

Desenvolvimento e estabelecimento de linha celular de blástula de *Xenopus laevis*

A redução do uso de experimentação animal tem-se tornado uma prioridade nos últimos anos. As metodologias *in vitro*, nomeadamente através da realização de experiências com linhas celulares, têm demonstrado constituir uma alternativa rápida, simples, de baixo custo e sensível à experimentação animal. O desenvolvimento destas metodologias é particularmente relevante no contexto de avaliação de risco (AR) de contaminação em anfíbios, uma vez que esta Classe de vertebrados apresenta uma grande proporção de espécies ameaçadas a nível mundial, sendo a poluição um dos principais fatores a contribuir para esse declínio. O presente estudo pretendeu isolar e desenvolver uma linha celular de blástula da espécie de anfíbio *Xenopus laevis*, de modo a poderem ser utilizadas em fases iniciais de AR de compostos químicos em anfíbios. Para tal, utilizaram-se embriões de *X. laevis* em fase de blástula aos quais se removeu a gelatina e a membrana vitelina. Foram testados vários protocolos de descontaminação dos ovos e diferentes condições de cultura celular, variando o meio de cultura, e as concentrações de antibiótico e fungicida. O presente trabalho permitiu desta forma o desenvolvimento de uma cultura celular primária proveniente do estágio de desenvolvimento de blástula de *X. laevis*.

Palavras-chave

culturas celulares
in vitro
Xenopus laevis
rã-de-unhas-africana
anfíbios
linha celular de embrião

Helena Pires¹

Verónica Bastos^{1*}

Helena Oliveira¹

Isabel Lopes¹

¹ CESAM e Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, Portugal.

* veronicabastos@ua.pt

INTRODUÇÃO

A classe Amphibia refere-se a um grupo de animais vertebrados ectotérmicos (a sua temperatura corporal é regulada de acordo com a temperatura ambiental) anamniotas, isto é o ovo não possui âmnio e consequentemente é desprovido de saco amniótico. O termo “anfíbio” deriva do grego *amphibios*, que significa “ter uma vida dupla”, refletindo esta estratégia de vida, apesar de algumas espécies apresentarem ciclos de vida completamente aquáticos ou terrestres. São conhecidas mais de 8000 espécies de anfíbios, que se distribuem por três ordens – Anura (sapos e rãs), Caudata (tritões e salamandras) e Gymnophiona (cobras-cegas) (AmphibiaWeb, 2019). Os anfíbios ocorrem amplamente por todo o planeta, estando apenas ausentes nas regiões polares, nas ilhas oceânicas mais remotas e nos desertos mais áridos (Duellman e Zug, 2019) (Figura 1).

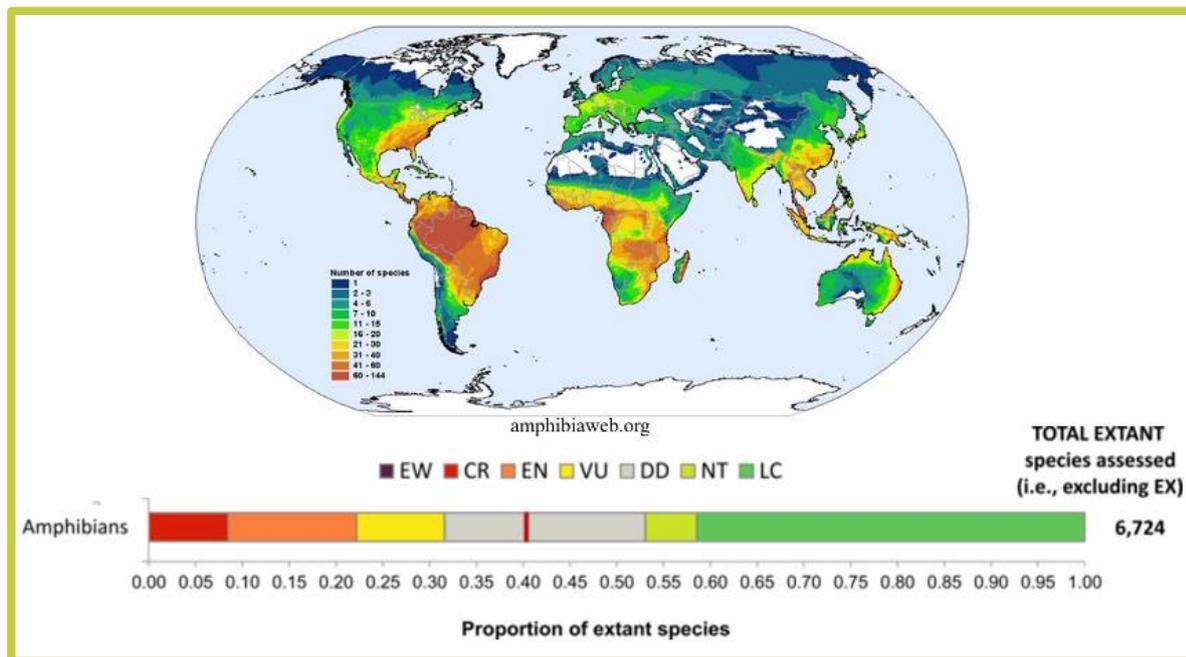


FIGURA 1: Distribuição geográfica mundial da classe Amphibia em 2019. Fonte: amphibiaweb.org; iucnredlist.org.

