

**ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE CÉLULAS MUSCULARES DE
Macrobrachium rosenbergii EM AMBIENTE DE CULTIVO CELULAR**

**JULIANA REBECHI PINTO^{1,2*}, VANIA ZANELLA PINTO^{2,3}, LUISA HELENA
CAZAROLLI^{2,4}, SILVIA ROMÃO^{2,5}**

1 Introdução

O crescimento da demanda mundial por proteínas de origem animal, aliado à necessidade de reduzir os impactos ambientais da produção convencional, tem impulsionado o desenvolvimento da agricultura celular como uma alternativa promissora para a obtenção de alimentos de forma mais sustentável (POST et al., 2020). Nesse contexto, o cultivo de células musculares de organismos aquáticos representa uma área emergente, com potencial para a produção de frutos do mar cultivados in vitro. Entretanto, o estabelecimento de linhagens celulares estáveis ainda constitui um dos principais desafios para a consolidação dessa tecnologia (RUBIO et al., 2019). Assim, este estudo busca estabelecer linhagens primárias e secundárias de células musculares de *Macrobrachium rosenbergii*, contribuindo para o avanço da agricultura celular aplicada à produção de proteínas de origem aquática.

2 Objetivos

Estabelecer linhagens primárias e secundárias de células espontâneas, de células musculares do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, avaliando diferentes condições de cultivo para favorecer seu crescimento, manutenção e potencial aplicação na agricultura celular.

3 Metodologia

Foram realizados dois ensaios experimentais utilizando tecido muscular de camarões *Macrobrachium rosenbergii*, utilizando como base o trabalho de Wang et al, (2001).

1 Acadêmica de Eng. de Aquicultura, UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul, juliana.rebechi@estudante.uffs.edu.br

2 Grupo de Pesquisa: Produção, transformação e armazenamento de alimentos

3 Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul

4 Doutora em Farmácia, UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul

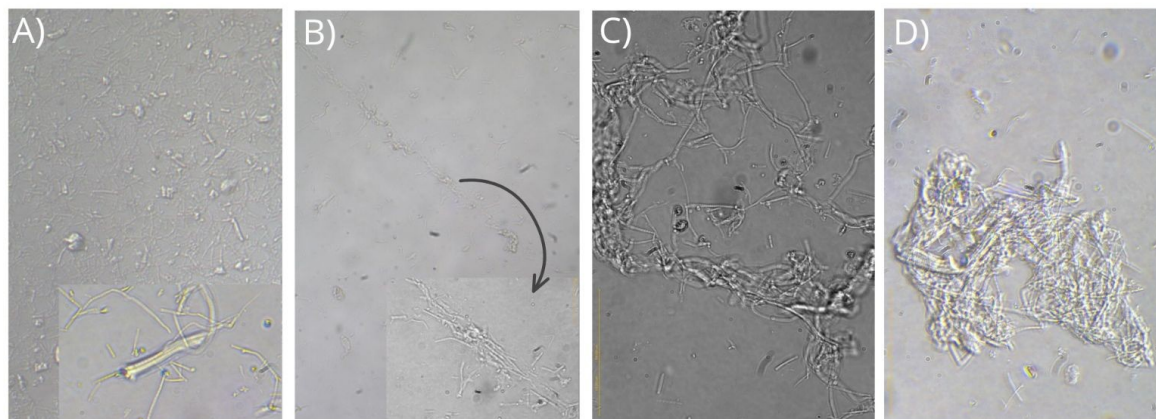
5 Doutora em Bioquímica, UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul, **Orientadora.**

