em cultura, especialmente quando se objetiva avaliar a interferência de agentes químicos ou toxicidade (Doyle & Griffiths, 1998). Sua aplicação, neste estudo, foi fundamentada no procedimento descrito por Ramos (1994), e consistiu basicamente, na preparação de culturas de células MRC-5 #37 em seis microplacas de 24 poços e no monitoramento da evolução dessas culturas por um período de 72 horas através da técnica de CVDE.

Para se preparar as suspensões de células condicionadas e não condicionadas com carnosina 20 mM usadas para semear as seis microplacas usadas neste experimento seguiu-se a seqüência de procedimentos descritos anteriormente, nos itens 4.5 e 4.7. Em cada microplaca preparada existiam duas séries de culturas MRC-5 #37, condicionadas e não condicionadas com carnosina 20 mM constituídas por dois poços com culturas semeadas com as seguintes densidades celulares: 80 000, 40 000, 20 000, 10 000 e 5 000 células por cm². O diagrama de distribuição diferenciada desses parâmetros de cultivo nas placas está representado na figura 4.1. Depois de preparadas as microplacas contendo

as culturas de células MRC-5 foram incubadas a 37°C em estufa com ambiente úmido contendo 5% de CO₂.

A cada período de 24 horas, durante três dias, duas placas com as culturas foram retiradas, fixadas com solução 2,5% de formaldeído (VETEC, Brasil) em PBS, pH 7.4 e coradas com solução 0,05% de cristal violeta. O corante absorvido pelas culturas de cada poço da placa foi, posteriormente, eluído com um mL de solução 1% de ácido clorídrico (HCl - Merck, Alemanha) em etanol (Merck, Alemanha). A absorbância do cristal violeta eluído foi determinada em espectrofotômetro BioRad modelo 3550 – UV, usando filtros para comprimento de onda (λ) de 490 nm. A absorbância do corante eluído de cada uma das culturas foi definida pela média aritmética da leitura de quatro amostras. Aplicou-se o programa Excell para se definir, graficamente, a correlação entre a absorbância e a concentração de cristal violeta eluído, em mg / 100 mL de solução de corante em 1% de HCl em etanol, bem como para o processamento e análise dos dados obtidos.

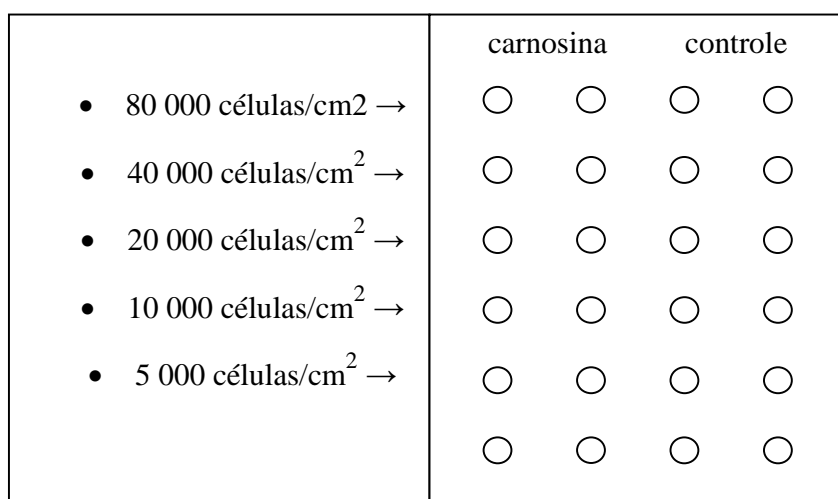


Figura 4.1. Diagrama de semeadura de células nas microplacas para o ensaio de CVDE.

4.10 - Avaliação da expressão da β -gal AS em culturas de células MRC-5, condicionadas com carnosina

Para se avaliar a expressão da β -gal AS em culturas de células MRC-5 condicionadas com carnosina aplicou-se três diferentes seguimentos técnicos que são descritos em seqüência.

O delineamento desses ensaios envolveu o condicionamento de culturas conforme descrito no item 4.7, para posterior preparo de culturas de células em garrafas plásticas T-25, que mantiveram o regime de condicionamento, anteriormente estabelecido, durante a pesquisa da atividade da β -gal AS.

De acordo com o protocolo proposto por Dimri e colaboradores (1995), em todos os ensaios para revelação da atividade da β -gal AS, foram incluídas amostras de culturas de células HeLa processadas da mesma forma que as culturas de MRC-5 testadas para servirem como controle negativo de reação.

4.10.1 - Caracterização da expressão protéica da β -gal AS nos tapetes de culturas de células MRC-5, condicionadas com carnosina, usando X-gal como substrato

Para a identificação da atividade da β -gal AS em células aderidas a superfície de cultivo, os tapetes celulares das culturas foram lavados com dois volumes de 10 mL de PBS (pH 7.4) e fixados por 30 minutos com 2.5% de formaldeído em PBS (pH 7.4). Depois de lavadas as culturas foram recobertas com 1,9 mL de uma solução tampão 0,1M de Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 , pH 6.0, contendo 40 mM de ácido cítrico (Merck, Alemanha), 5 mM ferricianeto de potássio [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - Merck, Alemanha], 5mM ferrocianeto de potássio [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ - Merck, Alemanha], 150 mM NaCl e 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2 - Merck, Alemanha).

Para a revelação histoquímica da atividade da β -gal AS foram acrescentados 100 μL . de uma solução estoque de substrato, contendo 20 mg de

X-gal (Invitrogen, EUA) por mL de N,N-dimetilformamida (Applied Biosystems, EUA).

As culturas controles foram submetidas ao mesmo processo, porém, o substrato X-gal estava ausente na solução de reação. Após um período de incubação, entre 13 e 16 horas a 37°C, as reações foram interrompidas com a lavagem dos tapetes celulares com PBS (pH 7.4). Após a lavagem das culturas, os tapetes de células foram recobertos com uma fina camada de uma solução 70% de glicerol (2 mL para 25 cm² de cultura de células), e as garrafas contendo as amostras testadas passaram a serem mantidas em ambiente refrigerado objetivando a preservação do estado de reatividade da β gal AS para o posterior registro de imagens (PROMEGA, 2006).

A positividade do teste para a atividade da enzima β -galactosidase AS (β -gal AS+) é definida pela quebra enzimática do substrato X-gal gerando moléculas de galactose e indoxil, que por sua vez é oxidado no meio de reação para formar uma coloração azul intensa.

O processamento das imagens obtidas nesses ensaios foi realizado sob a supervisão do Dr. Renato Sérgio Marchevski (LANEU), através de microscopia de luz em microscópio Leica Amexa e sistema de análise de imagens Qwin Standard.

4.10.2. Avaliação da distribuição da atividade da β -gal AS entre as células de suspensões obtidas pelo processamento de culturas de células MRC-5, condicionadas com carnosina, usando X-gal como substrato

O emprego da histoquímica para demonstrar a atividade da β -gal AS em células em suspensão teve o intuito de estimar, qualitativa e quantitativamente, a forma como a expressão desta enzima é distribuída nas culturas testadas. Assim, as culturas condicionadas conforme descrito no item 4.7, foram processadas enzimaticamente para gerar as suspensões celulares examinadas. As células em suspensão foram fixadas, lavadas e submetidas ao processo de revelação da atividade da β -gal AS conforme descrito no item (4.6.1). Nesse ensaio a

concentração de X-gal por volume da amostra de suspensão de células analisada foi corrigida proporcionalmente, de acordo com o protocolo descrito por MacGregor e colaboradores (1991), de forma a relacioná-la a concentração celular por área de cultivo aplicada nas culturas de onde foram originadas. Depois de processadas, as suspensões celulares foram observadas ao microscópio para se estimar a percentagem de células em processo de expressão da enzima, bem como caracterizar, através da variação na intensidade de cor, diferenças no nível dessa atividade entre as células positivas para o teste.

4.10.3. Avaliação quantitativa da atividade da β -gal AS em extratos celulares obtidos de culturas de células MRC-5, condicionadas com carnosina, usando ONPG como substrato

Para se quantificar a atividade da β -gal AS em extratos de células de culturas condicionadas com carnosina, item 4.7, aplicou-se um procedimento baseado no protocolo proposto por MacGregor e colaboradores (1991), que utiliza ONPG (Sigma-Aldrich, EUA) como substrato para quantificar esta atividade enzimática em termos de formação de nMol de o-nitrofenol por tempo de reação e concentração de proteína total em extratos celulares. O procedimento foi adaptado para avaliar essa atividade em pH 6.0, que é característico da β -gal AS, através de mudanças na composição do tampão usado para diluir as amostras, que passou a conter 2 mM de $MgCl_2$) em substituição aos sais de cloreto de manganês ($MnCl_2$) e sulfato de magnésio ($MgSO_4$) (Bucley *et al.*, 2004).

O processamento das culturas para a obtenção das amostras de extrato de células pode ser descrito de forma breve nas seguintes etapas: preparou-se a massa de células para obtenção dos extratos fazendo a dispersão enzimática da monocamada de células (item 4.5); as células foram ressuspensas em um mL de solução tampão de fosfato 0,1 M, pH 6.0, contendo 0,1% de Triton X100, rompidas por três ciclos de congelamento e descongelamento alternados por homogeneização em agitador de tubos, tipo *vortex* à velocidade máxima; e a

clarificação dos extratos das células foi feita por centrifugação (15 000 x g) por quatro minutos a temperatura laboratorial (aproximadamente 23°C) em microcentrífuga (Eppendorf, EUA). Os extratos de células foram mantidos em freezer com temperatura interna regulada para -70°C.

A quantificação de proteína total nos extratos foi feita pelo método de Bradford, utilizando o reativo Bio-Rad [Bio-Rad protein assay, EUA (Bradford, 1976)].

Para a reação de quantificação da atividade β -gal AS, 200 μ L de cada amostra testada foi diluído em 600 μ L na solução de reação: PBS 0,1 M, pH 6.0, contendo 1 mM de $MgCl_2$, 50 μ L de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EUA), e acrescentou-se 200 μ L de uma solução estoque de substrato, contendo 4 mg/mL de ONPG. Nas amostras controle, o substrato foi substituído por solução de reação. A reação foi incubada por 16 horas a 37 °C, e interrompida pela adição de 500 μ L de solução 1M de carbonato sódio (Na_2CO_3 - VETEC, Brasil).

A leitura dos testes foi feita pela determinação da absorbância da solução de reação em comprimento de onda (λ) de 420 nm, usando-se espectrofotômetro (Genesis, Thermo spectronic modelo 10 UV.scanning, EUA), e os resultados foram tabulados e processados graficamente com auxílio do programa Excell (Microsoft professional XP, EUA).

4.11. Propagação de cepas vacinais do vírus da rubéola, Wistar RA27/3, em culturas de células MRC-5, condicionadas com carnosina

Para avaliar se o condicionamento pela carnosina interfere na capacidade de células MRC-5 propagarem amostras vacinais do vírus da rubéola, elegeu-se a cepa RA27/3 (Plotkin & Beale, 1976; Plotkin & Reef, 2004), como agente viral infeccioso. Essa escolha baseou-se, entre outros fatores, na identificação desta cepa vacinal com o modelo tecnológico adotado por Bio-Manguinhos para produzir a vacina TVV. A cepa RA27/3, por ser vacinal, apresenta riscos limitados e tem como características: um potencial infeccioso conhecido e a capacidade de se

propagar em células MRC-5. Sua propagação em células MRC-5 não é acompanhada de efeito citopático (CPE – do inglês, *cytopathic effect*) aparente, fato que favorece a obtenção de suspensões virais com baixo teor de detritos celulares, embora requisite um indicador da propagação viral.

Neste ensaio, foram inoculadas culturas de células RK13 com as mesmas suspensões de vírus RA27/3 usadas para infectar as culturas de células MRC-5, para servirem como um parâmetro comparativo para a produção de vírus e como um indicador da propagação viral, uma vez que nesse substrato celular a infecção por vírus da rubéola é acompanhada por intenso CPE.

Assim, amostras de culturas de células MRC-5 #37 e RK13 #45 condicionadas e não condicionadas com carnosina 20 mM, preparadas em garrafas T-25, foram utilizadas para avaliar a interferência do condicionamento pela carnosina na propagação da amostra RA27/3 do vírus da rubéola.

Para infecção dessas culturas, empregou-se os procedimentos usuais em práticas virológicas que, inicialmente, consistiu na determinação do número de células em cultivo para se estabelecer a relação de multiplicidade de Infecção (MOI - do Inglês, *Multiplicity of Infection*) entre vírus e células. A seguir, prepararam-se suspensões resfriadas de vírus RA27/3 de forma que possibilitassem infectar as culturas selecionadas com uma relação de infecciosidade de 0,1 ou 0,01 MOI. As culturas selecionadas tiveram suas monocamadas lavadas com dois volumes seqüenciais de 10 mL de PBS, em pH 7.4, inoculadas com 1 mL de suspensão viral, conforme demonstrado no esquema da tabela 4.1.

A adsorção viral foi feita durante uma hora, mantendo-se as culturas inoculadas em temperatura de laboratório, aproximadamente 23°C. Após a adsorção, o meio nutriente das células foi recomposto, reduzindo para 2% o teor de SFB na composição original, e as culturas incubadas a 33°C. A partir do sexto dia de infecção, as culturas de células RK13 passaram a ser inspecionadas por microscopia (microscópio Zeiss modelo Axiovert, Alemanha) para se detectar o advento e a evolução de CPE. A plena difusão do CPE pela monocamada de células RK13, no oitavo dia de infecção, determinou o tempo de colheita dos

sobrenadantes das culturas, considerados como suspensões virais produzidas nas diferentes condições avaliadas. Amostras das suspensões virais, obtidas na culturas MRC-5 e RK13 infectadas, foram clarificadas por centrifugação por 10 minutos (3 200 x g), foram preservadas a -70°C para , posteriormente, serem submetidas ao teste de potência viral pelo LACOM. Em linhas gerais o teste de potência viral aplicado em suspensões de vírus vacinais da rubéola, pela técnica de microtitulação usada no LACOM, consiste na determinação da dose citotóxigena para 50% (CCID₅₀) das culturas de células RK13 inoculadas.