Desde os anos 80, tem-se vindo a observar um declínio das populações de anfíbios (Gibbons *et al.*, 2000; IUCN, 2020). Entre as potenciais causas encontram-se a perda e degradação de habitat, doenças infecciosas, espécies invasoras, contaminação química, radiação ultravioleta, alterações climáticas, e captura ilegal (ex.: Berridge *et al.*, 2008; Sparling *et al.* 2010). Pensa-se atualmente que as doenças infecciosas podem ter um impacto no declínio das populações de anfíbios tão grande como a destruição de habitats. Uma das doenças conhecidas com maior impacto nas populações naturais de anfíbios é a quitridiomiose, causada por um fungo parasita (*Batrachochytrium dendrobatidis*) (ex.: Whittaker e Vredenburg, 2011; Jenkinson *et al.*, 2018; Fisher e Garner, 2020). Esta doença é uma das grandes causas do declínio das populações de anuros da Austrália e da América Central, com impactos também na Europa e América do Norte, causando até a extinção de algumas espécies (Stuart, 2004; Lips, 2018). Por outro lado, a contaminação química tem também contribuído para um declínio muito acentuado dos anfíbios a nível mundial. As fontes de contaminação química são muito variadas, e incluem diversos grupos de compostos químicos, como por exemplo os metais, pesticidas (ex. carbamatos, organofosfatos, organoclorados), fertilizantes, antibióticos, derivados de petróleo, entre outros. Os anfíbios podem estar expostos a estes compostos quer através do compartimento aquático

quer do terrestre, por contacto direto através da pele e/ou brânquias. Pode ainda ocorrer a incorporação de compostos químicos por ingestão, a partir de partículas nos solos, sedimentos e de alimentos, ou inalação. No início do presente milénio, o conhecimento sobre os efeitos dos contaminantes em anfíbios era bastante escasso (Gibbons *et al.*, 2000), mas desde 2000, o número de estudos tem vindo a aumentar (Slaby *et al.*, 2019), demonstrando que esta área de investigação é muito importante para percebermos as causas do declínio das populações de anfíbios e promover a sua conservação.

Os anfíbios possuem muitas características que os tornam ideais como animais modelo em várias áreas do conhecimento. Estas incluem: fisiologia básica muito bem estudada, uma elevada diversidade específica e de modos de reprodução e de vida, filogenias bem estabelecidas e conhecidas, capacidade de colonizar uma ampla gama de habitats, existem espécies com uma gama de tolerância ao oxigénio e à temperatura extensa, são sensíveis a perturbações ambientais e são de fácil manutenção em laboratório (Burggren e Warburton, 2007). Na Classe Amphibia, e no contexto de investigação científica, destaca-se uma espécie da Família Pipidae comumente utilizada como espécie modelo em estudos de diversas áreas do conhecimento: a rã-de-unhas-africana, *Xenopus laevis*. Esta espécie, caracterizada por possuir três unhas nos membros posteriores, tem origem na região da África subsariana e possui um ciclo de vida totalmente aquático (Goldin, 1992). Os seus ovos são libertados em grandes quantidades e fáceis de manipular, sendo uma ferramenta inestimável para o estudo do desenvolvimento embrionário, toxicologia, genómica, neurobiologia, entre outras áreas da biologia e biomedicina.

Uma vez que a classe Amphibia está em declínio a nível mundial, é essencial perceber o impacto dos compostos químicos nestes organismos. No entanto, considerando o elevado número de produtos químicos produzidos pela sociedade, realizar a sua avaliação ecotoxicológica para anfíbios utilizando ensaios *in vivo* é uma tarefa difícil, principalmente porque lhe estão associadas várias questões éticas. Desta forma, o desenvolvimento de metodologias *in vitro*, nomeadamente através do uso de linhas celulares estabelecidas a partir de tecidos destas espécies, é relevante e necessária de forma a poderem ser utilizadas, como alternativas à experimentação animal, em fases iniciais da avaliação de risco de contaminantes para anfíbios.

No contexto da experimentação animal, aplica-se o princípio dos 3Rs (do inglês *Replacement, Reduction and Refinement*, traduzindo para português: Substituição, Redução e Refinamento) que foi desenvolvido há mais de 50 anos (Russel e Burch, 1959), e fornece um guia para a realização de investigação com animais de forma mais humana. O conceito Substituição, está associado à prerrogativa de sempre que possível se utilizar um método experimental científico que seja satisfatório e não implique o uso de animais vivos.

Estes métodos podem envolver substituição total ou substituição parcial. Como exemplo de substituição total, temos o uso modelos matemáticos e computacionais, enquanto que a substituição parcial inclui a utilização de células e tecidos (Lewis, 2019). O conceito Redução, envolve a diminuição do número de animais a ser usados nos procedimentos experimentais para um número mínimo que não comprometa atingir os objetivos que foram estabelecidos. Finalmente, o conceito Refinamento pretende promover o bem-estar dos animais utilizando metodologias que eliminem ou reduzam ao mínimo a dor, sofrimento, angústia e danos duradouros que possam ser induzidos nos animais durante a realização dos procedimentos experimentais (Russell e Burch, 1959).

As culturas celulares de anfíbios constituem alternativas úteis do arsenal de células que podem ser propagadas *in vitro*, pois têm características incomuns entre os vertebrados (Rafferty, 1969). Nos primórdios da biologia celular, o tamanho grande dos glóbulos vermelhos dos anfíbios permitiu o estudo dos mesmos em estudos de hematologia (Forman *et al.*, 1976; Mitsuru, 1981). Atualmente, as células de anfíbios são muito usadas no estudo da replicação de cromossomas, da regulação do ciclo celular e de várias vias de sinalização celular (Burggren e Warburton, 2007; Freeburg, 2016). Contudo, apesar de as primeiras culturas celulares terem sido desenvolvidas a partir de células de anfíbios (em meados do século XX), as experiências pioneiras de Ross Harrison (1870-1959) surgiram com a utilização de pequenos pedaços de tecido embrionário de sapo (Landecker, 2002), o nosso conhecimento sobre os requisitos e condições de cultura para este tipo de células é ainda muito limitado comparativamente ao conhecimento existente para culturas de linhas celulares de organismos homeotérmicos.

