

# Desenvolvimento de metodologia de cultivo de hepatócitos bovinos *in vitro* para estudos moleculares e bioquímicos<sup>1</sup>

Giuliana Xavier de Medeiros<sup>1,2</sup>, Felipe Vieira<sup>3</sup>, Thiago Oliveira<sup>3</sup>, Raquel Paiva<sup>4</sup>, Mariana Barbosa<sup>3</sup>, Marco Antônio Machado<sup>5</sup>, Marta Martins<sup>5</sup>, Humberto Brandão<sup>5</sup>, Wanessa Araújo Carvalho<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>O presente trabalho foi apresentado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil

<sup>2</sup>Bolsista da Fapemig, graduanda em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: giulianaxm@gmail.com

<sup>3</sup>Mestrando em Genética – Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>4</sup>Doutoranda em Genética – Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>5</sup>Pesquisador(a), Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora MG

<sup>6</sup>Orientador

**Resumo:** O fígado é responsável pela regulação do metabolismo animal e produção de proteínas do sistema imune, sendo o estudo de suas vias essencial para o entendimento de processos como sinalização intracelular e análise de rotas metabólicas. Para tal, foi desenvolvida uma metodologia de isolamento e cultivo primário de hepatócitos bovinos *in vitro*. Hepatócitos foram isolados de fígado bovino pelo método enzimático sem perfusão com colagenase tipo II. O método de exclusão por Azul de Trypan foi usado para determinar o rendimento total de células e a taxa de sobrevivência dos hepatócitos cultivados na ausência de matriz, em placas recobertas com colágeno ou gelatina. RNA foi extraído das células isoladas, quantificado com Nanodrop e a qualidade foi analisada através do Bioanalyzer. Os resultados apontaram um rendimento de cerca de  $1,7 \times 10^6$  células viáveis/g de fígado onde hepatócitos bovinos apresentaram maior integridade morfológica quando cultivados em monocamada de gelatina, com uma média de viabilidade de 52,5%. A quantidade e integridade do RNA também foram superiores nesta configuração de matriz. O estabelecimento de um protocolo de cultivo de hepatócitos bovinos será uma ferramenta útil para estudos de metabolização de drogas, imunomodulação e sinalização intracelular impactando sobre a agilidade em testes e obtenção de novos fármacos para o campo veterinário.

**Palavras-chave:** cultivo celular, hepatócito, isolamento celular.

## Development of a novel methodology for bovine hepatocyte culture *in vitro* for molecular and biochemical studies

**Abstract:** The liver is responsible for the regulation of animal metabolism and production of immune system proteins, so studying its signaling pathways is vital for the understanding of metabolic routes. In order to develop a methodology for metabolic pathways analysis, the isolation and primary hepatocyte culture was studied. Hepatocytes were isolated from a bovine liver using the non-perfusion enzymatic digestion method with collagenase type II. The trypan blue exclusion method was used to determine total cell number and the survival rate of hepatocytes. RNA was extracted from the isolated cells, quantified with Nanodrop spectrophotometer and quality was assessed on Bioanalyzer. Results showed that the gelatin monolayer presented higher cell viability, with an average hepatocyte viability of 52,5 % and  $1,7 \times 10^6$  viable cells/g of liver. RNA quantification and integrity were also higher with the gelatin monolayer configuration, making it the most adequate matrix for hepatocyte culture. Therefore this is a simplified procedure for the isolation and culture of functional and viable hepatocytes may be applied for *in vitro* studies in veterinary field.

**Keywords:** cell culture, hepatocyte, cell isolation, viability

### Introdução

O fígado é um órgão essencial para regulação do metabolismo (ZHANG; LI et al., 2012) sendo a principal fonte de fatores de complemento e proteínas de fase aguda em mamíferos

(MOSHAGE, 1997). O isolamento e cultivo de hepatócitos são amplamente usados para avaliar a farmacocinética de drogas, sinalização intracelular, citotoxicidade, transporte e metabolismo de lipídios, regulação hormonal e imunidade inata em estudos *in vitro* em modelo murino e humanos. No entanto, para a espécie bovina, é necessário o estabelecimento de metodologias que atendam os pré-requisitos de viabilidade, integridade morfológica e molecular para que esses estudos possam ser conduzidos com maior reprodutibilidade. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é estabelecer uma metodologia para o isolamento e cultivo de hepatócitos bovinos com alta viabilidade e condições adequadas para estudos de biologia molecular e metabolismo celular aplicado ao desenvolvimento de novos fármacos na área agropecuária.