Tabela 4.1 Diagrama da organização do procedimento para infecção de culturas de células MRC-5 e RK13 com cepas vacinais de vírus da rubéola (WistarRA27/3)

célula	condicionamento	Multiplicidade de infecção
MRC-5	carosina (20 mM)	0,1 MOI 0,01 MOI
	controle (sem carosina)	0,1 MOI 0,01 MOI
RK13	carosina (20 mM)	0,1 MOI 0,01 MOI
	controle (sem carosina)	0,1 MOI 0,01 MOI

O princípio da técnica pode ser descrito nos seguintes passos: preparo de cultura de células RK13 em microplacas de 96 poços (Falcon, EUA) com uma antecedência de 24 horas em relação ao ensaio; preparo dos inóculos a partir de cada amostra analisada, aplicando-se um fator de um para dez (1:10) para fazer

diluições seriadas das amostras; inoculação de pelo menos cinco culturas de células RK13, contidas nos poços da microplaca, com 0,1 mL de cada diluição da amostra a ser testada; incubação das placas contendo as culturas inoculadas a 33°C em estufa com ambiente interno úmido e 5% de CO₂; leitura do teste, pela pesquisa de CPE após nove dias de incubação e cálculo do título de potência viral pelo método de Reed-Muench (1938).

5 - RESULTADOS

5.1- Adequação da cultura de células MRC-5, ao modelo de estudo

Após o período de adaptação das células MRC-5 ao meio DMEM, as culturas de demonstraram um rendimento insatisfatório, não ultrapassando taxas de expansão de quatro novas garrafas para cada uma de cultura de células processada. A adoção de medidas para minimizar a ação residual da tripsina sobre as células e facilitar a troca gasosa entre o meio de cultivo e o ambiente da estufa resultou em melhoria significativa na qualidade das culturas. No período inicial, a formação da monocamada de células progredia lentamente, atingindo um nível de confluência satisfatório em tempo superior a oito dias, e essas melhorias agilizaram a evolução dos trabalhos ao diminuir o intervalo entre os subcultivos para seis dias (figura 5.1).

5.2 - Preparo de bancos de amostras de suspensões de células MRC-5 para o trabalho

A partir de culturas de MRC-5 #31 e #33 foram preparados dois bancos primários de células de trabalho nas #34 e #36. Esses bancos primários serviram de base para expandir as culturas e formar outros bancos celulares para servir de parâmetros diferenciados de níveis senescência entre as culturas.

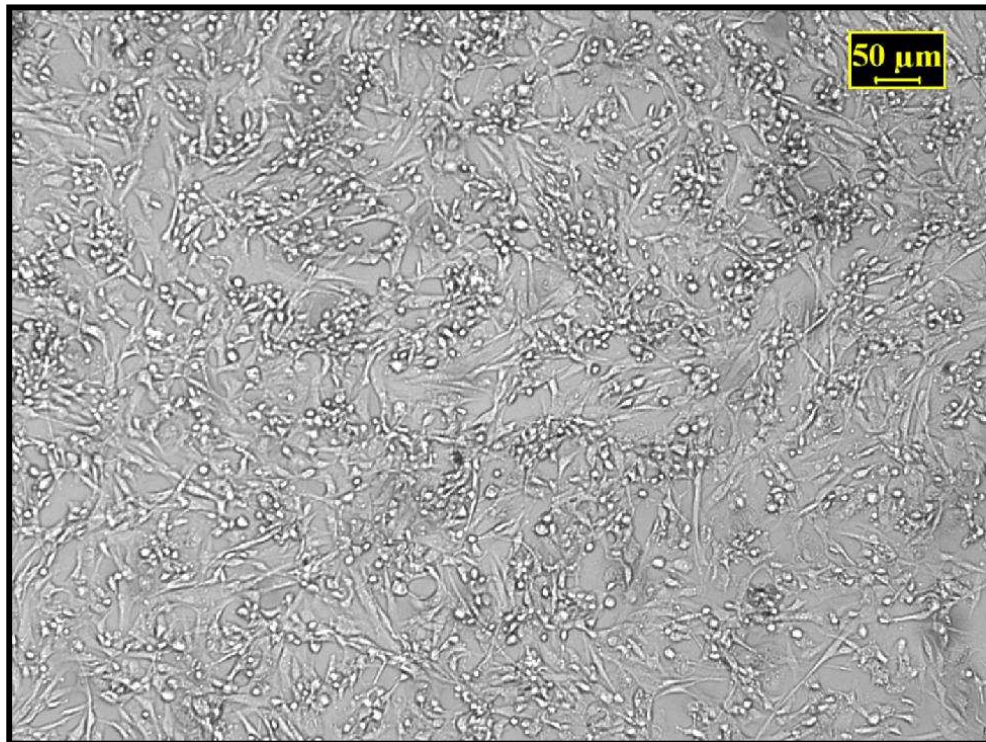


Figura 5.1 Cultura de células MRC-5 # 35, adaptadas ao meio DMEM, em fase de expansão (microscopia de luz - microscópio Leica Ameixa/sistema de análise de imagens Qwin Standard).

No curso do subcultivo das culturas, para se obter células com um maior grau de senescência, observou-se, a partir da passagem 42, a instalação progressiva de um quadro típico do fenômeno de senescência replicativa. As culturas tendiam a permanecer em um estágio de sub-confluência, com muitas células se destacando da monocamada para formar detritos no sobrenadante, enquanto outras, com diferentes formas e tamanhos, permaneciam aderidas à superfície de cultivo e apresentavam várias inclusões celulares (figura 5.2).

Para se prover o estudo da ação da carnosina sobre células MRC-5 em estágio mais avançado de senescência preparou-se um banco de células na passagem 49. Contudo, as culturas preparadas a partir da reconstituição de amostras de células desse banco, apresentavam um alto grau de degeneração e um baixo potencial proliferativo que, inviabilizaram a sua aplicação (figura 5.2b).

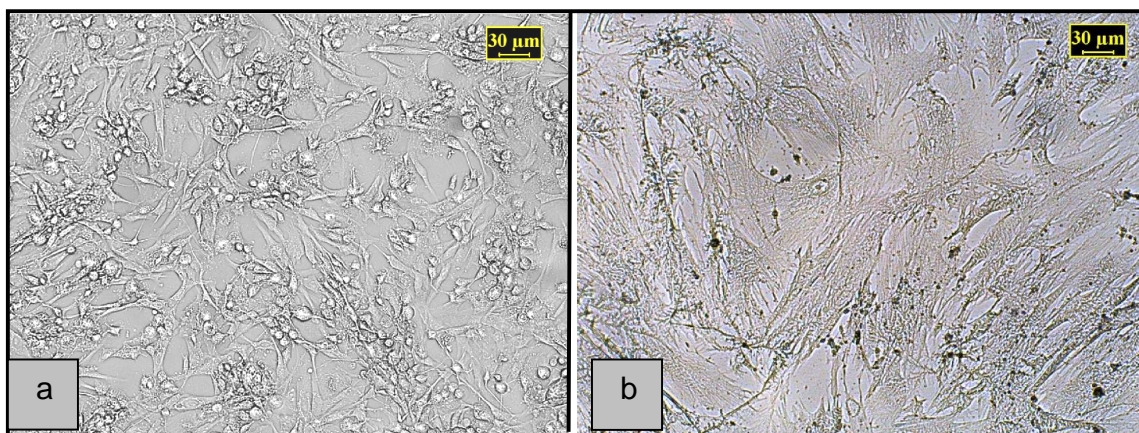


Figura 5.2. Aspectos da organização das células sobre a superfície de cultivo: a) células MRC-5 #35 em estágio de crescimento normal b) células MRC-5 #49 em estágio senescência replicativa (microscopia de luz - microscópio Leica Ameixa/sistema de análise de imagens Qwin Standard).

5.3 - Avaliação da ação da carnosina sobre a cinética de crescimento de culturas de células MRC-5 #37

As curvas de crescimento, na forma aqui apresentada, demonstram a evolução das culturas de células MRC-5 #37, condicionadas e não condicionadas com carnosina, por um período de sete dias. Os resultados obtidos em dois ensaios estão consolidados na tabela 5.1, que foi organizada no sentido de valorizar a relação entre o tempo de cultivo e a densidade celular das culturas testadas. Na tabela, associou-se a expressão DMEM/carnosina à coluna da amostra teste para indicar o condicionamento do meio de cultivo dessas culturas com carnosina 20 mM, e diferenciá-lo da amostra controle. Os valores da densidade celular, células/cm², representam, individualmente, o valor médio da contagem de núcleos das células de pelo menos quatro culturas.

A última coluna da tabela 5.1 mostra a relação percentual entre a densidade celular das culturas, células condicionadas com carnosina frente aos controles, para favorecer a avaliação comparativa entre os dois parâmetros testados.

Tabela 5.1. Avaliação do efeito da Carnosina (20 mM) sobre a cinética de crescimento de células MRC-5 #37.

Tempo de cultivo	Amostra teste DMEM/carnosina Células/cm ²	Amostra controle DMEM Células/cm ²	Relação entre as amostras carnosina/controle %
Dia 1	12 075	15 850	76,2
Dia 2	13 363	18 325	72,9
Dia 3	21 775	31 725	68,6
Dia 4	28 150	36 875	76,3
Dia 5	40 266	43 600	92,5
Dia 6	46 300	49 150	94,2
Dia 7	59 450	55 950	106,3

Os resultados revelam que no primeiro dia de cultivo, recuperou-se em média 12 075 células por cm² nas culturas condicionadas com carnosina o que representa aproximadamente 60,3% da concentração de células semeadas. Nas mesmas condições a recuperação celular nas culturas controles apresentou um número médio de 15 850, e corresponde a 79,25% das células originalmente semeadas. A relação entre o número de células condicionadas com carnosina recuperadas no primeiro dia de cultivo, e as culturas controles foi de 76,2%.

Esse quadro pouco se altera no segundo dia de cultivo para as culturas condicionadas com carnosina, uma vez que se obteve uma densidade de 13 363 células por cm², 66,81% da concentração semeada. Nas culturas controle, entretanto, verificou-se uma densidade de 18 325 células por cm² que se aproxima ao número semeado. Nessas condições a relação entre o número de células condicionadas com carnosina e não condicionadas com carnosina sofreu uma retração adicional, passando de 76,18 a 72,9%.

No terceiro dia verifica-se que o decaimento na relação entre o número de células condicionadas com carnosina em relação às culturas controle foi de 68,6%, o que foi interpretado como consequência de um possível retardamento no início da fase de crescimento exponencial das culturas condicionadas com a

carosina. A partir do terceiro dia de cultivo, a densidade celular, nas condições testadas, tende ao equilíbrio, com a relação entre índices das culturas mostrando um crescimento contínuo de 76,3%, 92,5%, 94,2% e 106,3%. Ainda em relação aos dados da tabela 5.1 verifica-se pelos dados do dia 7, uma aproximação entre os números médios finais, ou seja, 59 450 células por cm^2 para as culturas condicionadas com carosina e 55 950 células por cm^2 para as culturas não condicionadas com carosina.

A evolução da densidade celular em função do tempo de cultivo para cultura de células MRC-5 condicionadas e não condicionadas com carosina é a apresentada graficamente na figura 5.3. A figura ressalta que a maior diferenciação entre os perfis de crescimento das duas culturas ocorre nos primeiros três dias de incubação, isto é, no período de adaptação das células a um ambiente renovado pelo subcultivo.

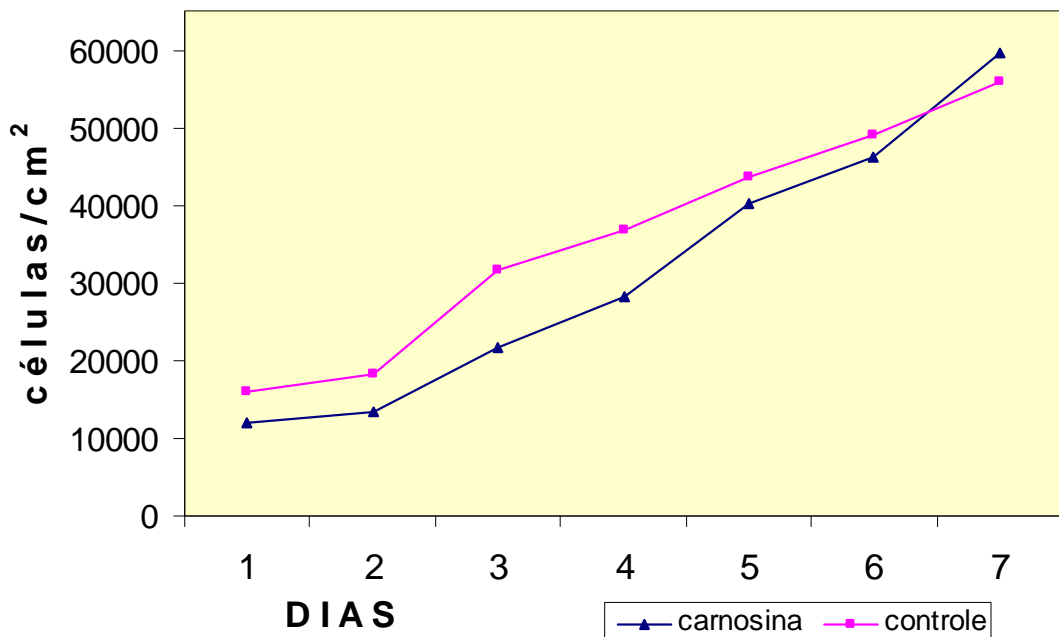


Figura 5.3. Cinética de crescimento - Células MRC-5 #37 condicionadas e não condicionadas com carosina (20 mM).

Na figura 5.4, os dados da tabela 5.1 foram tratados de forma a ressaltar a fase de crescimento exponencial das culturas condicionadas e não condicionadas com carosina, eliminando-se os resultados dos dois primeiros dias de cultivo, e

assim caracterizar as diferenças em potencial de crescimento das células sob o regime de condicionamento avaliado. A linearização das curvas, a partir do terceiro dia de cultivo, ou seja, em condições não limitantes de crescimento, demonstra uma maior inclinação de reta para a representação das culturas condicionadas com carnosina ($y = 9\ 350 x + 11\ 138$; e um coeficiente de correlação $R^2 = 0,985$) em relação ao controle ($y = 6\ 072,5 x + 25\ 243$; com $R^2 = 0,998$).