As condições necessárias para o desenvolvimento de linhas celulares variam com o tipo de célula, e incluem temperatura, bom substrato e meio de cultura. A temperatura apropriada para as células é usualmente igual à temperatura corporal do organismo do qual foram obtidas. Assim, para células de vertebrados ectotérmicos, a temperatura ótima situa-se entre 18 e 25°C, enquanto que para a maioria dos mamíferos, a temperatura tem de ser mantida entre 36 e 37°C. O meio de cultura é o fator mais importante para manter uma cultura celular e também o mais complexo. É através do meio de cultura que se fornecem os nutrientes e factores de crescimento necessários às células, além disto é ainda necessário fornecer os gases apropriados ao crescimento celular, regular o pH e a osmolaridade (Ryan, 2008).

Um dos problemas mais comuns do desenvolvimento de culturas celulares primárias é a contaminação das mesmas. Esta pode ser de dois tipos: química ou biológica. A contaminação química é a mais difícil de detetar, visto ser causada por agentes invisíveis, tais como, vestígios de desinfetantes, iões metálicos, entre outros. A contaminação biológica é causada por leveduras, bactérias e fungos, que têm geralmente um crescimento muito rápido. Este tipo de contaminação é normalmente fácil de detetar, pois tem efeitos visíveis na cultura, e pode ser evitada com o uso seletivo de antibióticos, para além de técnicas de assepsia (Ryan, 2008).

No contexto acima descrito, este trabalho teve como principal objetivo isolar e desenvolver uma linha celular de embriões em fase de blástula de *Xenopus laevis* com a finalidade de ser proposta para a realização de ensaios de *in vitro* em fases iniciais de avaliação de risco de contaminantes para anfíbios.



MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes adultos de *X. laevis* foram mantidos sob condições de temperatura e fotoperíodo consideradas ótimas para esta espécie: $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e um ciclo de 14:10 luz:escuro. Cada adulto foi mantido individualmente em aquários de ca. 20 L. Esta espécie apresenta respiração cutânea e pulmonar, pelo que necessita ter acesso fácil ao ar. De modo a facilitar o acesso à superfície da água, os aquários onde os animais foram mantidos foram preenchidos com 5-8 L de modo a que o nível da água não ultrapassasse os 12 cm. A espécie de anfíbio *X. laevis* habita preferencialmente sistemas lênticos dulçaquícolas (Goldin, 1992), pelo que os sistemas de cultura dos adultos mimetizaram estas condições (Figura 2).

Todos os aquários dos sistemas com recirculação de água foram sifonados em dois terços da sua capacidade, sendo repostos o mesmo volume de água, três vezes por semana de forma a garantir a boa qualidade da água. Por forma a monitorizar a qualidade da água, os parâmetros como pH, a quantidade de amónia, nitritos, nitratos e oxigénio dissolvido foram avaliados todas as semanas.

No seu ambiente natural, os hábitos alimentares de *X. laevis* incluem maioritariamente artrópodes vivos, mortos ou moribundos e outros pedaços de matéria orgânica. Estes organismos têm um apetite voraz, ingerindo todo o alimento que encontram (Avila e Frye, 1978). A alimentação que foi fornecida aos organismos adultos de *X. laevis* mantidos em laboratório mimetizou o tipo de alimentação na natureza e assegurou as suas necessidades nutricionais.

A reprodução de *X. laevis* foi induzida através da injeção de um casal (macho e fêmea) com a hormona gonadotropina coriónica humana (hCG). Ao final do dia os animais foram injetados com a hormona, o macho com 100 IU e a fêmea com 500 IU de hCG da região dorsal onde se encontram localizados os sacos linfáticos. Após este procedimento, ambos os animais foram introduzidos numa tina com aproximadamente 50L de água filtrada e envelhecida, onde foi colocada uma rede de forma a evitar que os animais pudessem provocar danos físicos nos ovos, e deixados a 23°C no escuro até à manhã do dia seguinte.

No dia seguinte os ovos libertados foram observados à lupa (Figura 3) de forma a confirmar a sua fertilização e o estágio de desenvolvimento. Os embriões na fase de blástula foram selecionados para se prosseguir com o protocolo de isolamento e estabelecimento de culturas de células primárias.

Os procedimentos usados no desenvolvimento e estabelecimento das linhagens celulares foram adaptados a partir de técnicas descritas por Smith e Tata (1991) e Freed e Mezger-Freed (1970) e complementadas com a técnica de remoção da gelatina e membrana vitelina dos embriões de Okamoto (1972).

Foram realizados quatro procedimentos diferentes variando as condições do meio e da cultura celular.

1.º procedimento

Numa câmara de fluxo, 20 embriões em fase de blástula foram colocados em 2 placas de Petri (10 em cada placa) e lavados várias vezes com solução de FETAX estéril (NaCl (62,5 mg/L), NaHCO₃ (96 mg/L), KCl (30 mg/L), CaCl₂ (23,4 mg/L), CaSO₄ (60 mg/L), MgSO₄ (145,05 mg/L)), com uma pipeta de Pasteur. Retirou-se o meio de lavagem e incubaram-se os embriões em 5 mL de tripsina-EDTA 0,25% por um período de 16 h, de modo a remover a membrana vitelina e a gelatina. Após este período, transferiu-se a solução de tripsina com



FIGURA 2: Sistemas de recirculação de água usados nas culturas de *Xenopus laevis* e os respetivos aquários. Fonte: Sara Costa.



FIGURA 3: Embriões de *Xenopus laevis* em fase de blástula. Fonte: Helena Pires.



as células para tubos Falcon de 15 mL e centrifugou-se a 200g durante 5 minutos. Removeu-se a tripsina e ressuspenderam-se as células no meio completo (50% L-15, 10% FBS, 40% água destilada estéril, 50 µg/mL Pen-Strep, 2,5 µg/mL Fungizone), transferindo-as e cultivando-as em placas de Petri com 5 mL de meio. As células foram ulteriormente observadas num microscópio invertido e colocadas a incubar a 25°C, no escuro, durante 2 dias. De seguida, descartou-se uma das culturas e substituiu-se o meio da outra, aumentando a concentração de fungizona para 6,5 µg/mL. Deixou-se incubar durante um dia nas mesmas condições, a 25°C, no escuro. Fez-se a passagem das células cultivando-as num novo meio com 6,5 µL/mL de fungizona e 100 µg/mL de Pen-Strep. Observou-se a cultura num microscópio invertido, diariamente.

