

## **Proliferação celular ou replicação celular – por Júlio César Conceição Filho<sup>1</sup>**

Uma nova célula surge no momento em que outra se divide, este fenômeno é conhecido como **proliferação celular**. O ciclo celular de uma célula eucariótica é dividido em duas etapas: intérfase, período em que a célula sintetiza novas proteínas e duplica seu DNA e fase M (mitose) período em que ocorre a divisão celular. Este processo é responsável pela reprodução de todos os organismos. A desregulação deste processo como erros durante a transcrição e síntese do DNA ou a desregulação do ciclo celular pode gerar uma produção demasiada e descontrolada de células formando tumores (câncer).

O ensaio de proliferação celular tem o objetivo de testar a atividade biológica de um determinado composto, seja ele orgânico ou inorgânico, avaliando a sua capacidade de inibir o crescimento de células tumorais. Este ensaio é realizado em placas *Elisa* de 96 poços e é a primeira etapa para avaliar a ação dos diversos produtos naturais, candidatos a novas drogas antitumorais, que chegam ao LABEN através de importantes colaborações com diferentes grupos de pesquisa.

### **Protocolo utilizando o MTT**

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificando o quanto o MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP formando cristais de formazan, de cor azul. Dessa maneira a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Este teste foi primariamente sugerido por Mossman (1983).

### **Reagentes**

1. MTT, 2,5mg/ml.
2. Álcool isopropílico 50µl/poço.

### **Procedimento**

1. Preparar solução de meio com FBS com  $1 \times 10^4$  células/100µl.

---

<sup>1</sup> Júlio Cesar Conceição Filho realiza seu mestrado no LABEN através do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar – UNESP e é bolsista CAPES.

2. Plaquear em placas de 96 poços estéreis e colocar em estufa 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por quatro horas.
3. Em ambiente estéril, retirar o meio de cultura dos poços e adicionar 100µl de meio sem FBS e colocar novamente na estufa por 12-16h.
4. Em ambiente estéril, retirar o meio de cultura e adicionar os compostos, que devem estar diluídos em meio com FBS, aos poços, 200µl/poço.
5. Colocar novamente em estufa por 24, 48 ou 72 horas.
6. Colocar 50µl da solução de MTT em cada poço e encubar por 4h.
7. Retirar o sobrenadante.
8. Diluir os cristais precipitados com 100µl de álcool isopropílico por poço
9. Fazer a leitura em leitor placas a 540nm.

**Bibliografia:**

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. Biologia Molecular da Célula. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 235-331.