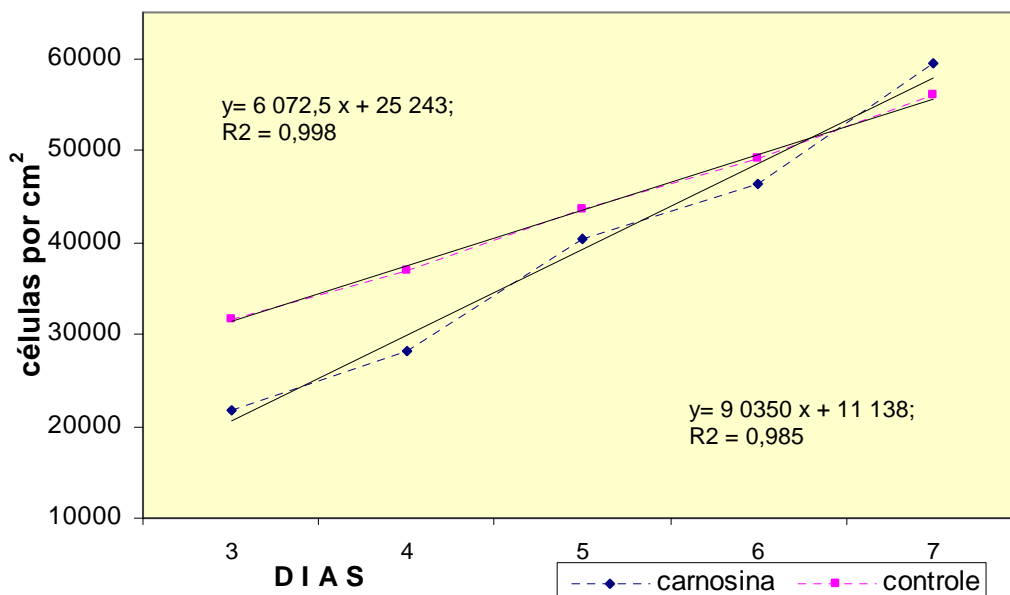


Figura 5.4. Fase de crescimento exponencial das culturas de células MRC-5 condicionadas e não condicionadas com carnosina (20 mM).

As culturas de células MRC-5 (#45, #47 e #49), usadas para preparar curvas de crescimento, não evoluíram, e inviabilizaram a avaliação do efeito da carnosina sobre as células com maior grau de senescência. Ainda assim, as culturas de células MRC-5 #45 preparadas para elaboração de curva de crescimento foram monitoradas quanto à variação do número de células por área cultivada em função do tempo de cultivo. O resultado desse monitoramento está descrito na tabela 5.2. A abreviação do tempo de monitoramento dessas culturas foi resultado da deficiência de rendimento do cultivo das células na passagem

anterior, que não permitiram o preparo de um número adequado de amostras para o ensaio. Esses dados mostram que nas culturas onde o processo de senescência replicativa se manifestou de forma acentuada, o número de células aderidas à superfície de cultivo manteve-se, sistematicamente, muito abaixo da quantidade de células semeadas.

O número médio de células aderidas no período, nas culturas condicionadas com carnosina foi de 2 652 por cm^2 , com um desvio padrão de 653,57. As culturas controles apresentaram uma média de 3 402 células por cm^2 e um desvio padrão de 1 944,35. Os valores médios do número de células recuperado nas culturas condicionadas com carnosina e controle representam, respectivamente, 13,26% e 17,01% das 20 000 células/ cm^2 semeadas. No entanto, esses valores podem variar, amplamente, conforme sugerem os altos valores dos desvios padrão em relação à média, 24,64 e 54,15% na ordem descrita acima.

Tabela 5.2. Variação do número células MRC-5 # 45 na presença de carnosina, e em função do tempo de cultivo.

	Amostra teste DMEM/ carnosina	Amostra controle DMEM
Tempo de cultivo	Células/ cm^2	Células/ cm^2
Dia 1	2700	1450
Dia 2	3600	6650
Dia 3	2825	3225
Dia 4	2950	4013
Dia 5	2063	3688
Dia 6	1775	1388
média	2652	3402

5.4 - Avaliação da ação da carnosina no processo adaptativo de culturas de células MRC-5 # 37, ao ambiente de cultivo pelo emprego da técnica de CVDE

A técnica de CVDE foi usada para investigar os efeitos da carnosina sobre a fase inicial do processo de novas culturas de células MRC-5 #37. Através da aplicação dessa técnica em culturas incipientes foi possível estabelecer correlações entre o tempo de cultivo, concentração de células usadas na semeadura, concentração de corante eluído e o índice de eluição de corante entre as culturas condicionadas e não condicionadas com carnosina.

Um exemplo da forma de coloração obtida nesses ensaios demonstrando alterações do padrão de coloração de culturas de células MRC-5#37 condicionadas e não condicionadas com carnosina em função do tempo de cultivo e concentração de células semeadas é mostrado na figura 5.5.

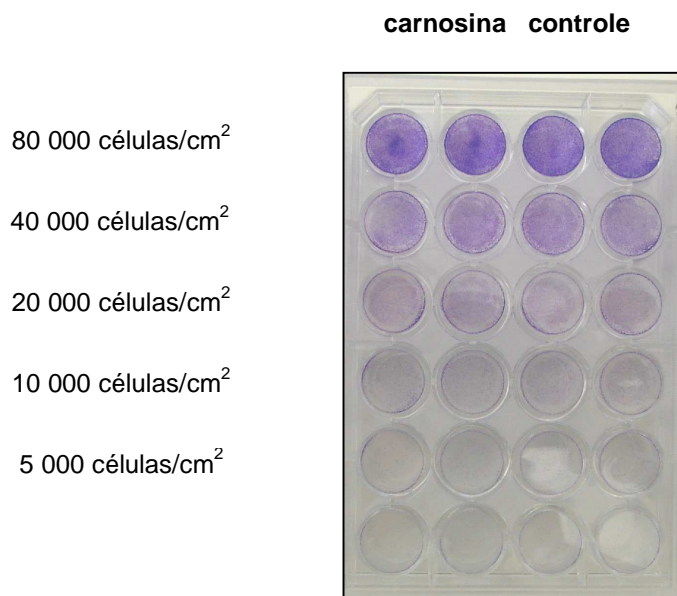


Figura 5.5. Fotografia digitalizada demonstrando o padrão de coloração observado no teste de eluição de cristal violeta em culturas de células MRC-5 #37 condicionadas e não condicionadas com carnosina.

As informações obtidas nesses ensaios foram condensadas na tabela 5.3, de forma a ressaltar a relação entre o teor de cristal violeta eluído das culturas condicionadas com carnosina e as células controles. A organização da tabela 5.3

apresenta duas linhas mestras de orientação para as informações nela contidas: o tempo de cultivo, na primeira coluna, e o arranjo seqüencial das condições de semeadura das culturas, na primeira linha. O tempo de cultivo é descrito em dias enquanto a semeadura é apresentada na forma de células por cm². O elo entre essas duas linhas mestres se faz através de um chaveamento definido pelos parâmetros usados nas tabelas anteriores: o condicionamento das culturas com carnosina, as culturas controle, bem como o percentual de corante eluído das culturas condicionadas com carnosina em relação ao teor de cristal violeta captado nas culturas controle.

Tabela 5.3. Avaliação da ação da carnosina sobre a fase inicial do cultivo de células MRC-5 #37 pela técnica de eluição do corante de cristal violeta.

semeadura		80000 Cels./cm ²	40000 Cels./cm ²	20000 Cels./cm ²	10000 Cels./cm ²	5000 Cels./cm ²
dia 1	carnosina	49,13	39	35,76	31,3	28,86
	controle	66,16	51,16	47,11	40,62	37,38
	carn/contr	74,26%	76,23%	75,90%	77,05%	77,22%
dia 2	carnosina	61,7	46,3	37,78	25,22	21,16
	controle	73,05	67,78	56,03	42,24	36,16
	carn/contr	84,46%	68,31%	67,43%	59,71%	58,52%
dia 3	carnosina	73,46	56,43	46,3	36,16	31,7
	controle	91,3	71,84	55,22	45,08	41,03
	carn/contr	80,46%	78,56%	83,85%	80,22%	77,27%

Os valores em negrito representam a concentração de corante eluído das culturas. (mg/100mL de solução)

A relação entre a densidade ótica medida em $\lambda = 490$ nm e a concentração do cristal violeta foi determinada graficamente estabelecendo-se a equação: concentração de cristal violeta = $(0,8108 \times DO + 0,024) \times 1000$ para ser expressa em mg/100 mL de solução.

Assim, pelos dados da tabela 5.3 verifica-se em todas as condições analisadas, que o teor de corante eluido das culturas condicionadas com carnosina é inferior aos observados nas culturas não condicionadas com o dipeptídeo.

A representação gráfica desses resultados na figura 5.6 evidencia a menor captação de corante pelas culturas condicionadas com carnosina na primeira fase de cultivo e assinala possíveis alterações na captação de corante, e conseqüentemente de crescimento, pelas culturas semeadas com um número inferior a 20 000 células por cm^2 , especialmente quando condicionadas com carnosina. Nesse contexto, pode-se constatar através dos dados da tabela 5.3, que no início da cultura, os índices de absorção de corante absorvido pelas culturas condicionadas com carnosina em relação aos controles mantêm-se em um mesmo patamar, independentemente da concentração de células semeadas. Desta forma, ficou caracterizado, que no primeiro dia de cultivo as culturas condicionadas com carnosina retiveram em média 76,13% da concentração de corante absorvido pelas culturas controle, observação que pode ser transposta para o índice de sobrevivência das células no primeiro dia de cultivo.

No segundo dia de cultivo observa-se que a seqüência decrescente dos índices de absorção de cristal violeta das células tratadas com carnosina em relação às não expostas ao dipeptídeo, 84,46%; 68,31%; 67,46%; 59,71%; 58,52%; guardam alguma relação com a série de concentrações celulares usadas na semeadura. Essa seqüência decrescente também foi inversamente relacionada à concentração de carnosina por célula semeada.

No último período analisado, verifica-se que a defasagem entre a concentração de corante eluido de culturas condicionadas por carnosina e controles retorna a uma posição de equilíbrio, com um índice médio de 80,07%, entre as diferentes condições de semeadura.

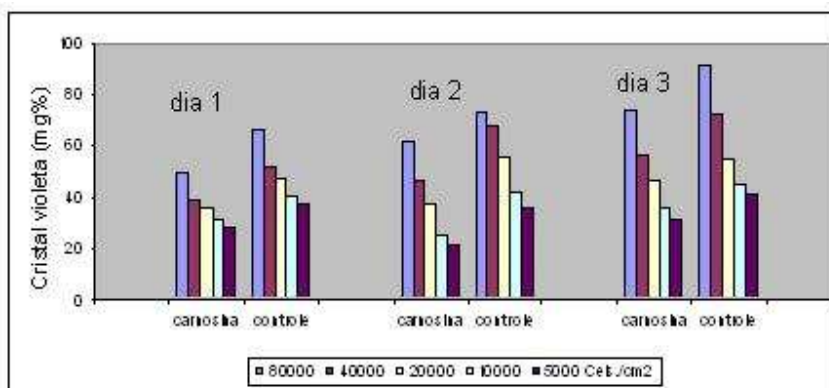


Figura 5.6. Captação de cristal violeta por culturas incipientes de células MRC-5, em função do condicionamento com carnosina (20 mM).

No período observado, verifica-se também, que as seqüências numéricas referentes aos teores de corante eluido das culturas, condicionadas com carnosina e controles, mantêm uma correlação com a série que descreve as variações na concentração celular usada na semeadura. Uma correlação similar é observada entre o teor de cristal violeta eluido das culturas e o tempo de cultivo, nas condições onde as culturas são semeadas com concentrações celulares iguais ou superiores a 20 000 células por cm². As exceções a esse comportamento são verificadas em culturas semeadas em condições de baixa densidade celular.

5.5. Caracterização da expressão β -gal AS no tapete de culturas de células MRC-5, condicionadas com carnosina, usando X-gal como substrato

Nos três ensaios onde se pesquisou a expressão da β -gal AS em células MRC-5 dispostas na forma de monocamadas sobre a superfície de cultivo, a atividade desta enzima foi revelada pela marcação de uma fração dessas células com a coloração azul, característica do cromógeno gerado em consequência da hidrólise enzimática da molécula de X-gal.

A aplicação desse método mostrou-se eficiente para caracterizar imagens de efeitos resultantes da atividade da β -gal AS, porém não foi capaz de diferenciar

amostras condicionadas e não condicionadas com carnosina quanto à capacidade de expressar a enzima, como pode ser verificado na figura 5.7.