2.º procedimento

Numa câmara de fluxo, lavaram-se 3 embriões em fase de blástula várias vezes em água destilada estéril numa placa de Petri. De seguida, os embriões foram deixados em solução de mertiolato (100 mg/mL) durante 15 minutos e posteriormente lavados várias vezes em meio FETAX (meio artificial padronizado que é utilizado para a manutenção de estádios de desenvolvimento aquático de anfíbios em laboratório) suplementado com 0,25 mL de Gentamicina (25 µg/mL). Os embriões foram depois incubados numa solução contendo 10 mL de Tripsina (0,25%) + Tioglicolato de sódio à temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e foi-se observando periodicamente. Após 4 horas, apesar de a gelatina já ter sido removida, os ovos ainda se encontravam inteiros, pelo que se aplicou força mecânica com uma pipeta de Pasteur contra as paredes da placa de Petri, até que estes se desfizessem. Transferiu-se a solução com as células para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugou-se a 200g durante 5 minutos. Removeu-se a solução e ressuspenderam-se as células no meio completo. O meio completo deste 2º procedimento consistiu em: 50% L-15, 10% FBS, 40% água destilada estéril, 50 µg/mL Pen-Strep, 0,2 µg/mL Micostatin. Seguidamente, transferiu-se a solução para frascos de cultura de 25 cm² com 5 mL do mesmo meio e deixou-se a incubar a 25°C, no escuro, durante dois dias. Depois desse período, substituiu-se o meio e observou-se a cultura num microscópio invertido, diariamente.

3.º procedimento

Repetiu-se o 2.º procedimento descrito acima, com 5 embriões, e aumentou-se a concentração de Pen-Strep para 100 µg/mL. Após dois dias, substituiu-se o meio, retirando o meio antigo, lavando com PBS e, por fim, colocando 5 mL de meio novo, que consistiu em: 50% L-15, 10% FBS, 40% água destilada estéril, 100 µg/mL Pen-Strep, 0,2 µg/mL Micostatin. Deixou-se a cultura a a incubar nas mesmas condições, observando-se diariamente. Após quatro dias, substituiu-se parcialmente o meio e deixou-se novamente a incubar. Voltou-se a trocar parcialmente o meio cinco dias depois.

4.º procedimento

Repetiu-se o 3.º procedimento, em quatro recipientes. Em cada frasco foi colocado um meio de cultura diferente, variando a concentração de L-15 e de Pen-Strep. Os meios completos testados deste 4.º procedimento consistiram em: Frasco 4.1 - 50% L-15, 10% FBS, 40% água destilada estéril, 75 µg/mL Pen-Strep, 0,2 µg/mL Micostatin; Frasco 4.2 - 50% L-15, 10% FBS, 40% água destilada estéril, 50 µg/mL Pen-Strep, 0,2 µg/mL Micostatin; Frasco 4.3 - 90% L-15, 10% FBS, 50 µg/mL Pen-Strep, 0,2 µg/mL Micostatin; Frasco 4.4 - 59% L-15, 10% FBS, 31% água destilada estéril, 50 µg/mL Pen-Strep, 0,2 µg/mL Micostatin.

RESULTADOS

1.º Procedimento

No primeiro ensaio foram preparadas duas culturas celulares. Dois dias após a iniciação, ambas as culturas apresentaram contaminação bacteriana. Uma vez que a contaminação era residual numa das culturas, e esta continha células aderentes e alguma divisão celular, procedeu-se ao seu sub-cultivo para uma nova caixa. Esta nova sub-cultura foi mantida em meio suplementado com 6,25 µg/mL de fungizona e 100 µg/mL de Pen-Strep. Este procedimento não revelou ser eficaz na remoção da contaminação e após três dias a cultura foi descartada (Figura 4).

2.º procedimento

No 2.º procedimento, após 2 dias de iniciação, a cultura apresentou células em suspensão sem contaminação aparente por microrganismos. No entanto, após 5 dias da iniciação observou-se contaminação bacteriana na cultura e descartou-se a mesma. As bactérias apresentavam forma de bastonete com aspeto sugestivo de bacilos (Figura 5). Existiam células aderentes, no entanto, não se observou multiplicação celular significativa.

3.º procedimento

No 3.º procedimento, 6 dias após a iniciação, a cultura apresentou células em suspensão (Figura 6A), que foram retiradas com a substituição do meio de cultura. Ao fim de 17 dias, observou-se contaminação bacteriana (Figura 6B), no entanto, as células que permaneciam semiaderentes não apresentaram crescimento significativo durante esse período. As bactérias eram morfológicamente semelhantes às do 2.º ensaio, com forma de bastonete.

4.º procedimento

No início do 4.º procedimento, as culturas apresentavam uma grande quantidade de células (Figura 7), no entanto a maioria revelou não estar aderente quando se substituiu o meio, após 6 dias de iniciação das culturas.

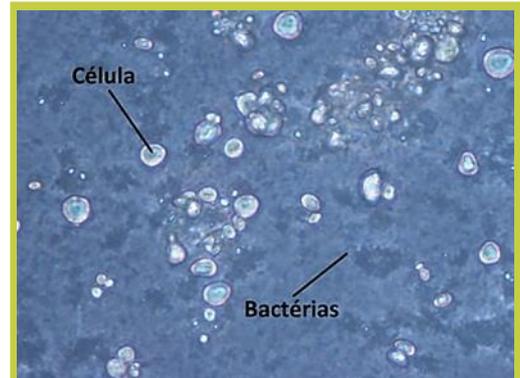


FIGURA 4: Imagens de microscopia ótica (400x) da cultura de células de blástula de *Xenopus laevis* (frasco 1.2 do 1.º procedimento, Tabela I) com contaminação bacteriana após um período de cultura de 4 dias. Fonte: Helena Pires

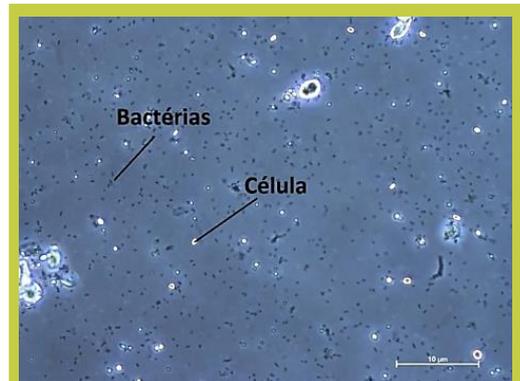


FIGURA 5: Imagens de microscopia ótica (200x) da cultura de células de blástula de *Xenopus laevis* (frasco 2, Tabela I) com contaminação bacteriana. Fonte: Helena Pires.