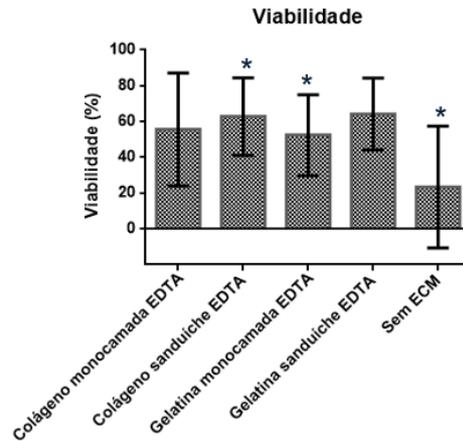
## Material e Métodos

**Isolamento e cultivo dos hepatócitos:** O lobo caudal foi excisado do fígado bovino em abatedouro local (Fripai, Juiz de Fora – MG) e armazenado em gelo até o regresso à Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG). Para o isolamento de hepatócitos, foram utilizadas aproximadamente 15 gramas de tecido que foi fragmentado com uma tesoura em solução de tampão fosfato salino (PBS; Amresco, Cleveland, Ohio, EUA) e incubados com uma solução de colagenase 0,05% (Worthington Industries, OH, EUA), a 37° por 15 minutos. Após incubação a colagenase foi inativada com soro fetal bovino (SFB 10%), as células filtradas com auxílio de um *cell strainer* de 70 µm (Corning, New York, USA) e centrifugadas a 50 g por 5 minutos a 20 °C com posterior descarte do sobrenadante. As células foram submetidas a um gradiente de Percoll (densidade 1,124 g/ml; GE Health Care, Little Chalfont, UK). O *pellet* formado foi ressuscitado em 12,5 mL de PBS 1x, transferido para um tubo contendo e 1,2 de DMEM (4,5 g/L glicose; ThermoFisher, MA, EUA) e centrifugado a 500 g por 15 min. O anel de hepatócitos foi lavado em 30 mL de meio HBSS + SFB 10% e as células ressuscitadas em meio DMEM/F12 + SFB 10% para análise do rendimento e viabilidade por Azul de Tripán 0,85% (Casa da Química, Brasília, Distrito Federal, Brasil) em Câmara de Neubauer com auxílio de microscópio invertido. Foram plaqueadas  $2,5 \times 10^6$  células por poço em 05 configurações de matriz: monocamada de gelatina 2%, monocamada de colágeno 300 µg/mL, sanduíche de gelatina 2%, sanduíche de colágeno 300 µg/mL e sem matriz. Para preparo da matriz em sanduíche, as células não aderentes foram retiradas após 24h de cultivo e depois a segunda camada foi adicionada. Os hepatócitos foram mantidos por 7 dias à 37 °C em estufa com umidade controlada e 5% de CO<sub>2</sub> sendo feitas 3 trocas de meio ao longo deste período. As análises estatísticas foram feitas usando *1-way ANOVA*, no Prism 6 (GraphPad Software Inc, NC, EUA).

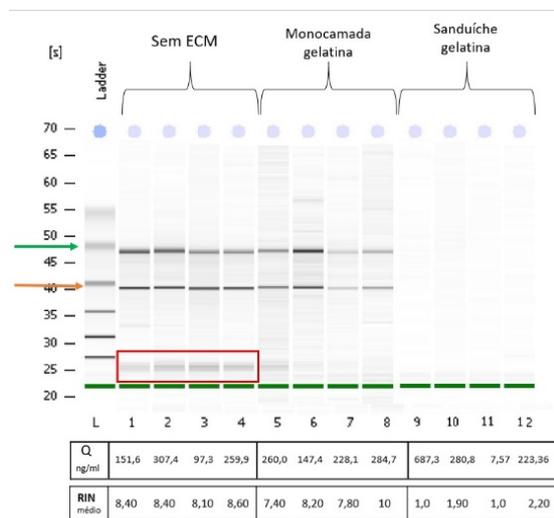
**Extração do RNA:** A extração do RNA foi realizada com a metodologia do TRIzol™ (Invitrogen, CA EUA). Basicamente, o meio de cultura foi retirado e 300 µL de TRIzol foram adicionados a cada poço. O lisado foi centrifugado e à fase clara adicionou-se 60 µL de clorofórmio, seguido por incubação e centrifugação (12.000 g por 5min). Foram adicionados 2 µL de glicogênio e 150 µL de isopropanol à fase aquosa obtida, que foi então incubada e centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 300 µL de etanol 75%, centrifugado e deixado para secar por 15 minutos. Por fim, o *pellet* foi suspenso em 20 µL de água RNase *free* e incubado em banho maria a 55 °C por 10min. O RNA extraído foi quantificado no Nanodrop 1000 (ThermoFisher, MA, EUA) e a qualidade foi analisada com o uso do equipamento de eletroforese capilar Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, EUA), que calcula a integridade através de um algoritmo (RIN) e o classifica numa escala de 1 a 10, onde 1 corresponde à RNA muito degradado e 10 altamente íntegro.