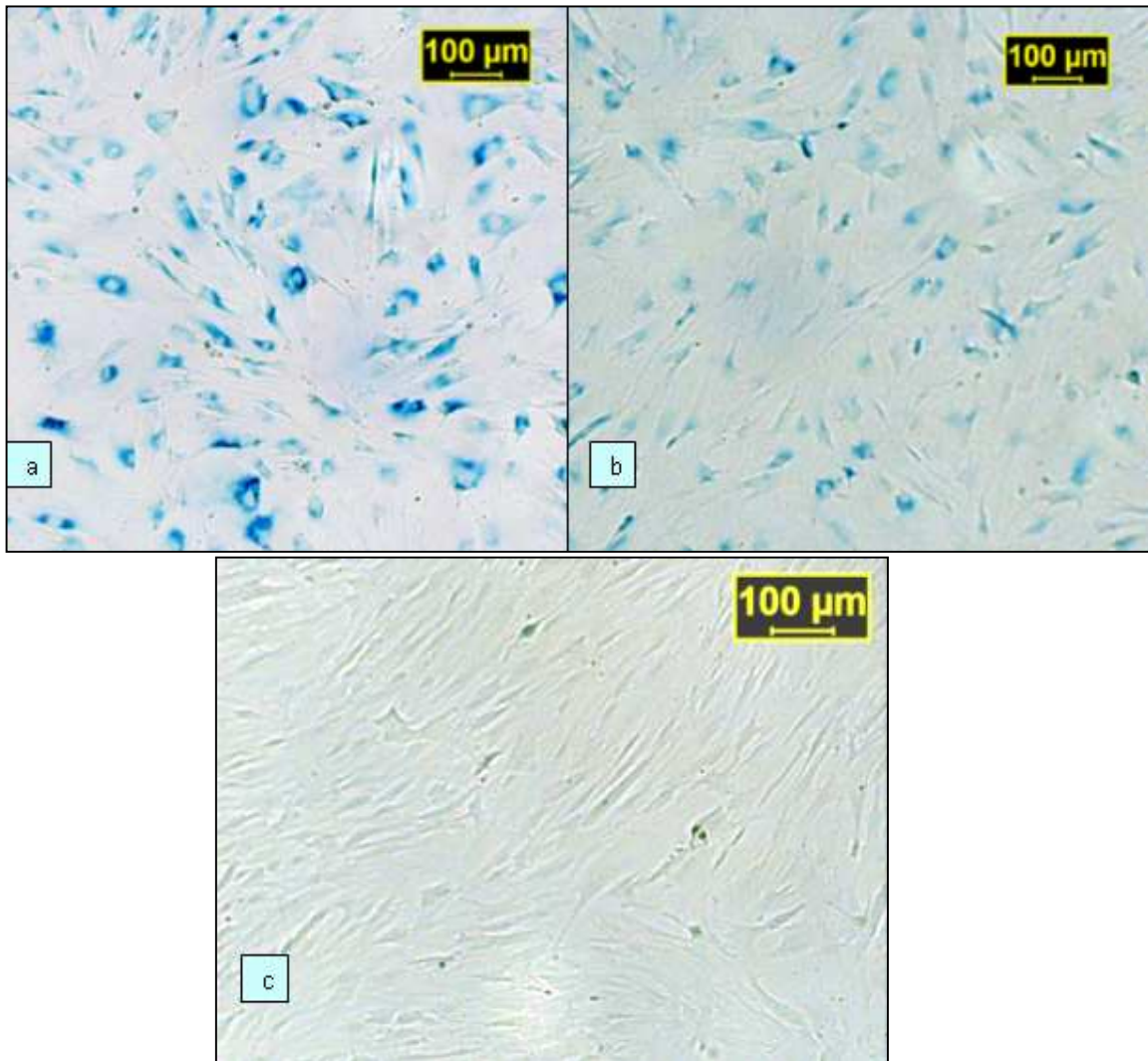


Figura 5.7. Revelação da atividade da enzima β -gal AS em células MRC-5 #37 pelo uso do substrato X-gal: (a) com carnosina (b) condicionadas sem carnosina e (c) controle negativo de reação (microscopia de luz- microscópio Leica Ameixa/sistema de análise de imagens Qwin Standard).

Nas duas condições observa-se que as células marcadas apresentam, intracelularmente, diferenças na tonalidade de azul, indicando diferenças na intensidade da atividade da β -gal AS entre elas. Observou-se também que entre diferentes ensaios, a intensidade da coloração azul, típica da positividade do teste,

pode variar, entretanto, mantêm-se o quadro de distribuição das células marcadas por toda a monocamada.

As culturas de células HeLa, condicionadas e não condicionadas com carnosina, inseridas no ensaio como controle negativo de reação para atividade de β -gal AS, não mostraram qualquer manifestação de cor passível de ser atribuída a expressão da enzima por essas células (dados não mostrados).

5.6 - Avaliação da distribuição da atividade da enzima β -gal AS entre as células de suspensões obtidas pelo processamento de culturas de células MRC-5, condicionadas com carnosina, usando X-gal como substrato

O método que utiliza o substrato X-gal para detectar a atividade de β -gal AS, quando aplicado em células individualizadas, obtidas pela dispersão enzimática da monocamada de culturas confluentes de células MRC-5 #37, mostrou-se mais adequado para caracterizar a distribuição da expressão da enzima na população celular.

Uma estimativa da positividade da reação na população de células é apresentada na tabela 5.4, que consolida as observações de quatro ensaios. Na avaliação do teste atribuiu-se o caráter β -gal AS+ para todas as células que, observadas ao microscópio, apresentaram a tonalidade azul característica do cromógeno resultante da hidrólise da molécula de X-gal, entretanto não foram consideradas as variações na intensidade da coloração.

Células originadas das culturas controle ou condicionadas com carnosina apresentaram uma mesma variabilidade de tons de azul, peculiar à positividade do ensaio reação. Em algumas células, independente da amostra analisada, o marcador de β -gal AS+ revelou-se de forma intensa, geralmente difundindo-se por toda a estrutura celular, enquanto em outras apresentava-se de forma mais esmaecida e limitada a algumas regiões.

Tabela 5.4.. Distribuição da atividade de β -gal AS em suspensões de células preparadas a partir de culturas condicionadas com carnosina e controles.

Células	Número de células observadas	Número de células β -gal AS+	% β -gal AS+
MRC-5 # 37 (carnosina)	1547	533	34,45
MRC-5 # 37 (controle)	1401	423	30,19
HeLa #128 (carnosina)	1282	7	0,55
HeLa #128 (controle)	1717	10	0,58

Dessa forma verificou-se que nas culturas condicionadas com carnosina, 34,45% das células observadas apresentavam-se β -gal AS+ , enquanto que na células originadas de culturas não condicionadas com carnosina, o percentual de células β -gal AS+ foi de 30,19%.

As células HeLa, usadas como controles de reação, não apresentaram a mesma configuração, e eventualmente, em menos de 1% do total analisado, observou-se focos puntiformes de coloração azul que não se identificavam com o padrão descrito para as células MRC-5, e foram inseridos na tabela a título de registro.

5.7 - Avaliação da atividade da enzima β -gal AS em extratos celulares de culturas de células MRC-5, condicionadas com carnosina usando ONPG como substrato

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade da β -gal AS em extratos de células MRC-5 #37 e HeLa #128, preparados a partir de culturas condicionadas e não expostas à carnosina usando ONPG como substrato, estão apresentados na tabela 5.5.

Nessa tabela, os resultados apresentados expressam a média aritmética dos valores da atividade β -gal AS obtidos nos diferentes extratos de células condicionadas com carnosina 20 e 40 mM, e das culturas controle. Em dois ensaios, foi analisado um total de 18 amostras de extratos de células MRC-5, separadas em grupos de seis, de acordo com o tipo de condicionamento das culturas. O valor atribuído a cada tipo de condicionamento representa o valor médio da atividade enzimática encontrado em seis amostras de extratos de células MRC-5, analisados em regime de duplicata.

Na tabela 5.5, a atividade enzimática da β -gal AS é apresentada em termos de nMol de *o*-nitrofenol formado por mg de proteína total por hora de reação. Pelos dados da tabela 5.5 verifica-se que o nível de atividade enzimática determinada nos extratos de células MRC-5 condicionadas com carnosina 20 mM são equivalentes aos encontrados nos controles, cujos valores médios foram, respectivamente, 9,099 e 9,569 nM de *o*-nitrofenol formado por hora. Nessa mesma ordem verifica-se que o desvio padrão entre as diferentes leituras das análises foi de 1,187 e 1,493, correspondendo respectivamente a 12,4 e 16,4% dos valores médios encontrados.

A atividade enzimática da β -gal AS nos extratos condicionados com carnosina 40 mM, o dobro da maior concentração fisiológica usualmente encontrada em humanos, foi de 6,925 nM por hora. Esse número é aproximadamente 76% do valor médio observado nos extratos de culturas controles. Considerando-se que o desvio padrão foi de 0,981, 14,16% do valor

médio das leituras, esses dados sugerem uma possível ação inibitória da carnosina sobre a expressão da β -gal AS por células MRC-5 senescentes.

Tabela 5.5. Avaliação da atividade da enzima β -gal AS em extratos de células MRC-5 condicionadas com carnosina.

Células	Condicionamento	*Atividade enzimática
MRC-5 #37	Carnosina 20 mM	9,569
MRC-5 #37	Carnosina 40 mM	7,091
MRC-5 #37	controle s/ carnosina	9,099
HeLa #128	Carnosina 20 mM	0,191
HeLa #128	Carnosina 40 mM	0,098
HeLa #128	controle s/ carnosina	0,15

* nMol de *o*-nitrofenol formado por mg de proteína total por hora

Os extratos de células HeLa, submetidas ao mesmo regime de condicionamento, foram incluídos como controle negativo da atividade de β -gal AS. A velocidade média de formação de *o*-nitrofenol, em consequência da exposição de extratos de células HeLa à presença do substrato ONPG, manteve-se em 0,147 nM por mg de proteína-hora, 1,62% do índice médio observado nos extratos de células MRC-5 não condicionadas com carnosina. Esse índice basal obtido em células HeLa, que caracteristicamente não senescem em razão de apresentarem atividade telomérica, foi usado como parâmetro para dimensionar

graficamente a expressão de β -gal AS nos extratos de células MRC-5 na figura 5.8.

Em um ensaio único, usando células MRC-5 na passagem 45, investigou-se a interferência da carnosina na expressão de β -gal AS em culturas com maior nível de senescência. O resultado desse ensaio, sumarizado na tabela 5.6 mostra que a atividade enzimática por mg de proteína aumentou de uma média de 9,099 para 28,868 nM de *o*-nitrofenol entre a passagem 37 e 45, um aumento de 217,25%, entre as culturas controle.

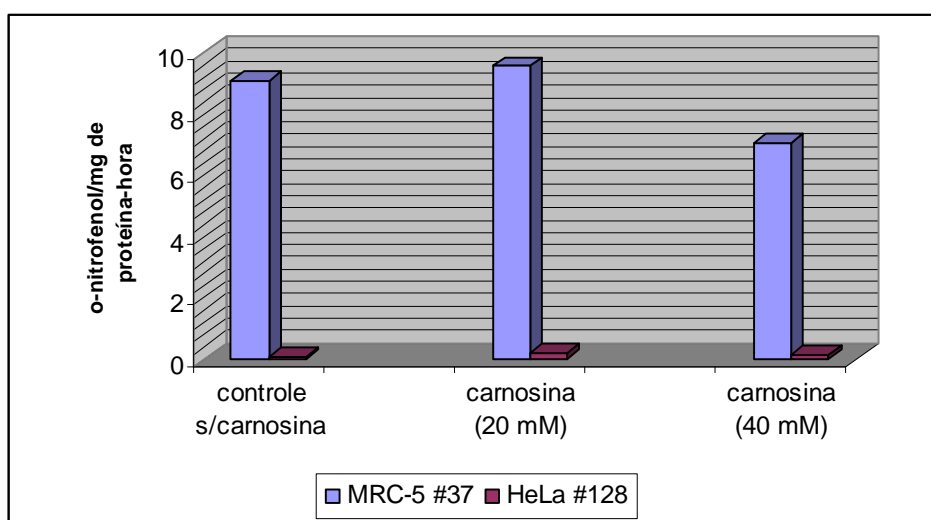


Figura 5.8. Avaliação da atividade da enzimática da β -gal AS em extratos de células MRC-5 e HeLa condicionadas com carnosina.

De maneira similar a atividade enzimática nas células tratadas com carnosina, respectivamente 20 e 40 mM, variou de 9,569 para 21,976 e de 6,925 para 17,979 nMol de *o*-nitrofenol formado por mg de proteína-hora.

Por outro lado, a variação nos índices de atividade enzimática observados entre as culturas na #45 assinala a possível existência de uma relação inversa entre a concentração de carnosina usada no condicionamento das células e o nível de expressão da β -gal AS.

Tabela 5.6. Correlação entre condicionamento com carnosina e a atividade enzimática de β -gal AS entre culturas de células MRC-5 nas passagens 37 e 45.

Condicionamento	Atividade enzimática *		Aumento na atividade enzimática da β -galAS (%)
	MRC-5 # 37	MRC-5 # 45	
controle s/ carnosina	9,099	28,867	217,25
carnosina (20 mM)	9,569	21,975	129,65
carnosina (40 mM)	7,091	17,978	153,53

* atividade enzimática= nMol de o-nitrofenol por mg de proteína-hora.

Na figura 5.9 destacam-se as discrepâncias entre o nível de atividade de β -gal AS observado entre extratos de células MRC-5 obtidos de culturas nas #37 e #45.

Verifica-se que a atividade enzimática nos extratos das células na #37, mesmo superando em mais de 50 vezes o nível basal observado em células HeLa, é muito inferior aos índices obtidos nas culturas da passagem 45. Na representação gráfica os níveis de expressão da β -gal AS nas células controles e nas condicionadas com carnosina 20 mM aparentam uma relação de equidade. Enquanto a discrepância entre a expressão da enzima indicadora nessas células e nas tratadas com carnosina 40 mM não se mostra casuística, principalmente quando se constata a linearidade do decaimento da atividade da β -gal AS entre os extratos preparados com culturas na passagem 45. A figura 5.9 ressalta uma

possível relação entre o decaimento da atividade da β -gal AS com o aumento na concentração do dipeptídeo usado no condicionamento das culturas com maior grau de senescência.

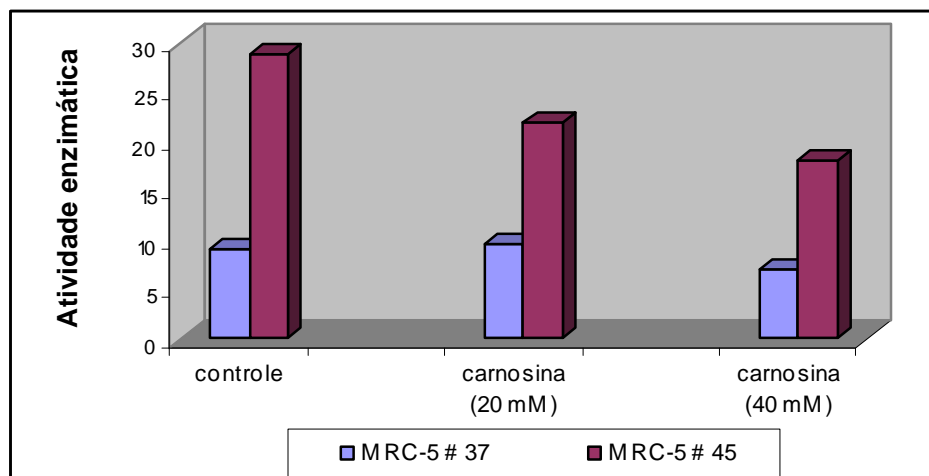


Figura 5.9, Relação entre a atividade enzimática de β -gal AS e o condicionamento com carnosina entre culturas de células MRC-5 (#37 e # 45).