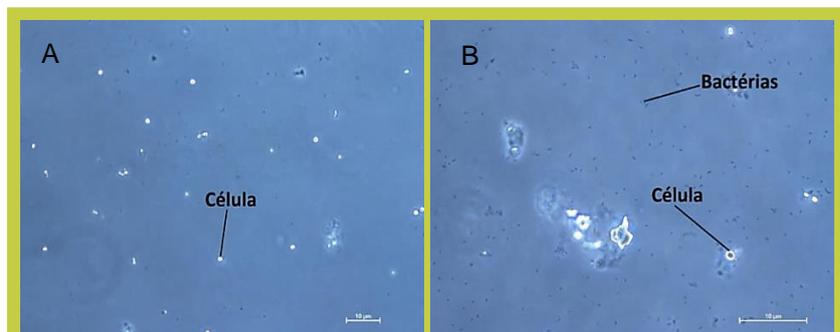


FIGURA 6: Cultura de células de blástula de *Xenopus laevis* (3) A - após um período de cultura de 13 dias (Imagens de microscopia ótica (100x)); B - com contaminação bacteriana após um período de cultura de 17 dias (Imagens de microscopia ótica (200x)). Fonte: Helena Pires

Após esse período, o frasco 4.4 apresentava contaminação bacteriana e foi descartado (Figura 8A). Após 9 dias do início da cultura, descartou-se o frasco 4.2 visto que este também apresentava contaminação por microorganismos (Figura 8B). Após 15 dias de cultura, observou-se contaminação bacteriana no frasco 4.3 (Figura 8C) e descartou-se o mesmo.

O frasco 4.1, cujo meio era composto por 50% de L-15 e 75 µg/mL de Pen-Strep, permaneceu para futuras observações (Figura 9), uma vez que a cultura não apresentava contaminação.

Este frasco continha células em suspensão e outras num estado semiaderente, apresentando multiplicação celular lenta.

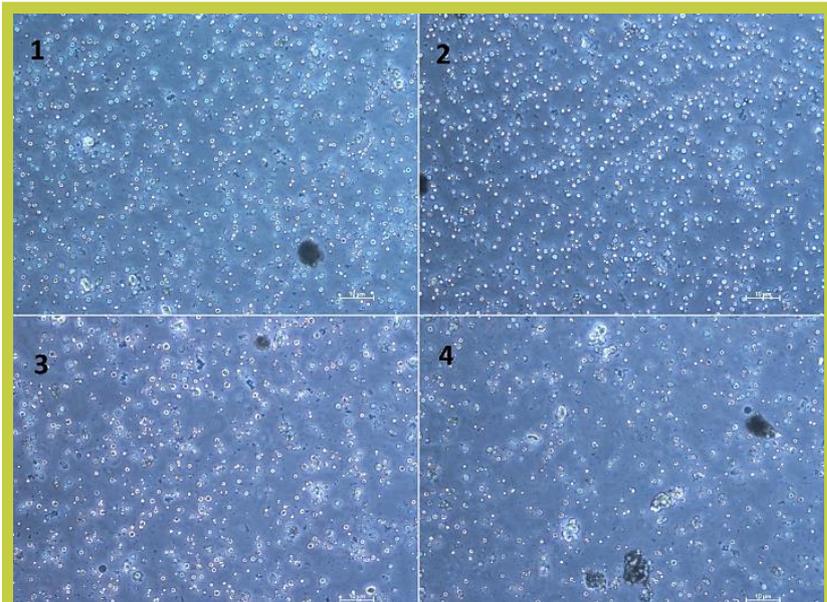


FIGURA 7: Imagens de microscopia ótica (100x) das culturas de células de blástula de *Xenopus laevis* (4.1, 4.2, 4.3 e 4.4, Tabela I) após um período de cultura de 2 dias. Fonte: Helena Pires

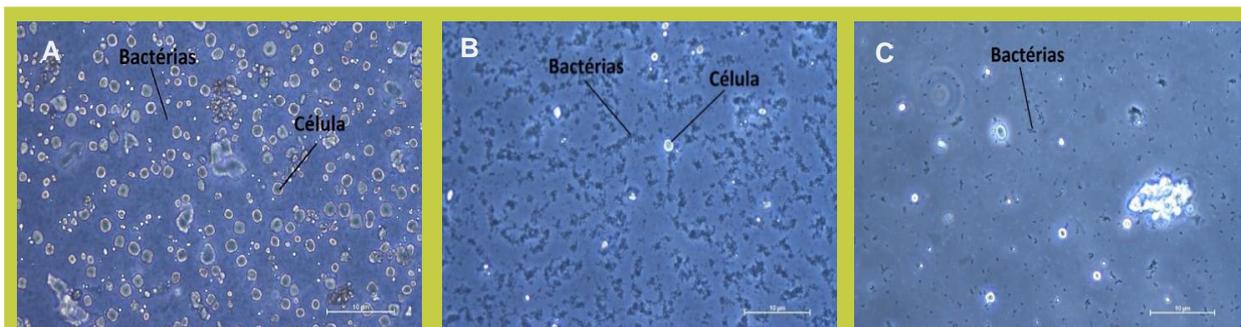


FIGURA 8: Imagens de microscopia ótica (200x) da cultura de células de blástula de *Xenopus laevis* A – Frasco 4.4 com contaminação bacteriana após um período de cultura de 6 dias; B – Frasco 4.2 com contaminação bacteriana após um período de cultura de 9 dias; C - Frasco 4.3 com contaminação bacteriana após um período de cultura de 15 dias. Fonte: Helena Pires

Como se pode verificar pela análise da Tabela I onde estão sumarizadas as condições utilizadas e os resultados obtidos, as culturas dos ensaios posteriores ao 1.º procedimento persistiram mais tempo sem contaminação, e as culturas com maior concentração de Pen-Strep (3 e 4.1) não contaminaram tão rapidamente.