Inicialmente, os animais foram anestesiados em gelo e submetidos à assepsia por imersão em solução de hipoclorito 2,5 %, seguida de permanência em álcool 70% por 10 minutos. Posteriormente, os exemplares foram encaminhados ao Laboratório de Cultivo Celular para a realização da esterilização e dissecação do material biológico. Os procedimentos seguintes foram desenvolvidos em condições assépticas, no interior de uma cabine de fluxo laminar. Inicialmente, o tecido foi lavado em Solução Salina em Tampão Fosfato (Phosphate Buffered Saline - PBS) para facilitar a dissecação. Após sua remoção, o material foi submetido a três imersões consecutivas em álcool 70%, seguido de três lavagens em PBS e transferência para uma placa de Petri contendo solução de PBS e submetido à fragmentação mecânica em pequenos explantes. Os fragmentos obtidos foram destinados a dois protocolos distintos de cultivo celular. Parte dos fragmentos foram utilizados diretamente para o cultivo por explante, enquanto a outra parte foi submetida à digestão enzimática com collagenase tipo II, em PBS na concentração de 0,1%, utilizando um volume de 5ml. Os fragmentos permaneceram em solução de collagenase por 45 minutos. Após a digestão enzimática, a suspensão celular foi centrifugada a $300 \times g$, durante 5 minutos, a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em meio de cultivo Leibovitz L-15, contendo 20% de soro bovino fetal, 5,2 g/L NaCl, 1,43 g/L CaCl₂, 0,05 g/L MgCl₂, 1 g/L glicose, 2,2 g/L bicarbonato de sódio, penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml. Na sequência, foi realizada nova centrifugação nas mesmas condições, visando à remoção residual da collagenase. Ao término desse procedimento, tanto as células obtidas por digestão enzimática quanto os explantes foram inoculados em placas de cultivo de 6 poço contendo meio Leibovitz L-15 contendo meio de cultura, 20% de soro fetal bovino, 2 M de HEPES, penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml, mantidos em câmara de germinação, em temperatura de 26 °C, para o estabelecimento das culturas celulares. Todas as culturas foram acompanhadas diariamente em microscópio invertido e o meio de cultivo trocado a cada 02 dias. Foi realizado ensaio utilizando tripsina, enzima empregada para o desprendimento celular durante o processo de subcultivo. As células foram submetidas a tripsina (2,5 g/L em PBS-EDTA) por 3 minutos, 20 segundos e 10 segundos, com posteriormente retirada da solução de tripsina, adição de meio de cultivo e transferência das células para nova placa de cultivo.

4 Resultados e Discussão

Foi possível estabelecer os cultivos celulares a partir do tecido muscular de *Macrobrachium rosenbergii*. No primeiro ensaio experimental, as culturas permanecem viáveis por 35 dias e ainda estão viáveis. Neste período foi possível observar a adesão celular ao substrato (Figura 1A), seguida por formação de 03 padrões de proliferação: rede celular, cordões celulares e emaranhado de células (Figura 01), indicando a manutenção da viabilidade das células em cultivo. Entretanto, foi observada baixa velocidade de proliferação e houve grande dificuldade e perda de culturas em decorrência de contaminação microbiológica (eventos de contaminação por bactérias e por fungos).

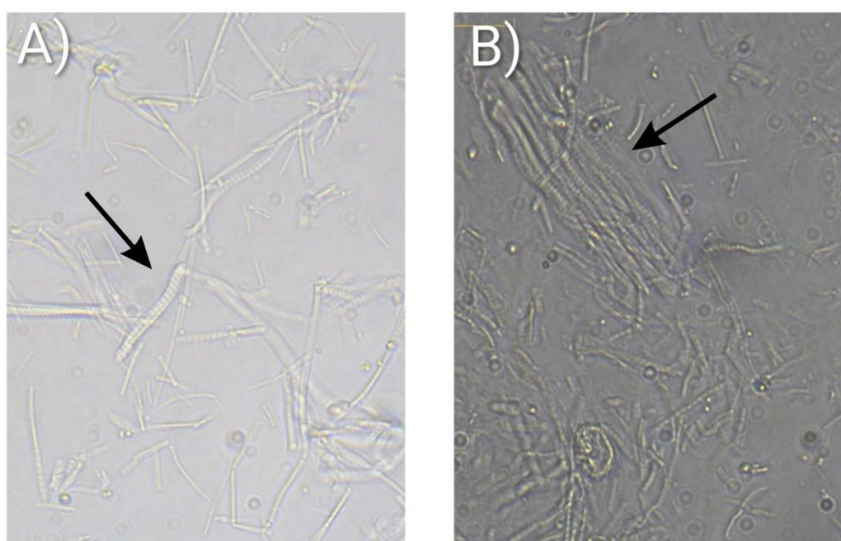
Figura 1: Observações dos cultivos de células musculares de camarão *M. rosenbergii*. As células musculares aderidas à placa de cultivo, ampliação de 100x com detalhe de fibras musculares em ampliação de 400x. B: proliferação de células musculares arranjadas em forma de cordão, ampliação de 100x, com detalhe em ampliação de 400x. C: proliferação de células formando arranjo em rede, ampliação de 400x. D: proliferação de células formando arranjo de emaranhado celular, ampliação de 400x.