5.8 - Avaliação da propagação do vírus vacinal da rubéola, WistarRA27/3, em culturas de células diplóides MRC-5, condicionadas e com carnosina

O resultado de dois ensaios distintos envolvendo a inoculação de culturas células MRC-5 na #35 e RK13 na #43, condicionadas e não condicionadas com carnosina 20 mM, com a cepa vacinal Wistar RA27/3 do vírus da rubéola estão organizados na tabela 5.7. Nessa tabela estão consolidados os testes de potência infecciosa de trinta e sete amostras de suspensões virais obtidas pela infecção de igual número de culturas, 26 de células MRC#35 e 15 de células RK13 #43.

Culturas de células MRC-5 na #35 e RK13 na #43, condicionadas com carnosina 20 mM e controles não expostos ao dipeptídeo, foram avaliadas quanto a capacidade de propagar a cepa vacinal RA27/3 do vírus da rubéola. Em dois ensaios, um total de 37 culturas confluentes, 26 de MRC-5 #35 e 15 de RK13 #43, preparadas em garrafas do tipo T-25.

A organização da tabela 5.7 privilegia o estabelecimento de relações diretas entre o tipo de células em cultivo, a presença ou ausência da carnosina como fator de condicionamento das culturas, a multiplicidade de infecção usada na inoculação das culturas, e o título infeccioso das suspensões virais obtidas.

O menor número de amostras produzidas pela infecção de culturas de células MRC-5 com 0,1 MOI se deve a eliminação de culturas estágio deficiente de confluência para a infecção. O título infeccioso de 4.04 Log CCID₅₀/mL atribuído à inoculação de células MRC-5 com 0,1 MOI representa o valor médio de dez amostras de suspensões virais distintas, com um desvio padrão de 0,2. Para as células não condicionadas com carnosina o título infeccioso foi de 4.05 Log CCID₅₀/mL, média aritmética de oito amostras com um desvio padrão de 0,09. Nas condições onde as culturas de células MRC-5 foram inoculadas com 0,01 MOI obteve-se, em ordem seqüencial, os títulos de 3,88 e 3,7 Log CCID₅₀/mL para as culturas condicionadas e não condicionadas com carnosina. Nesta seqüência, as amostras testadas foram em número de quatro para cada grupo e, os desvios padrão observados foram de 0,04 e 0,14.

Tabela 5.7. Avaliação da capacidade de células MRC-5 #35 e RK13 #43 produzir vírus vacinal da rubéola - RA27/3 – face o condicionamento de sua culturas com carnosina (20 mM)

célula	condicionamento	n° de amostras	MOI	Log CCID ₅₀ /mL
MRC-5	Carnosina (20 mM)	4	0,01	3,88 ± 0,2
		10	0,1	4,04 ± 0,2
	Controle	4	0,01	3,70 ± 0,2
		8	0,1	4,05 ± 0,2
RK13	Carnosina (20 mM)	4	0,01	4,65 ± 0,2
		4	0,1	4,28 ± 0,2
	Controle	3	0,01	4,55 ± 0,2
		4	0,1	4,18 ± 0,2

Os títulos médios das suspensões virais obtidas pela infecção das células RK13 condicionadas com carnosina e não expostas à presença de carnosina foram respectivamente: 4,65 e 4,55 Log CCID₅₀/mL para infecções com 0,01 MOI e de 4,28 e 4,18 Log CCID₅₀/mL para as culturas infectadas com 0,1 MOI. Esses títulos representam o valor médio de quatro titulações, com exceção da amostra proveniente da infecção das culturas de células RK-13 não expostas à carnosina. A exceção se deve a perda de uma amostra em processo.

A propagação da amostra Wistar RA27/3 em células RK13 confirmou a operacionalidade do controle positivo de infecção, demonstrando a capacidade de infecção da suspensão viral usada.

6 - DISCUSSÃO

6.1- Cultura de células e implicações da senescência celular

Hayflick, em sua revisão sobre mortalidade e imortalidade em nível celular, de 1997, atribui a August Weismann, a primeira ponderação admissível sobre a questão da senescência celular, uma vez que o biologista alemão ao considerar, em 1881, que “...*death takes place because worn-out tissue cannot forever renew itself, and because a capacity for increase by cell division is not everlasting but finite*”, remeteu a gênese da senectude dos animais superiores ao nível das propriedades individuais de suas células, em especial, às limitações no potencial de multiplicação de suas células somáticas (Hayflick, 1997).

Em contrapartida, os trabalhos de Carrel originaram conceitos que fundamentaram por décadas, a crença na perenidade da proliferação celular *in vitro*. Os insucessos na expansão das culturas de células de tecido animal indefinidamente, seriam apenas conseqüências de falhas na arte requerida para mantê-las em divisão, ou desconhecimento da formulação do meio nutriente exigida para o sucesso desses cultivos. A senescência seria um atributo peculiar às células somente quando organizadas como tecidos ou órgãos (Witkowski,1979; Hayflick 1997).

A caracterização da história de uma população de células normais em cultivo, proposta por Hayflick & Moorhead em 1961, através de um percurso que passa por três fases distintas pode ser avaliada pelo prisma das observações anteriores. Durante a fase I, considerada cultura primária, as células guardam aspectos fisiológicos remanescentes do condicionamento oferecido pela proximidade entre elas no tecido ou órgão de origem. A população celular apresenta-se heterogênea, a princípio, quanto ao tipo e potencial fisiológico de suas células (Jacobs,1970; Eagle, 1977). Essa heterogeneidade pode variar de acordo com a arte de se preparar as culturas, ou até mesmo pela falência fisiológica de alguns desses tipos celulares (Eagle, 1977), que, como referido nos

preceitos originados pelos trabalhos de Carrel, pode ocorrer em razão da indisponibilidade do meio adequado para sua sobrevivência.

A manutenção de HDCS, entre elas as células MRC-5, em estágio constante de expansão, é um processo que se identifica com a fase II descrita por Hayflick & Moorhead (1961), como um luxuriante crescimento. Nessa fase, a divisão celular pode manifestar-se de forma irrestrita e o crescimento exponencial da população de células demonstra um potencial fisiológico que supera as expectativas de vida do animal de origem (Hayflick, 1997), fato que remete ao condicionamento ambiental, ou à coexistência celular no tecido animal, um papel importante no processo de senescência conforme previa os conceitos derivados dos estudos de Carrel (Eagle, 1977; Hayflick, 1997).

A população de estirpes celulares pode apresentar variações em suas taxas de crescimento ou rendimento celular, em função de características particulares às células ou às condições nutricionais usadas para o seu cultivo (Jacobs, 1970; Agostini *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 2005).

As condições de cultivo das células MRC-5, apresentadas neste trabalho, foram estabelecidas a partir das recomendações para a otimização do processo de culturas de células diplóides humanas associadas à produção de vacinas (Agostini *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 2005) e, de uma aproximação ao modelo aplicado por McFarland & Holliday (1994 e 1999) no estudo dos efeitos rejuvenescedores da carnosina sobre células MRC-5. Nessas condições, mesmo usando meios nutrientes e insumos certificados, preparados segundo procedimentos operacionais padronizados (POP) e aprovados pelo sistema de garantia de qualidade vigente em Bio-Manguinhos, o rendimento celular obtido pode ser considerado baixo, especialmente em relação às condições otimizadas descritas por Agostini e colaboradores (1980) e Wu e colaboradores (2005). Nossas culturas raramente ultrapassavam densidades de 80 000 células/cm² enquanto nos trabalhos referenciados são registrados rendimentos que superam 200 000 células/cm² (Agostini *et al.*, 1980). Deve-se considerar que o baixo rendimento verificado nas culturas usadas neste trabalho pode ter influenciado nossos resultados, especialmente, nos ensaios onde se buscou investigar a ação da

carosina sobre a cinética de expansão das culturas de células MRC-5. Nesses ensaios, foi verificado que o baixo rendimento celular reduziu os limites de observação do crescimento das culturas.

O tempo necessário para as culturas atingirem o estágio de confluência após cada passagem é um outro aspecto a ser considerado em relação à cultura de células. Na fase inicial deste trabalho, as culturas demandaram um maior tempo para evoluir o que, pode ser relacionado às dificuldades na etapa de padronização dos procedimentos, por se tratar de culturas entre as #31 e #34. Essas culturas, provavelmente constituídas por células que, na sua maioria, preservavam o potencial de divisão e, com a superação das dificuldades iniciais, foram usadas para formar o banco celular mantido, criogenicamente, como fonte de amostras para os experimentos posteriores.

O retardamento na evolução da monocamada de células até o estágio de confluência também foi observado, de forma sistemática, em culturas que ultrapassaram o nível de 42 passagens. Esse retardamento, no entanto, ocorria em associação com mudanças na aparência das culturas e, podia ser identificado, facilmente, pelo aumento do número de células em suspensão. Nessas culturas também foram observadas alterações microscópicas, como o desarranjo do padrão de distribuição das células sobre a superfície de cultivo, e os aumentos na frequência de pigmentos e de células morfológicamente alteradas. O quadro observado aproxima-se ao que caracteriza a instalação de um processo de senescência celular (Dimri *et al.*, 1995; Campisi, 2003), e está relacionado com a fase III relatada por Hayflick & Moorhead (1961). Nesse sentido, pode-se inferir que, para uma grande parcela da população de células usadas neste trabalho, o esgotamento do potencial de replicação ocorreu antes do limiar das 50 duplicações estimado por Hayflick (1997). Entretanto, pode-se admitir que essa precocidade do declínio dessas culturas não esteja relacionada com as características naturais da estirpe MRC-5, porém, a eventos resultantes do processamento em cultivo, anteriores à #31, dessa derivação das amostras originais.

O fato de estirpes celulares serem heterogêneas e que pressões ambientais possam interferir na longevidade de uma dada população de células, como suposto acima, ganha suporte nos estudos de Smith & Hayflick (1974) envolvendo o isolamento e caracterização do potencial replicativo de clones de células diplóides. Nesse estudo é revelado que em populações de células diplóides com baixo número de duplicações, com oito ou nove PDL, uma parcela de 95% de seus componentes são capacitados para a replicação, e seus clones podem duplicar-se pelo menos mais uma vez. Entretanto apenas 5% deles apresentam potencial replicativo equivalente ou superior à expectativa de longevidade da população de células original. De forma surpreendente, os autores observaram que, a população dessas culturas jovens é constituída por 50% de células senescentes. Isso lhes permitiu considerar a possibilidade de; o mecanismo que define a longevidade de uma população celular *in vitro* não poderia depender exclusivamente da divisão celular, ou que a sub-população de clones com baixo potencial replicativo tenha se originado artificialmente durante o processo de clonagem (Smith & Hayflick, 1974).

A variação na longevidade entre diferentes amostras de uma determinada estirpe celular, como uma consequência histórica de sua existência em condições de cultivo sobre as características individuais das células de uma população heterogênea, é o fundamento para a teoria sobre o comprometimento celular com o processo de senescência (Kirkwood & Holliday, 1975). Essa teoria presume que, nas primeiras passagens de uma população de células normais, existam células que não sejam compromissadas com a fisiologia associada à senescência. Essas células estariam, continuamente, dando origem à maioria das outras em cultivo que, na maioria das vezes, teriam um compromisso compulsório com o mecanismo da senescência e, conseqüentemente, com um limite para a longevidade. Assim, em decorrência do avanço dos sub-cultivos ou, de pressões ambientais neles originadas, aquelas células não compromissadas com a senescência seriam perdidas ou diluídas, estocasticamente, determinando a extensão da longevidade dessas populações. A perda da capacidade de

expressar a DNA polimerase pode ser considerada um possível fator envolvido no compromisso fisiológico para a senescência (McFarland & Holliday, 1994).

Portanto, da mesma forma que esse fundamento teórico oferece uma explicação presumível para as dificuldades encontradas na manutenção de culturas de células MRC-5, neste trabalho, também contribui para ressaltar a importância do monitoramento do perfil de crescimento e senescência dessas culturas, especialmente, quando se trata de desenvolvimento e produção de imunobiológicos.

6.2 - Ação da carnosina sobre a cinética de crescimento de culturas de células diplóides MRC-5

Na área de desenvolvimento e produção de imunobiológicos, onde as estirpes celulares são empregadas como substrato celular, a caracterização do perfil de crescimento de culturas de células diplóides é uma etapa importante para o estabelecimento de processos otimizados de fabricação (Litwin, 1970; Agostini *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 2005).

Ao investigar a ação da carnosina sobre a cinética de crescimento de culturas de células MRC-5, espera-se contribuir para valorizar essa prática como instrumento para o monitoramento do potencial fisiológico das células usadas na produção e desenvolvimento de imunobiológicos. A adaptação das células MRC-5 ao meio DMEM permitiu a este estudo aproximar-se, e tomar como parâmetro, do modelo usado por McFarland e Holliday (1994 e 1999) para avaliar os efeitos anti-senescentes da carnosina sobre essa estirpe celular, bem como referenciar-se no trabalho de Agostini e colaboradores (1980), para avaliar eficiência de nosso processo de cultivo de HDCS.

Nos resultados apresentados pode-se verificar através da representação gráfica das curvas de crescimento de culturas de células, uma indicação de dificuldades no processo de adaptação das células MRC-5 às mudanças no ambiente da cultura, impostas pelo processo de subcultivo. Nas primeiras 48 horas de cultivo, a quantidade de células recuperadas é muito inferior às

semeadas nas duas condições avaliadas, e evidências de divisão celular só podem ser percebidas nas culturas não condicionadas com carnosina. Os dados também sugerem que esta aparente dificuldade de adaptação seja mais acentuada na presença de carnosina.