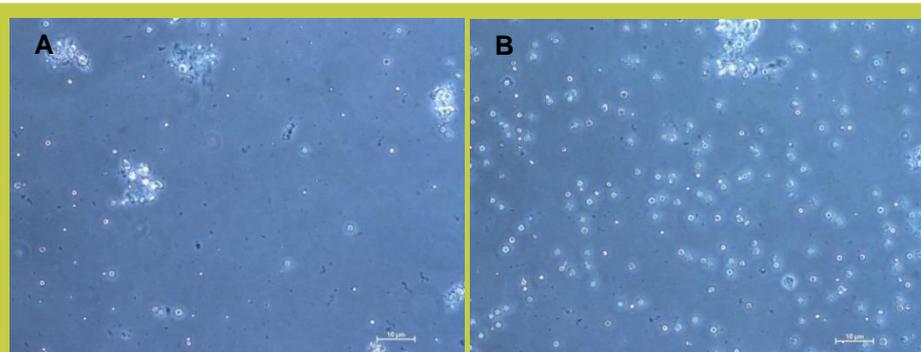


FIGURA 9: Imagens de microscopia ótica (100x) da cultura de células de blástula de *Xenopus laevis* frasco 4.1 A – após um período de cultura de 15 dias; B - após um período de cultura de 28 dias. Fonte: Helena Pires

TABELA I: Resultados sumarizados dos 4 procedimentos realizados, para estabelecimento da linha celular de blástula de *Xenopus laevis*, salientando as diferenças entre os meios, os recipientes de cultura usados, a ocorrência de divisão celular e a longevidade de cada cultura.

Ensaio	Frasco	Número de passagens/ substituição de meio	Recipiente	Divisão celular	Dias sem ocorrência de contaminação
1	1.1	0	Placa de petri 3,5 cm	N/A	3
	1.2	2		Fungizona (6,25 µg mL ⁻¹) Pen-Strep (100 µg mL ⁻¹), Fungizona (6,25 µg mL ⁻¹)	Sim
2	2	1	Frasco de cultura de 25 cm ²	N/A	6
3	3	3	Frasco de cultura de 25 cm ²	N/A	17
4	4.1	1	Frasco de cultura de 25 cm ²	Sim	+28
	4.2	1		N/A	9
	4.3	1		N/A	15
	4.4	0		N/A	6

DISCUSSÃO

A redução da experimentação animal é uma preocupação cada vez mais emergente na comunidade científica. No ano de 2017, na Grã-Bretanha, foram realizados 3,79 milhões procedimentos científicos envolvendo animais, sendo este o número mais baixo desde 2010 (Home Office, 2018). Em toxicologia, a alternativa mais usada para substituir o uso de animais é o desenvolvimento de culturas celulares, já que estas apresentam a grande vantagem de permitir isolar e caracterizar células, controlar com precisão o ambiente físico-químico da cultura, como o pH, temperatura, osmolaridade e gases dissolvidos, e as condições fisiológicas, tais como a quantidade de hormonas e nutrientes. Contudo, não há muitos relatos bem-sucedidos no estabelecimento de linhagens celulares de anfíbios, indicando que o desenvolvimento de culturas primárias destes organismos é um processo difícil e trabalhoso, tendo em consideração que se baseia em tentativa e erro. Para além disso, a bibliografia existente referente ao desenvolvimento e estabelecimento de linhas celulares de *Xenopus laevis* é muito escassa e antiga (ex.: Balls *et al.*, 1966; Pudney *et al.*, 1973; Nishikawa *et al.*, 1990; Smith e Tata, 1991).

Neste trabalho, o fator mais difícil para o estabelecimento das culturas celulares de blástula foi controlar a contaminação inerente a estes ambientes já que a reprodução ocorre no meio aquático onde se encontram os adultos. Como os embriões possuem flora microbiana associada, os métodos para a sua descontaminação nem sempre foram suficientes e/ou apropriados. A descontaminação dos embriões com solução de mertiolato revelou ser o método mais eficaz para a redução da contaminação das culturas celulares.

A contaminação é, de facto, um dos problemas mais comuns inerentes ao estabelecimento de culturas primárias (Yoshino *et al.*, 2013). O meio de cultura celular, sendo rico em nutrientes, oferece boas condições de crescimento para as células alvo, mas também para os microrganismos. Vários trabalhos reportam a ocorrência de contaminações bacterianas, fúngicas e de protozoários, apesar do uso de antibióticos durante o processo de desenvolvimento das culturas celulares. Por exemplo, van der Merwe *et al.* (2010) deparou-se

com contaminações bacterianas frequentes ao tentar estabelecer uma cultura celular primária de molusco, apesar de ter suplementado o meio de cultura com 1% (v/v) de Pen-Strep e 0,5% (v/v) de Gentamicina. Igualmente, Gómez-Mendikute et al. (2005) relatou contaminação das linhas celulares primárias provenientes de brânquias de mexilhão, após 5 dias em cultura, apesar da utilização de 100 U /mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 100 µg/mL neomicina e 100 µg/mL canamicina no meio de cultura. Foi também reportado por Biernelin et al. (1999) contaminação por bactérias no estabelecimento de culturas celulares primárias provenientes da glândula digestiva de mexilhão, apesar do meio de cultura conter 1% de gentamicina e 1% de AntiPPL0 (direcionado para micoplasma). Por outro lado, duas das culturas primárias de carraça estabelecidas por Fang-Shiang (2017) foram contaminadas por fungos, independentemente do uso de Pen-Strep e de 25 µg/mL do antifúngico Anfotericina B.