## Resultados e Discussão

A viabilidade celular avaliada pela coloração com Azul de Trypan demonstrou maior eficiência com a dupla camada de colágeno (sanduíche) e a monocamada de gelatina (Figura 1). O total de células viáveis com a monocamada chegou a  $1,7 \times 10^6$  células/g de fígado, com uma média de 52,2% de viabilidade. A quantificação de RNA e qualidade também foram maiores no cultivo com monocamada de gelatina (Figura 2). Apesar da proximidade do RNA *Integrity Number* (RIN) médio entre as amostras de cultivo de monocamada de gelatina e sem ECM, nota-se maior degradação na amostra sem matriz (Figura 2, destacado em vermelho).



**Figura 1.** Viabilidade de hepatócitos bovinos isolados e cultivados *in vitro* com cinco configurações diferentes de matriz após 24h de cultivo. No eixo y: Viabilidade de hepatócitos calculada pela divisão do número de células viáveis pelo número total de hepatócitos contados na câmara de Neubauer. No eixo x: configurações de matriz utilizadas. \*T-test,  $p < 0,05$ .



**Figura 2.** Integridade do RNA extraído de hepatócitos bovinos. Gel capilar de amostras cultivadas: sem ECM (linhas 1 a 4), com monocamada de gelatina (linhas 5 a 8) e sanduíche de gelatina (linhas 9 a 12). Em destaque, bandas das subunidades de rRNA 28S (seta verde), 18S (seta laranja) e bandas de degradação do RNA (box vermelho). A quantificação e RIN calculado para cada amostra também está apresentado no extremo inferior da figura.

## Conclusões

Foi estabelecido um protocolo de cultivo de hepatócitos bovinos com alta viabilidade e qualidade de material genético para estudos de metabolização de drogas, imunomodulação e sinalização intracelular de bovinos *in vitro*.

## Agradecimentos

Esse trabalho foi realizado graças ao financiamento da Fapemig e apoio da Embrapa Gado de Leite e MCTI/INCT – Ciência Animal. Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## Referências

EHRHARDT S, SCHMICKE M. Isolation and cultivation of adult primary bovine hepatocytes from abattoir derived liver. **EXCLI Journal** 2016; 15:858-866.

FRANCISCHETTI, I.; MATHER, T.; RIBEIRO, J. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, 2005.

GARCIA GR, MARUYAMA SR, NELSON KT, et al. Immune recognition of salivary proteins from the cattle tick *Rhipicephalus microplus* differs according to the genotype of the bovine host. **Parasites & Vectors** 2017; 10:144.

LEE JTY, KENNETH CMC, LEUNG VYL Systematic Study of Cell Isolation from Bovine Nucleus Pulposus: Improving Cell Yield and Experiment Reliability. **Journal of Orthopaedic Research** (2015); 33:12.

MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. **The Journal of Pathology**, v. 181, n. 3, p. 257-266, 1997.

OLIVEIRA, C. et al. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as potential targets. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 288-297, 2010.

POOLE, N. M., MAMIDANNA, G., SMITH, R. A., COONS, L. B. E COLE, J. A. Prostaglandin E2 in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 261, 2013.

VALENZUELA, J.G.; CHARLAB, R.; MATHER, T.N.; RIBEIRO, J.M. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. **J. Biol. Chem.** v.275, p.18717–18723, 2000.

ZHANG ZG, LI XB, et al. An updated method for the isolation and culture of primary calf hepatocytes. **The Veterinary Journal** 191 (2012) 323–326.