A presença de carnosina, aparentemente, exerce uma ação inicial negativa sobre o processo de adaptação das culturas a um ambiente renovado uma vez que, no estudo aqui apresentado, o número de células recuperado de culturas condicionadas com esse dipeptídeo, durante as primeiras 48 horas de cultivo, decai visivelmente em relação à concentração de células semeadas. Em relação às culturas controle esse decaimento também é expressivo. Atribuir um caráter de citotóxico à presença da carnosina não parece uma explicação adequada para essas observações, considerando-se que, na seqüência, a evolução das culturas tratadas ocorre de forma similar às culturas sem carnosina. Nesse aspecto pode-se referir a Eagle (1977) quando considera que a evolução de uma cultura de células *in vitro* depende da disponibilidade intracelular de nutrientes e, conseqüentemente, da capacidade de internalizá-los em tempo, forma e concentração adequados. Assim, poderia ser aventado, que durante o processo de adaptação das células condicionadas com carnosina a um ambiente de cultivo renovado, não seria improvável a existência de dificuldades em internalizar algum tipo de nutriente essencial. Neste contexto, pode-se verificar que o delineamento das curvas de crescimento de culturas de células, de alguma forma, mimetiza o comportamento descrito em 1961, por Hayflick & Moorhead, para o histórico da evolução das estirpes celulares. A etapa correspondente à fase I não mais representará o processo de adaptação de células retiradas do complexo ambiente do tecido animal às condições de cultivo *in vitro*, porém, a uma renovação de um ambiente onde já se encontra adaptada. Em condições padronizadas de cultivo, a presença de um componente diferenciado, como a carnosina neste estudo, pode induzir diferenças nesse processo de adaptação.

Ao se atribuir à teoria do compromisso celular com o processo de senescência (Kirkwood & Holliday, 1975) um caráter de presumível, pode-se admitir que as dificuldades encontradas no processo de adaptação celular a uma

nova condição de cultivo, como observado nas culturas controle, seja resultante da pressão ambiental sobre o potencial fisiológico para a divisão celular em uma população de células diplóides. Nessa condição, a população celular é heterogênea e, apenas uma minoria de células apresenta um potencial fisiológico irrestrito para a mitose. Assim, a pressão exercida pelo processo de reciclagem do ambiente de cultivo selecionaria entre a maioria das células compromissadas com o processo de senescência, aquelas dotadas com maior potencial para a divisão celular. As células com menor potencial para gerar clones seriam eliminadas em razão de suas características particulares, características estas que podem, inclusive, estar relacionadas a uma limitada capacidade de captar nutrientes em tempo, forma e concentração necessárias para sua sobrevivência como preconizou Eagle (1977).

Os resultados sobre a adaptação de culturas de células condicionadas com carnosina a uma renovação no ambiente de cultivo, também podem ser explicados por esse modelo, desde que a propriedade antisenescente, em nível celular, atribuída a esse dipeptídeo seja aceita como real (McFarland & Holliday, 1994). Pode-se admitir que durante a fase de condicionamento das culturas usadas para preparar o ensaio, a carnosina atuaria sobre as células compromissadas com a senescência, favorecendo a sobrevivência de células com baixo potencial proliferativo. Essas células com baixo potencial proliferativo, conseqüentemente, seriam parte das suspensões celulares usadas para preparar as curvas de crescimento. Dessa forma, a diluição das células com maior potencial replicativo nessas suspensões seria a primeira conseqüência dos efeitos antisenescentes da carnosina sobre as curvas de crescimento. Por outro lado, a preservação das células com baixo potencial proliferativo, em culturas com ambiente estabilizado, não seria garantia de sobrevivência das mesmas às variações ambientais. Essas células, mesmo condicionadas com carnosina, poderiam apresentar-se mais susceptíveis a um ambiente menos favorável, sendo que grande parte delas seriam eliminadas, ou apresentariam um crescimento deficiente em razão de suas próprias características fisiológicas. Essa possibilidade é favorecida pela observação de McFarland & Holliday (1994), e ressaltada nos resultados de

Agostini *et al* (1980), de que culturas de células diplóides semeadas com baixa densidade celular possam apresentar maior dificuldade de crescimento. Assim, a diferença de desempenho observada entre culturas condicionadas com carnosina e controle na fase de adaptação a um ambiente de cultivo renovado, conforme destacado neste trabalho, pode se ajustar a um fundamento teórico.

A fase II descrita no diagrama de Hayflick & Moorhead (1961) se justapõe à fase subsequente, que é a etapa de adequação a um ambiente de cultivo nas curvas de crescimento, e são caracterizadas por um crescimento exponencial. Em nosso estudo, as curvas de crescimento das culturas condicionadas com carnosina apresentam um melhor desempenho em relação às observadas nas culturas controle durante a fase de crescimento exponencial. Essa diferença pode ser mais bem caracterizada pela diferença entre as inclinações das retas associadas às curvas de crescimento. Nas culturas condicionadas com carnosina a inclinação da reta é bem maior que nas culturas controle; respectivamente, 9 350 e 6 072. Essa diferença pode ser atribuída a diferenças no espaço para crescimento entre as culturas uma vez que, nos cultivos condicionados com carnosina, a fase exponencial de crescimento inicia-se, com uma densidade de aproximadamente 20 000 células por cm^2 , entre o segundo e terceiro dia de crescimento, enquanto que nas culturas controle esta fase iniciou-se no segundo dia, a partir de 18 000 células por cm^2 . Considerando-se que as culturas são equivalentes em densidade, ao final de sete dias de cultivo, as células condicionadas com carnosina tiveram maior espaço para crescimento.

Entretanto, pode-se considerar que o melhor desempenho das culturas condicionadas com carnosina na fase de crescimento exponencial, observado em nossos resultados, esteja diretamente relacionado à ação reabilitadora da fisiologia celular proposta para esse composto por McFarland & Holliday (1994 e 1999), e/ou de forma indireta ao favorecer o predomínio de células mais aptas para a proliferação em resultado da pressão seletiva exercida na etapa anterior.

O colapso de uma estirpe celular, descrito como fase III no diagrama de Hayflick & Moorhead (1961) pode ser equiparado à condição caracterizada pela alta densidade celular e de esgotamento nutricional nas curvas de crescimento. A

fase III é uma etapa desencadeada pela deterioração do potencial replicativo da célula, e não se reverte pela recomposição do suprimento de nutrientes. Contudo, a reversão é passível de ocorrer através do surgimento de anomalias nas características originais das células (Hayflick & Moorhead, 1961). O distanciamento entre a cultura primária e o limiar da fase III caracteriza a longevidade de uma estirpe celular e, depende de propriedades intrínsecas à fisiologia da célula, podendo ser influenciado por fatores tão diversificados quanto o tecido, órgão, idade e espécie do animal, de onde foram originadas (Hayflick, 1997).

O nível do patamar da fase estacionária em curvas de crescimento de uma estirpe celular pode permitir uma avaliação de rendimento das condições de cultivo, e não depende apenas das características de suas células, mas, principalmente de aspectos nutricionais. Variações no ambiente de cultivo por fatores extrínsecos, associados à cultura ou gerados intrinsecamente, podem influenciar a sua evolução e, conseqüentemente, o nível desse patamar (Eagle, 1977). Portanto, podemos admitir que o número de passagens ou PDL de uma população de células normais não é, necessariamente, o fator que determinará sua maior ou menor proximidade da fase de transição entre a fase II e III do diagrama de Hayflick & Moorhead, (1961). Para essa fase de transição, os estudos de clones celulares (Smith & Hayflick, 1974) e a teoria do compromisso com a senescência, predizem um aumento gradual de células senescentes, e o conseqüente declínio da longevidade da população celular. Deve-se considerar que células senescentes podem permanecer viáveis por longos períodos (Dimri *et al.* 1995; Wein & Wu, 2001, Campisi, 2003), e promover a ativação de genes relacionados à secreção de vários tipos de proteínas capazes de prejudicar outras células do ambiente (Reddel, 1998; Campisi, 2005). Nessa complexidade de estímulos Katakura (2006) relata a identificação de mais de 80 genes associados ao processo de senescência. Essa circunstância sugere que o aumento da ação inibitória desses fatores, gerados intrinsecamente, sobre o crescimento da população de células ocorra em função do posicionamento da cultura em relação à transição da fase II para fase III, e da densidade de células em cultivo.

A possível existência de um ambiente de cultivo similar ao descrito acima, poderia justificar os resultados obtidos nas curvas de crescimento deste trabalho. Neles, verifica-se que a fase estacionária, invariavelmente, se instalava em um nível muito inferior aos apresentados em trabalhos anteriores (Agostini *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 2005), apesar das similaridades entre as condições de cultivo aplicadas e do histórico de passagens das amostras celulares. Em nosso trabalho, as culturas usadas nos testes estavam na trigésima sétima passagem, enquanto que as amostras estudadas por Agostini e colaboradores (1980) estavam entre a vigésima quinta e trigésima passagem. No estudo de Wu e colaboradores (2005) foram empregadas células com número de passagem superior a 31.

Ainda pelos resultados da cinética de crescimento, aqui apresentados, poderia ser admitido que durante a transição entre o crescimento exponencial e a fase estacionária, as culturas de células MRC-5, com aproximadamente 50 000 células/cm², estariam produzindo fatores inibitórios em concentrações que inviabilizariam a sua evolução. Nesses casos, mesmo as propriedades antioxidantes e antisenescentes atribuídas à carnosina não seriam suficientes para reverter o quadro de inibição do crescimento dessas culturas.

Neste trabalho, a experiência com curvas de crescimento de culturas de células MRC-5 #45, em estágio avançado de senescência replicativa não se mostrou eficiente para demonstrar, de forma aparente, qualquer efeito rejuvenescedor da carnosina sobre essas células, como preconizam McFarland & Holliday (1994 e 1999). A manutenção do mesmo quadro característico de senescência replicativa, independente do parâmetro observado, por todo o período monitorado, identifica-se ao modelo matemático de dinâmica da população de células senescentes em cultura proposto por Wein & Wu (2001). Por esse modelo culturas em estágio de senescência replicativa poderiam ser mantidas indefinidamente, desde que condições de cultivo adequadas fossem propiciadas.

6.3 - Avaliação dos efeitos da carnosina em culturas incipientes de células MRC-5 #37 pelo emprego da técnica de eluição do corante cristal violeta

A aplicabilidade da técnica de eluição do corante cristal violeta em procedimentos para avaliar a interferência de agentes químicos ou toxicidade usando culturas de células, conforme preconizado por Doyle & Griffiths (1998) foi confirmada neste trabalho, onde foi empregada para investigar a ação da carnosina em culturas incipientes de células MRC-5.

O emprego da técnica para avaliar a evolução de culturas incipientes de células MRC-5 nos permitiu observar a variação do teor de corante absorvido pelas culturas em função da concentração de células semeadas, do tempo de cultivo e especialmente, pela presença de um composto diferenciador, a carnosina, na composição do meio nutricional. Nesse caso, as alterações na captação de corante também foram, simultaneamente, associadas ao tempo de cultivo e concentração de células semeadas. Essas variações podem ser visualizadas graficamente, no segundo dia de cultivo das culturas semeadas com a menor densidade celular.

A representação gráfica apresentada evidenciou que o teor de corante eluído nas culturas condicionadas com carnosina é, sistematicamente, inferior aos observados nos controles, e a princípio, sugere uma citotoxicidade associada à presença do dipeptídeo.

Na apresentação dos resultados deste trabalho, tomando como base a relação entre o teor de corante eluído das culturas condicionadas e não condicionadas com carnosina, foram apresentadas evidências de transtornos no processo de adaptação das células ao novo ambiente de cultivo, após dois dias de incubação, que podem ser associados a presença desse dipeptídeo. Nessas circunstâncias, observa-se um declínio dos índices de absorção de cristal violeta das células tratadas com carnosina em relação aos controles, que mantêm alguma relação com a quantidade de células usadas na semeadura. Nessa condição, a seqüência decrescente na relação entre o teor de corante absorvido entre as culturas tratadas com carnosina e controles apresenta-se inversamente

proporcional à concentração de carnosina por célula semeada. Essa é uma situação que pode ser associada com uma toxicidade tardia, ou com a evolução de uma toxicidade inicial, que não perduram, uma vez que as culturas apresentam sinais de recuperação no terceiro dia de cultivo.

A atribuição de algum tipo de citotoxicidade associada à presença de carnosina no ambiente de culturas incipientes de células MRC-5, com base nesses resultados, assume um caráter de improbabilidade ao se considerar o tempo de recuperação das culturas. Nesse sentido, pode-se deduzir que o tempo necessário para a recuperação das culturas também seria diferenciado em função da concentração de carnosina por célula. Considerando-se que culturas de células diplóides semeadas com baixa densidade celular possam apresentar maior dificuldade de crescimento (Agostini *et al.*, 1980; McFarland & Holliday, 1994), nas culturas incipientes, semeadas com os dois menores números de células por cm², os efeitos de uma citotoxicidade pela presença da carnosina, presumivelmente, seria irreversível.