Não parece existir um protocolo único para evitar as contaminações nas culturas celulares, uma vez que nem todas as culturas são iguais. Um protocolo que apresente eficácia para um tipo de cultura celular, poderá não funcionar para outro tipo de células. A utilização de antibióticos na cultura de células de anfíbios permite o controlo da contaminação, contudo, pode contribuir para a diminuição da sobrevivência das células, fragilizando a integridade celular e eventualmente potenciando o desenvolvimento de estripes de bactérias resistentes (European Collection of Cell Cultures (ECACC) and Sigma-Aldrich, 2001). O uso de antibióticos é bastante comum, sobretudo quando se trata de estabelecimento de culturas primárias, no entanto, o tipo de antibiótico e a sua concentração é muito variada (Chen e Wang, 1999; Odintsova, *et al.*, 2001). Assim, a concentração de antibióticos deverá ser ajustada de forma a ser eficiente no controlo da contaminação, sem contudo, danificar as células alvo.

Outro problema associado com o estabelecimento de culturas celulares primárias é a senescência das mesmas, isto é, as culturas param de crescer e eventualmente morrem. Este processo ocorre porque a capacidade de divisão das células é limitada, contrariamente às linhas celulares imortalizadas. A esperança de vida das culturas primárias de células de anfíbios não está definida. A bibliografia sobre este fenómeno é limitada e os resultados descritos são ambíguos, contudo, a senescência das culturas celulares primárias é comum. Reves e Laskey (1975), por exemplo, reportaram que, ao fim de seis a oito dias, a monocamada celular das culturas celulares primárias de *X. laevis* parou de crescer, uma vez que as células começaram a diferenciar-se e pararam de se multiplicar.

Neste trabalho, foi possível estabelecer a cultura celular de blástula de *X. laevis* observando-se divisão celular e ausência de contaminação no frasco 1 do 4.º procedimento (frasco 4.1) com suplementação de 10% de FBS e 75 µg/mL de Pen-Strep e incubação a 25°C. Contudo, dada a taxa de divisão lenta, mais condições deverão ser exploradas para determinar as condições ótimas de multiplicação celular tais como a suplementação com 20% de FBS e incubação a 28°C (Barman *et al.*, 2014). Como Okumoto (2001) verificou diferentes padrões de crescimento para a mesma linha celular, sugerindo grande variabilidade, a repetição do procedimento e o desenvolvimento de mais culturas primárias poderá gerar resultados positivos.

As condições do meio serão um dos fatores mais importantes para o sucesso no estabelecimento de culturas celulares primárias. Strauß *et al.* (2013) verificou que para o estabelecimento de células epiteliais de *Andrias davidianus*, o meio de cultura com DMEM/F12 originou melhores resultados que o meio de Leibovitz (L-15) e que a estabilização do pH é fundamental. Deste modo, estes fatores terão de ser tidos em conta em trabalhos futuros.



APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A informação adquirida ao longo deste trabalho é de extrema importância para a redução da experimentação animal, já que reporta as condições mais apropriadas para o estabelecimento de culturas celulares primárias, provenientes de animais utilizados em laboratório, cuja microbiota inerente dificulta a perpetuação das culturas. Este estudo indica os métodos e condições de cultura celular que favoreceram a proliferação celular e reduziram a contaminação que poderão ser reproduzidas e/ou adaptadas para o desenvolvimento de outras linhas celulares primárias.

agradecimentos • Este trabalho teve financiamento da Fundação para a Ciência e Tecnologia e do orçamento de estado através do projeto GOGOFROG (POCI-01-0145-FEDER-030718) e orçamento programático atribuído ao laboratório CESAM (UIDB/50017/2020+UIDP/50017/2020) e co-financiamento do FEDER (POCI-01-0145-FEDER-00763), no âmbito do programa PT2020 Partnership Agreement e Compete 2020. Mais se agradece à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento dos contratos de estímulo ao emprego científico de 2017 a H. Oliveira (CEECIND/04050/2017) e V. Bastos (CDL-CTTRI-161-ARH/2018) dentro do projeto (POCI-01-0145-FEDER-031794).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amphibia Web. *Species By the Numbers*. Acedido a 1/04/2020, em: <https://amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html>.
- Avila VL, Frye PG (1978). Feeding Behavior of the African Clawed Frog (*Xenopus laevis* Daudin): (Amphibia, Anura, Pipidae): Effect of Prey Type. *Journal of Herpetology*, 13(3), 391-396.
- Balls M, Ruben LN (1966). Cultivation in vitro of normal and neoplastic cells of *xenopus laevis*. *Experimental Cell Research*, 43(3), 694-695.
- Berridge R, Chanson J, Cox NA, Hoffmann M, Ramani P, Stuart SN, et al. (2008). *Threatened amphibians of the world*. Lynx Editions.
- Birmelin C, Pipe RK (1999). Primary cell-culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: a time-course study of antioxidant- and biotransformation-enzyme activity and ultrastructural changes. *Marine Biology*, 135, 65-75.
- Burggren WW, Warburton S (2007). Amphibians as Animal Models for Laboratory Research in Physiology. *ILAR Journal*, 48(3), 260-269.
- Chen SN, Wang CS (1999). Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Röding. *Methods in Cell Science*, 21(4), 183-92.
- Duellman WE, Zug GR (2019). *Amphibian*. Acedido a 1/04/2020, em: <https://www.britannica.com/animal/amphibian>
- ECACC (2016). *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook*. The European Collection of Cell Cultures. Acedido a 1/04/2020, em: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/ecacc-handbook.html>.
- Fang-Shiang L, Jing-Jing K, Fezshin C, Lesley Bell-Sakyi, Chee-Sieng K, Li-Yen C, Sazaly Abu Bakar (2017). Initiation of primary cell cultures from embryonic *Haemaphysalis bispinosa* ticks. *Systematic & Applied Acarology*, 22(3), 323-332.
- Fisher MC, Garner TWJ (2020). Chytrid fungi and global amphibian declines. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 332-343.
- Freeburg S H, Engelbrecht E, Powell WH (2016). Subfunctionalization of Paralogous Aryl Hydrocarbon Receptors from the Frog *Xenopus laevis*: Distinct Target Genes and Differential Responses to Specific Agonists in a Single Cell Type. *Toxicological Sciences*, 155(2), 337-347.
- Freed J, Mezger-Freed L (1970). Culture methods for anuran cells. *Methods in Cell Physiology*, 4, 19-47.
- Gibbons JW, Scott DE, Ryan TJ, Buhlmann KA, Tuberville TD, Metts BS, et al. (2000). The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians: Reptile species are declining on a global scale. Six significant threats to reptile populations are habitat loss and degradation, introduced invasive species, environmental pollution, disease, unsustained. *BioScience*, 50(8), 653-666.