No segundo ensaio experimental, as culturas permaneceram viáveis por aproximadamente 15 dias. Durante esse período, novamente foram observados eventos de divisão celular (Figura 2A), além da formação de emaranhados celulares (Figura 2B), sugerindo crescimento e interação entre as células cultivadas. Neste caso as culturas foram perdidas devido à contaminação, impedindo sua manutenção por períodos mais prolongados. A avaliação morfológica das células revelou características compatíveis com células musculares,

apresentando formato cilíndrico alongado e organização de miofibrilas com estriações transversais (Figura 2). Essas características são descritas na literatura como típicas de células musculares esqueléticas, indicando que o protocolo empregado possibilitou o isolamento e o estabelecimento inicial desse tipo celular em cultivo.

Figura 2: Células musculares de *M. rosenbergii* em cultivo. A e B Detalhes das fibras musculares com identificação da estrutura cilíndrica e estriações transversais. Ampliação 400x.



Também foi realizado ensaio com tripsina para descolamento celular, prática essencial em ambiente de cultivo, para a obtenção de subculturas. Houve perda da viabilidade celular quando as células foram submetidas a enzima tripsina por um período de 3 minutos. Porém foi observado descolamento celular e manutenção da viabilidade das células, quando submetidas à 10 e 20 segundos de tripsinização e transferência das células para outra placa de cultivo. A formação de linhagem de células imortalizadas (linhagens secundárias) é necessária para seu uso em produção em larga escala. As técnicas de imortalização de células estão relacionadas à transformação através de engenharia genética ou obtenção de linhagem secundária por atingir imortalidade de forma espontânea (Saad et al, 2023). Os cultivos iniciais de células musculares de *M. rosenbergii* apresentaram baixa velocidade de proliferação, porém serão mantidos, com realização de ensaios de senescência, otimização do pH e temperatura do meio e acompanhamento de gerações até a perda da viabilidade do cultivo por senescência ou ainda a

obtenção de linhagem secundária espontânea.

5 Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que o protocolo de isolamento e cultivo permitiu o estabelecimento inicial de culturas celulares e a observação de eventos importantes, como adesão, divisão celular, crescimento e manutenção das características morfológicas compatíveis com células musculares. Entretanto, a ocorrência de contaminações e a elevada sensibilidade das células evidenciam que o protocolo ainda necessita de otimizações. Dessa forma, estudos futuros deverão concentrar-se no aperfeiçoamento das condições assépticas de cultivo, na padronização dos procedimentos de manutenção das culturas e na definição das condições ideais para o desprendimento celular, visando aumentar a longevidade das culturas e ampliar sua aplicação em estudos de biologia celular e cultivo celular de crustáceos.

Referências Bibliográficas

POST, M. J. *et al.* **Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat.** Nature Food, v. 1, p. 403–415, 2020.

RUBIO, N. R. *et al.* **Cell-Based Fish: A Novel Approach to Seafood Production and an Opportunity for Cellular Agriculture.** Frontiers in Sustainable Food Systems, v. 3, 2019.

WANG, W.; Liang, H.; Wang, A.; Chen, T.; Zhang, S.; Sun R. **Effect of pH and Zn²⁺ on subcultured muscle cells from Macrobrachium.** Methods in Cell Science v. 22, n.4, p. 277–284, 2000

Palavras-chave: cultura primária; agricultura celular; morfologia celular; camarão de água doce.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2025-0307

Financiamento