Sob a óptica da teoria do compromisso celular com a senescência (Kirkwood & Holliday, 1975), poderia ser admitido que a diferença no teor de corante absorvido pelas culturas tratadas com carnosina e controles seja uma consequência do efeito da carnosina durante a fase de condicionamento das culturas usadas para preparar esse ensaio. Durante a fase de condicionamento dessas culturas a carnosina favoreceria a sobrevivência de células com baixo potencial proliferativo que, conseqüentemente, passariam a fazer parte das suspensões celulares usadas no teste de CVDE. Assim, o índice de células não comprometidas com a senescência, bem como daquelas com maior potencial para a divisão celular, seria reduzido na fase inicial do cultivo das células condicionadas com carnosina. O impacto da renovação do ambiente sobre as células com menor potencial replicativo, seria mais intenso nas culturas condicionadas com carnosina, que, mesmo na presença do dipeptídeo, seriam abolidas, ou apresentariam um crescimento deficiente em razão de suas próprias características. Esse argumento ganha suporte ao observarmos que no primeiro dia de cultivo, a relação entre o teor de corante eluído das culturas condicionadas com carnosina e controle,

mantém níveis estáveis, independentemente, da concentração de células semeadas. Tal fato não ocorreria em uma condição de citotoxicidade, entretanto, os dados demonstram que nos dois parâmetros analisados, a proporção de células susceptíveis às mudanças ambientais nas suspensões usadas para preparar o ensaio são diferenciadas, porém estáveis. Nos dados referentes ao segundo dia de cultivo, onde, anteriormente, foram identificados indícios de uma citotoxicidade tardia, podem ser observados três limiares para os índices relativos de absorção de corante por culturas condicionadas com carnosina e controles; com baixo número de células por cm^2 e menor índice de absorção de corante, o nível intermediário de células semeadas e corante absorvido, e o maior número de células semeadas com a maior concentração de corante absorvido. A existência desses três níveis pode ser justificada através de diferenças dessas culturas no percurso do processo de adaptação a um ambiente de cultivo renovado. Essas diferenças podem envolver o inter-relacionamento de dois aspectos: o grau de dificuldade das culturas se adaptarem ao novo ambiente, e a sobrevivência das células com menor potencial replicativo frente as mudanças ambientais.

As dificuldades na evolução de culturas de células diplóides observadas por Agostini e colaboradores (1980) e McFarland & Holliday, (1994) poderiam ser identificadas, prontamente, com os níveis de captação de corante pelas culturas semeadas com 5 000 e 10 000 células por cm^2 . Um evento que pode ser justificado pela carência de fatores essenciais para a evolução dessas culturas, fatores que, gerados internamente no ambiente de cultivo, são responsáveis por um sinergismo metabólico entre essas células. Em estudos de clonagem de células diplóides (Merz & Ross, 1973), suplementa-se o meio de clonagem com o sobrenadante de culturas em fase crescimento para superar essa dificuldade.

Essa justificativa também se aplica ao entendimento da existência dos três limiares, entre os índices relativos de absorção de corante por culturas condicionadas com carnosina e controles. As culturas com menor densidade celular são deficitárias desse sinergismo, e a situação é agravada nas culturas condicionadas com carnosina pela existência de células com uma fisiologia debilitada. O segundo limiar representa as condições usuais de semeadura e,

consequentemente, as culturas mantêm um sinergismo fisiológico prejudicado, em relação aos controles, por apresentarem menor número de células fisiologicamente aptas para o crescimento, porém, suficiente para mantê-las em expansão. Para o terceiro limiar não se observam restrições uma vez que, o número de células competentes para a proliferação em cultivo é grande e suficiente para manter um sinergismo metabólico adequado e a cultura em crescimento. Na seqüência da leitura de nosso experimento, os dados para o terceiro dia, não mais ganham o significado de superação de uma fase de citotoxicidade, mas de início de uma fase de crescimento exponencial, possivelmente estimulada pela presença da carnosina sugerindo possíveis benefícios carnosina para o cultivo de células MRC-5.

6.4 - Avaliação da expressão protéica da enzima β -gal AS em culturas de células MRC-5, condicionadas com carnosina

A busca por padrões distintos de atividade da β -gal AS em células condicionadas e não condicionadas com carnosina, foi a forma como neste trabalho, predispôs-se a correlacionar as propriedades antioxidantes (Kohen *et al.*, 1988; Gariballa & Sinclair, 2000; Guiotto *et al.*, 2005) e antisenescentes (McFarland & Holliday, 1994 e 1999), atribuídas a este dipetideo, às diferenças no perfil da cinética de crescimento de culturas de células MRC-5.

Na proposta original de Dimri e colaboradores (1995) para o emprego da β -gal AS como um marcador fisiológico de senescência das células humanas, foi ressaltado que a expressão dessa enzima é um fator diferenciador entre fibroblastos humanos em estado de senescência replicativa e aqueles em estágio pre-senescente ou quiescente. Esse princípio harmoniza-se com o objeto deste estudo, as culturas de células MRC-5, uma vez que este HDCS é constituído por uma população de células fibroblastóides (Jacobs, 1970) que, caracteristicamente, são heterogêneas quanto ao estágio de senescência e, consequentemente, no potencial proliferativo (Smith & Hayflick, 1974).

Adicionalmente, verifica-se que a incapacidade de expressão desse marcador por células imortalizadas pode ser revertida pela recondução dessas células à mortalidade através manipulação genética (Dimri *et al.*, 1995; Buckley *et al.*, 2004) corroborando as afirmações de Campisi (2005) de que os mecanismos bioquímicos da senescência, apoptose e transformação cancerígena, embora não completamente elucidados, estão separados por limites muito tênues.

Portanto, a ação da carnosina nesse vértice de eventos bioquímicos, poderia ser identificada através da expressão da β -gal AS que, por sua vez, poderia servir como uma ferramenta para monitorar o estado de senescência de culturas de células diplóides usadas nos processos de desenvolvimento e produção de vacinas.

No âmbito da produção de vacinas virais usando HDCS, o controle da senescência celular e suas implicações para a segurança biológica desses produtos, é feita através do monitoramento cariológico dos bancos de células e da limitação do número de duplicações permitido para a expansão de suas culturas (Jacobs, 1970; WHO, 2004; FDA, 2006). Historicamente, esses cuidados têm se mostrado suficientes para garantir a segurança das vacinas produzidas nessas estirpes celulares (Plotkin & Reef, 2004; Furesz, 2006), mesmo considerando a propostas de alterações neste procedimento, baseadas em estudos onde foram aplicadas técnicas mais modernas para análise cromossômica de bancos de células MRC-5 (Rosolowsky *et al.*, 1998). Nesse aspecto este estudo, ao buscar uma correlação entre as propriedades antioxidantes da carnosina e o emprego de um marcador de senescência com a cinética de crescimento de células MRC-5, poderá contribuir para reafirmar a segurança da aplicação desse HDCS na produção de vacinas.

Para essa correlação ter fundamento, os efeitos antisenescentes da carnosina propostos por McFarland & Holliday (1994 e 1999) e, pelo menos teoricamente, admitidos como possíveis pela discussão de nossos resultados sobre cinética de crescimento, também deveriam ser manifestados na expressão da β -gal AS nas células MRC-5 usadas neste estudo.

A aplicação do princípio da β -gal AS como marcador fisiológico de senescência proposto por Dimri e colaboradores (1995), e corroborada entre outros por Krisna e colaboradores (1999), foi amplamente aceita (Campisi, 2005; Katakura, 2006), sendo empregada, neste estudo, em duas versões: na versão original, onde o substrato Xgal é usado para identificar a atividade da β -gal AS em células senescentes integras enquanto que ONPG é usado para quantificar essa atividade enzimática em extratos de células em estado de senescência (Buckley, 2004).

Neste estudo, a aplicação da técnica original em culturas de células MRC-5, com o mesmo número de passagens daquelas usadas para os estudos de cinética de crescimento, usando o substrato X-gal, demonstrou que grande parte dessa população celular apresentou indicações de atividade da enzima β -gal AS sem, entretanto, ser suficiente para diferenciar culturas tratadas e não tratadas com carnosina 20 mM, quanto a capacidade de expressar esta enzima. O método, quando aplicado em células em suspensão demonstrou que aproximadamente 30% dessas células poderiam estar expressando esse marcador fisiológico de senescência. Entretanto, esse percentual de células senescentes pode ser grande o suficiente para determinar o baixo rendimento celular dessas culturas.

Da mesma forma, os extratos de células tratadas e não tratadas com carnosina 20 mM, apresentam índices similares de atividade de β -gal AS, quando avaliados pela versão técnica que emprega ONPG como substrato para as culturas com mesmo nível de passagem usados anteriormente. Entretanto nos extratos de células condicionadas com carnosina 40 mM, observa-se um pequeno declínio nessa atividade enzimática, que não poderia ser atribuído de forma incontestável à presença de carnosina no meio de cultivo das células. Contudo, esta diferença pode ganhar em significância quando se considera o resultado da aplicação desse teste nos extratos de células de culturas de células MRC-5 na passagem 45. Nesse ensaio verificou-se uma queda na atividade da β -gal AS nos extratos provenientes das culturas tratadas com carnosina, e que o aumento da amplitude dessa queda, também pode ser relacionado ao aumento na concentração de carnosina usada no tratamento das culturas para preparar as

amostras testadas. Portanto, fica implícita a possibilidade de que este dipeptídeo possa atuar na expressão desse marcador fisiológico de senescência.

Os resultados deste estudo estão consolidados sobre as observações de uma amostra de células MRC-5 que, por suas limitações, não nos permitiu estabelecer uma base comparativa entre células jovens, pre-senescentes e senescentes, como inicialmente planejado. Assim, não é possível concluir neste momento e nas condições em que este trabalho foi realizado que a carnosina pode atuar na expressão da β -gal AS, ou que a sua propriedade antisenescente, preconizada por McFarland & Holliday (1994 e 1999) possa ser comprovada através do marcador de senescência proposto por Dimri e colaboradores (1995), ou até mesmo pela aplicação das técnicas de cinética de crescimento. Contudo, essas diferenças entre a atividade enzimática nos extratos de células MRC-5 em diferentes passagens corroboram a afirmação de Dimri e colaboradores (1995) de que a intensidade da expressão da enzima β -gal AS esteja relacionada ao grau de senescência replicativa. Os resultados, aqui apresentados, oferecem perspectivas importantes para a continuidade futura do projeto, sobretudo na direção da padronização e aplicação dos métodos aqui utilizados, visando o monitoramento e qualificação de HDCS empregados no desenvolvimento e produção de imunobiológicos, e na pesquisa.

6.5 - Propagação da cepa vacinal Wistar RA27/3 do vírus da rubéola, em culturas de células MRC-5, condicionadas com carnosina

Neste estudo, não foram encontradas evidências de que a ação da carnosina sobre culturas de células MRC-5, na passagem 37, possa interferir na produção da amostra vacinal Wistar RA27/3 (tabela 5.7). Entretanto deve-se considerar que a consistência desses dados possa estar prejudicada em dois aspectos: a replicação viral foi avaliada em células com um perfil fisiológico distante daqueles observados nas culturas de células usadas na produção de vacinas, e representam o resultado do potencial infeccioso de amostras colhidas em um único dia do ciclo de replicação das cepas vacinais do vírus da rubéola.

Em associação à questão da influência do baixo potencial proliferativo das culturas usadas na produção de vírus pode-se incluir a influência da presença de aproximadamente 30% de células MRC-5 em estágio de senescência replicativa nas culturas infectadas (tabela 5.4). Esse índice de positividade para β -gal AS, está muito acima do observado por Pedoux e colaboradores (2005), que para células MRC-5 #28 em culturas com baixa confluência celular, observaram uma taxa inferior a 5% de senescência (figura 1.5). Células senescentes, apesar de apresentarem um metabolismo celular reprimido, mantêm uma fisiologia secretora anômala que pode influenciar as demais células em cultivo (Campisi, 2005, Katakura, 2006). Nesse contexto, faz-se pertinente a observação de Frey (1994), que se refere à produtividade de vírus da rubéola por célula infectada como uma consequência, circunstancial, do encontro da partícula viral infectante com uma fisiologia celular competente para a sua replicação, não dependendo apenas da espécie animal ou do tecido de origem das células infectadas, que pode variar tanto em função do tipo de célula quanto às condições de infecção.

A colheita das amostras de suspensões virais produzidas pela infecção das células MRC-5 inoculadas com as cepas RA27/3 do vírus da rubéola, após oito dias de incubação, está de acordo com os dados de Plotkin & Reef (2004), pelos quais a produtividade viral desses vírus vacinais em culturas de células diplóides inicia-se no quarto dia e perdura por semanas. Entretanto, a produtividade das infecções pelo vírus da rubéola, segundo Frey (1994) é fortemente influenciada pelo assincronismo do avanço da infecção, que envolve vários ciclos internos de reinfeção, e conseqüentemente ser prejudicada pela indução de interferon no ambiente de cultivo.

Portanto, é recomendável que esta investigação seja refeita, utilizando células MRC-5 com baixo número de passagens ou PDL, originadas de processos otimizados de cultivo e relacionados à produção dessa amostra de vírus vacinal, de forma a propiciar uma avaliação comparativa de rendimento viral.

7- CONCLUSÕES

O baixo rendimento do cultivo das amostras de células MRC-5 observados neste trabalho, em relação aos descritos para o mesmo HDCS por outros autores, limitou o espaço de observação do perfil de crescimento das culturas de células MRC-5 condicionadas com carnosina, entretanto este condicionamento aparentemente favoreceu a evolução dessas culturas durante a fase de crescimento exponencial.

A influência da carnosina sobre a evolução de culturas incipientes de células é inconsistente para uma conclusão definitiva, entretanto a aplicação do método de CVDE mostrou-se eficiente para demonstrar pequenas alterações no perfil de evolução dessas culturas.

A identificação da atividade da β -gal em culturas de células MRC-5 condicionadas e não condicionadas com carnosina, como evidenciado neste trabalho, indicam a aplicação do método no monitoramento da senescência replicativa em cultura de células diplóides usadas no desenvolvimento e produção de imunobiológicos.

Em nosso trabalho não foram encontradas evidências da interferência do condicionamento pela carnosina no processo de replicação de vírus vacinal da rubéola, cepa RA27/3.

7- PERSPECTIVAS

Investigação da ação da carnosina sobre a cinética de crescimento de culturas de células MRC-5 com perfil fisiológico equivalente aos observados nos substratos celulares usados na produção de vacinas.

Investigação da ação da carnosina sobre a evolução de culturas incipientes de células MRC-5 com baixo PDL usando a técnica de CVDE.

Padronização das técnicas de identificação e caracterização da atividade da enzima β -gal AS como instrumento para o monitoramento e qualificação de células MRC-5 usadas na produção de vacinas.

Avaliação da influência da carnosina na expressão da enzima β -gal AS por culturas de células MRC-5 em diferentes PDL.

Avaliação da influência da carnosina na replicação de vírus vacinal da rubéola em culturas de células MRC-5 com padrão fisiológico equivalente aos usados na produção de vacinas.