- Gómez-Mendikute A, Elizondo M, Venier P, Cajaraville MP (2005). Characterization of mussel gill cells *in vivo* and *in vitro*. *Cell and Tissue Research* 321, 131–140.
- Goldin AL (1992). Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods in Enzymology*, 207, 266-279.
- Goss CM (1937). The Historical Background of Schwann's Cell Theory. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 10(2), 125–144.
- Home Office, UK (2018). *Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals Great Britain 2017*. Acedido a 1/04/2020, em: <https://www.gov.uk/government/statistics/statistics-of-scientific-procedures-on-living-animals-great-britain-2017>
- IUCN (2020). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1. The International Union for Conservation of Nature, Gland, Switzerland.
- Jenkinson TS, Rodriguez D, Clemons RA, Michelotti LA, Zamudio KR, Toledo LF, Longcore JE, James TY (2018). Globally invasive genotypes of the amphibian chytrid outcompete an enzootic lineage in coinfections. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1893), 20181894.
- Landecker H (2002). New times for biology: nerve cultures and the advent of cellular life *in vitro*. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 33(4), 667-694.
- Lewis DI (2019). Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs. *Emerging Topics in Life Science*, 3(6): 675–679.
- Lips KR (2016). Overview of chytrid emergence and impacts on amphibians. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709), 20150465.
- Nishikawa A, Shimizu-Nishikawa K, Miller L (1990). Isolation, characterization, and *in vitro* culture of larval and adult epidermal cells of the frog *Xenopus laevis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 26(12), 1128–1134.
- Odintsova NA, Plotnikov SB, Karpenko A, Eliseikina MG (2001). Myogenic differentiation of *Mytilus* larval cells *in vitro*. *Ontogenez*, 32(5), 367-73.
- Okamoto M (1972). A method for the removal of the jelly and vitelline membrane from the embryos of *Xenopus Laevis*. *Development, Growth & Differentiation*, 14, 37-42.
- Okumoto H (2001). Establishment of Three Cell Lines Derived from Frog Melanophores. *Zoological Science*, 18(4), 483–496.
- Parke EC (2014). Flies from meat and wasps from trees: Reevaluating Francesco Redi's spontaneous generation experiments. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 45, 34-42.
- Parker JT (2006). *Post-Wildfire Sedimentation in Saguaro National Park, Rincon Mountain District, and Effects on Lowland Leopard Frog Habitat*. US Geological Survey.
- Pudney M, Varma MGR, Leake CJ (1973). Establishment of a cell line (XTC-2) from the South African clawed toad, *Xenopus laevis*. *Experientia*, 29(4), 466–467.
- Rafferty KA (1969). Mass Culture of Amphibian Cells: Methods and Observations Concerning Stability of Cell Type. Em M. Mizell, *Biology of Amphibian Tumors. Recent Results in Cancer Research (Special Supplement)* (Vol. 1969, pp. 52-81). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Reeves OR, Laskey RA (1975). *In vitro* differentiation of a homogeneous cell population—the epidermis of *Xenopus laevis*. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, 34: 75–92
- Russell W, Burch RL (1959). *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen.
- Ryan JA (2008). *Introduction to Animal Cell Culture*. Acedido a 1/04/2020, em: <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-AN-042.pdf>
- Schwann T, Schleiden MJ, Smith H (1839). *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants*. Berlin: Sander'schen Buchhandlung.
- Slaby S, Marin M, Marchand G, Lemiere S (2019). Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? *Elsevier*, 248, 478-495.
- Smith JC, Tata JR (1991). *Xenopus Cell Lines. Methods in Cell Biology, Vol. 36*, Academic Press, pp. 635-654.
- Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest SK (2010). *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. 2nd edition. CRC Press, Pensacola, FL.
- Strauß S, Ziegler T, Allmeling C, Reimers K, Frank-Klein N, Seuntjens R, Vogt PM (2011). *In vitro* culture of skin cells from biopsies from the Critically Endangered Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* (Blanchard, 1871) (Amphibia, Caudata, Cryptobranchidae). *Amphibian & Reptile Conservation*, 5, 51–63.



- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues AL, Fischman DL, et al. (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786.
- van der Merwe M, Auzoux-Bordenave S, Niesler C, Roodt-Wilding R (2010). Investigating the establishment of primary cell culture from different abalone (*Haliotis midae*) tissues. *Cytotechnology*, 63(3), 265-277.
- Yoshino TP, Bickham U, Bayne CJ (2013). Molluscan cells in culture: primary cell cultures and cell lines. *Canadian journal of zoology*, 91(6).
- Whittaker K, Vredenburg V (2011). *An Overview of Chytridiomycosis*. Acedido a 1/04/2020, em: <https://amphibiaweb.org/chytrid/chytridiomycosis.html>