8- BIBLIOGRAFIA

Agostini CFM, Mann GF, Allisson LMC, Johnson FH. **Efficiency of medium utilization by human diploid fibroblast in culture.** Dev Biol Stand 1980; 46: 51-58.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell.** 4th ed. New York Garland Science, 2002.

American Type Culture Collection (ATCC) – **catálogo eletrônico**, capturado em 27 de julho de 2005, e disponível em atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CCL-171.

Bio-Manguinhos - página eletrônica **sessão vacinas** – julho 2004 –, capturada em 16 junho de 2005, disponível em www.bio.fiocruz.br/interna/vacinas_triplice_viral.htm

Bogardus S & Boissonneault GA. **Carnosine inhibits in vitro low-density lipoprotein oxidation.** Nutr Res 2000; 20 (7):967-976.

Bradford, MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem* 1976; 72: 248-254.

Brownson C & Hipkiss A R. **Carnosine reacts with a glycated protein.** Free Radic Biol Med 2000; 28 (10): 1564-1587.

Buckley S, Shi W, Driscoll B, Ferrario A, Anderson K, Warburton D. **BMP4 signaling induces senescence and modulates the oncogenic phenotype of A549 lung adenocarcinoma cells.** Am J Physiol Lung Mol Physiol 2004; 286: 81-86.

Campisi J. Cellular senescence and cell death, In **Physiological basis of aging and Geriatrics** (3rd ed), edited by Timiras PS. Boca Raton FL CRC 2003 p 47-59.

Campisi J. **Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors.** Cell 2005; 120(4): 513-522

Castilho LR & Medronho RA. em **Produção de Imunobiológicos e Biofármacos em cultivo de células animais.** Curso para profissionais, realizado na Escola de Química –UFRJ. 2006 (comunicação oral).

Center for Disease Control and Prevention (CDC), Department of health and human services. US government. **The Pink book, rubella** cap 12; 155-170 disponível em www.cdc.gov/nip/publications/pink/rubella.pdf capturado em 11/12 de 2006.

Chantler J, Wolinsky JS & Tingle A. **Rubella virus**. In: Fields BN, Knipe DM and Howley PM (eds). *Fields Virology* 4th edition, Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins 2001, Chap.31 pag 963-990.

Diez RP & Baran J. **A density functional study of some physical properties of carnosine (N- β -alanyl-L-histidine)**. *J Mol Struct* 2003; 621 (3) 245-251.

Dimri G P, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano E E, Linskens M, Rubelj I, Pereira SO, Peacocke M, Campisi J. **A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo**. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 9363-9367.

Doyle A & Griffiths JB. **Cell and tissue culture: laboratory procedures** in biotechnology. 1998 eds. John Willey & Sons Ltd. chapter 2 pag. 53-80.

Dunnett M, Harris RC, Dunnett CE, Harris PA. **Plasma carnosina concentration: diurnal variation and effects of age, exercise and muscle damage**. *Equine Vet J Suppl* 2002; 34: 283-287 [Abstract].

Eagle H. **The nutritional requirements and metabolic activities of human cells in vivo and in vitro**. *Develop Biol Stand* 1977; (37): 143-157.

ECACC (*“European Collection of Animal Cell Cultures”*) – **catálogo eletrônico** Capturado 27/07/2006; disponível em <http://www.ecacc.org.uk>.

Faragher RG & Kipling D. **How might replicative senescence contribute to human ageing?** *Bioessays* 1998; 20: 985-991.

FDA: Guidance for Industry – **Characterization and qualification of cell substrates and other biological starting materials used in the production of viral vaccines for the prevention and treatment of infectious diseases**. USA: September 2006. capturado em 18/11/2006, e disponível em <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

Fletcher MA, Hessel L & Plotkin SA. **Human diploid cell strains (HDCCS) viral vaccines**. *Dev Biol Stand* 1998; 93: 97-107.

Frey TK. **Molecular biology of rubella virus**. *Adv Virus Res* 1994; 44: 69-160.

Furesz J. **Developments in the production and quality control of poliovirus vaccines – Historical perspectives in Polio Vaccine: The First 50 Years and Beyond.** *Biologicals*, 2006; 34 (2): 87-90.

Gariballa SE & Sinclair AJ. **Review. Carnosine:physiological properties and therapeutic potential.** *Age Ageing*, 2000; 29: 207-210.

Greider CW. **Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future.** *Curr Biol*, 1998; 8; 178-181.

Guiotto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G. **Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review.** *Curr Med Chem* 2005; 12 (20): 2293 – 2315.

Hayflick L & Moorhead PS. **The serial cultivation of human diploid cell strains.** *Exp Cell Res* 1961; 25: 581-621.

Hayflick L. **Mortality and imortality at the cellular level. A review.** *Biochemistry* 1997; 62(11): 1180-1199.

Hipkiss AR & Brownson C. **Carnosine reacts with protein carbonyl groups: another possible role for anti-ageing peptide?** *Biogerontology* 2000; (1): 217-223.

Hipkiss AR. **Could carnosine be a naturally-occurring scavenger for acrolein and other reactive aldehydes in the brain?** *Neurobiol Aging*. 2002; 23(4): 645-646.

Hipkiss AR, Brownson C, Bertani MF, Ruiz E, Ferro A. **Reaction of carnosine with aged proteins: another protective process?** *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 959: 285-294.

Hobart L J, Seibel I, Yeargans GS, Seidler NW. **Anti-crosslinking properties of carnosine: significance of histidine.** *Life Sci* 2004; 75(11): 1379-1389.

Holliday R. **Senescence of dividing somatic cells.** In: Marshak Dr, Gardner RL, Gottlieb D. ed *Stem Cell Biology*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001. 95-109.

Jacobs J P, Jones C M & Baille, J P. **Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5.** *Nature* 1970; 227: 168–170.

Jacobs J P. **Some comparative characteristics of WI-38 and MRC-5 cells and their suitability for the production of viral vaccines.** In *Proceedings of symposium on human diploid cells*. Yugoslav Acad Sci Arts Zagreb. 1970; 43-55.

Jacobs J P. **The status of human diploid cell strain MRC-5 as an approved substrate for the production of viral vaccines.** J Biol Stand 1976; 4: 97-99.

Kang JH. **Protective effects of carnosine and relative compounds on DNA cleavage by advanced glycation end products.** Bull Korean Chem Soc 2005; 26 (1): 178-180.

Kantha SS, Wada S, Tanaka H, Takeuchi M, Watanabe S, Ochi H. **Carnosine sustains the retention of cell morphology in continuous fibroblast culture subjected to nutritional insult.** Biochem Biophys Res Commun 1996; 223(2): 278-282.

Katakura Y. **Molecular basis for the cellular senescence program and its application to anticancer therapy.** Biosci Biotechnol Biochem 2006; 70 (5): 1076-1081.

Kirkwood TBL & Holliday R. **Commitment to senescence: a model for the finite and infinite growth of diploid and transformed human fibroblast in culture.** J.Theor Biol 1975; 53: 481-496.

Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN. **Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain.** Proc Natl Acad Sci 1988; 85: 3175-3179.

Kretzmer G. **Industrial processes with animal cells – mini-review -** Appl Microbiol Biotechnol 2002; 59:135–142.

Krishna DR, Sperker B, Fritz P, Klotz U. **Does pH 6 β -galactosidase activity indicate cell senescence ?** Mech Ageing Dev 1999; 109(2): 113-123.

Lee JY & Bowden DS. **Rubella virus replication and links to terogenicity.** Clin Microbiol Rev 2000; 13(04): 571-584.

Litwin J. **Standardization of human diploid cell cultivation.** .Appl Microbiol. 1970; 20(6): 899-906.

Lodygin D, Menssen A & Hemeking H. **Induction of Cdk inhibitor p21 by LY83583 inhibits tumor cell proliferation in a p53-independent manner.** Clin Invest 2002; 110: 1717-1727.

MacGregor GR, Nolan GP, Fiereing S, Roederer M, Herzenberg LA.. **Use of E.coli lacZ(β -Galactosidase) as a reporter gene.** In: Methods in Molecular Biology, vol.7:Gene transfer and Expression Protocols ed. EJ Murray The Humana Press Inc. , Clifton, NJ USA 1991.

Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FM, Zentella A. **Transforming growth factors - beta**. *Cancer Surv* 1992; 12: 81 -103

Masters JR. **HeLa cells 50 years on; the good, the bad and the ugly**. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 315 - 319.

McFarland GA & Holliday R. **Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine**. *Exp.Cell Res.* 1994; 212: 167–175.

McFarland GA & Holliday R. **Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide l-carnosine on cultured human diploid fibroblasts**. *Exp Gerontol* 1999; 34: 35-45.

Merz, G S & Ross JD. **Clone size variation in the human diploid cell strain, WI-38**. *J Cell Physiol* 1973; 82: 75-80.

Nardiello D & Cataldi TRI. **Determination of carnosine in feed and meat by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection**. *J Chromatogr* 2004; A1035 (2): 285-289.

Nelson JW **The Lone Eagle as Medical Researcher** *Navy Medicine* 2003. 94 (6) 18-22. capturado em 31/01/2006, disponível em <http://www.charleslindbergh.com/history/nelson.asp>.

Park Y J, Volpe S L & Decker E A. **Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef**. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4736-4739.

Pedoux R, Sengupta S, Shen JC, Demidov O N, Saito S, Onogi H, Kumamoto K, Wincovitch S, Garfield S H, McMenamin M, Nagashima M, Grossman S R, Appella E, Harris C C. **ING2 Regulates the Onset of Replicative Senescence by Induction of p300-Dependent p53 Acetylation**. *Mol Cell Biol* 2005; 25(15): 6639-6648

Plotkin SA & Beale AJ. **Production of RA27/3 rubella vaccine and clinical results with the vaccine**. *Dev Bio Stand* 1976; 37: 291-296.

Plotkin SA & Reef S. **Rubella vaccine**. In Plotkin and Orenstein (eds). *Vaccines*. 4th ed Philadelphia, PA: Saunders Company. 2004; cap 26.

PROMEGA, Technical Bulletin – **β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer** — Revised 07/06. www.promega.com/tbs/ capturado em 27/11/2006.

Quinn PJ, Boldyrev AA & Formazuyk VE. **Carnosine: Its properties, functions and potential therapeutic applications**. *Mol Aspects Med* 1992; 13 (5): 379-344.

Ramos CAB. **Vacina contra a Febre Amarela: Avaliação dos processos para a produção e purificação dos vírus 17DD.** 1994. Tese apresentada no Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Reed LJ & Muench H. **A simple method for estimating 50% endpoints.** Am J Hyg 1938; 27: 493-497.

Reddel RR. **A reassessment of the telomere hypothesis of senescence.** Bioessays 1998; 20: 977-984.

Risco C, Carrascosa JL & Frey TK. **Structural maturation of rubella virus in the Golgi complex.** Virology 2003; 312: 261-269.

Roberts P R., Black K W, Santamauro JT, Zaloga G P. **Dietary Peptides Improve Wound Healing Following Surgery.** Nutrition 1998; 14 (3): march 266-269.

Rosolowsky M, McKee R, Nickols W, Garfinkle B. **Chromosomal characterization of MRC-5 cell banks utilizing G-banding technique.** Dev Biol Stand 1998; 93: 109-117.

Rubin, H. **Promise and problems in relating cellular senescence in vitro to aging in vivo.** Arch Gerontol Geriatr 2002; 34(3): 275-286.

Seidler NW & Yeargans GS. **Effects of thermal denaturation on protein glycation.** Life Sci 2002; 70(15): 1789-1799.

Shinohara M. Uchida K, Shimada S, Segawa Y, Hirose Y. **The usefulness of human lung embryonal fibroblast cells (MRC-5) for isolation of enteroviruses and adenoviruses** Kansenshogaku Zasshi 2002;76(6):432-8. [Article in Japanese] [Abstract].

Smith JR & Hayflick L. **Variation in the life-span of clones derived from diploid cell strains.** J cell Biol 1974; 62; 48-53.

Stuerenburg HJ & Kunze K. **Concentrations of free carnosine (a putative membrane-protective antioxidant) in human muscle biopsies and rat muscles.** Arch Gerontol Geriatr 1999; 29(2): 107-113.

Tanaka, RA; Ramos FM M; Almeida S M; Vizioli M R; Bóscolo, FN. **Evaluation of radioprotective effect of carnosine (beta- alanyl-1- histidine) on the wound healing in rats.** J Appl Oral Sci 2005; 13(3):253-258.

The Merck Index. **An Encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals** ed Martha Windhotz: Merck &Co., Inc. Rahway, New Jersey, USA 1983. 258.

Theiler M & Smith HH. **The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization: reviewed by P Mortimer.** Rev Med Virol 2000; 10: 3-16

Wang AM, MA C, Xie ZH, Shen F. **Use of carnosine as a natural anti-senescence drug for human beings.** Biochemistry 2000; 65(7): 869-871.

Wein LM & Wu JT. **Estimation of replicative senescence via population dynamics model of cells in culture.** Exp Gerontol 2001; 36(10): 79-88.

Weller TH, Robbins FC & Enders JF. **Cultivation of poliomyelitis virus in cultures of human foreskin and embryonic tissues.** Proc Soc Exp Biol Med 1949; 72 (1) 153-155.

WHO Expert Committee on Biological Standardization: Fifty third reporter. **WHO Technical series 926.** Geneva 2004.

Wilson D. **The Early History of Tissue Culture in Britain: The Interwar Years.** Soc Hist Med 2005; 18(2): 225-243.

Witkowski JA. **Alexis Carrel and the mysticism of tissue culture.** Med Hist 1979;.23: 279-296.

Wu F, Reddy K, Nadeau I, Gilly J, Terpening S, Clanton DJ. **Optimization of a MRC-5 cell culture process for the production of a smallpox vaccine.** Cytotechnology 2005; 49: 95-107.

Yamamoto K & Yamamoto M. **Changes in the cell surface of human diploid fibroblasts during cellular aging.** Japan Mutat Res 1991; 256 (2-6):169-175.

Yeargans GS & Seidler NW. **Carnosine promotes the heat denaturation of glycated protein.** Biochem Biophys Res Commun 2003; 300 (1) 75-80.