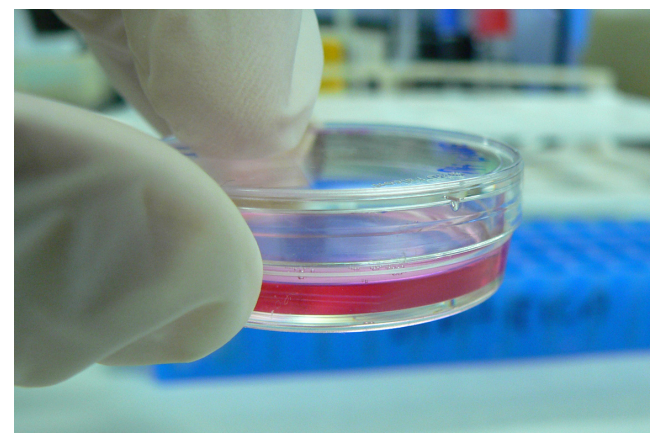


Cultura de Células



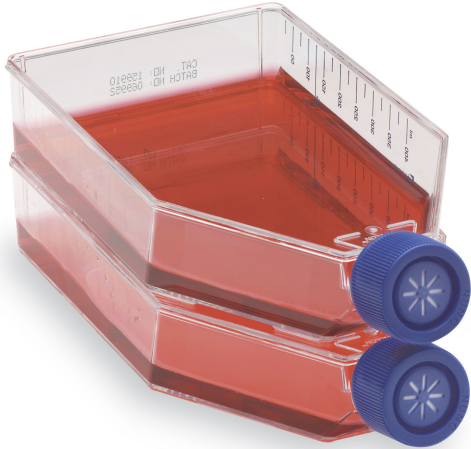
Desvantagens

- A proliferação *in vitro* difere daquela *in vivo*.
- A adesão célula-célula e célula-matriz é reduzida
- Em geral não possui heterogeneidade e arquitetura tridimensional de um tecido *in vivo*.
- O meio favorece o espalhamento, a migração e a proliferação de células.

Vantagens

- Controle do ambiente;
- Homogeneidade da amostra,
- É o principal modelo alternativo para a substituição dos animais em experimentos de pesquisa.

Tipos de Cultura



Cultura primária

- é estabelecida a partir de células de um fragmento de tecido desagregado
- Células tem características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo

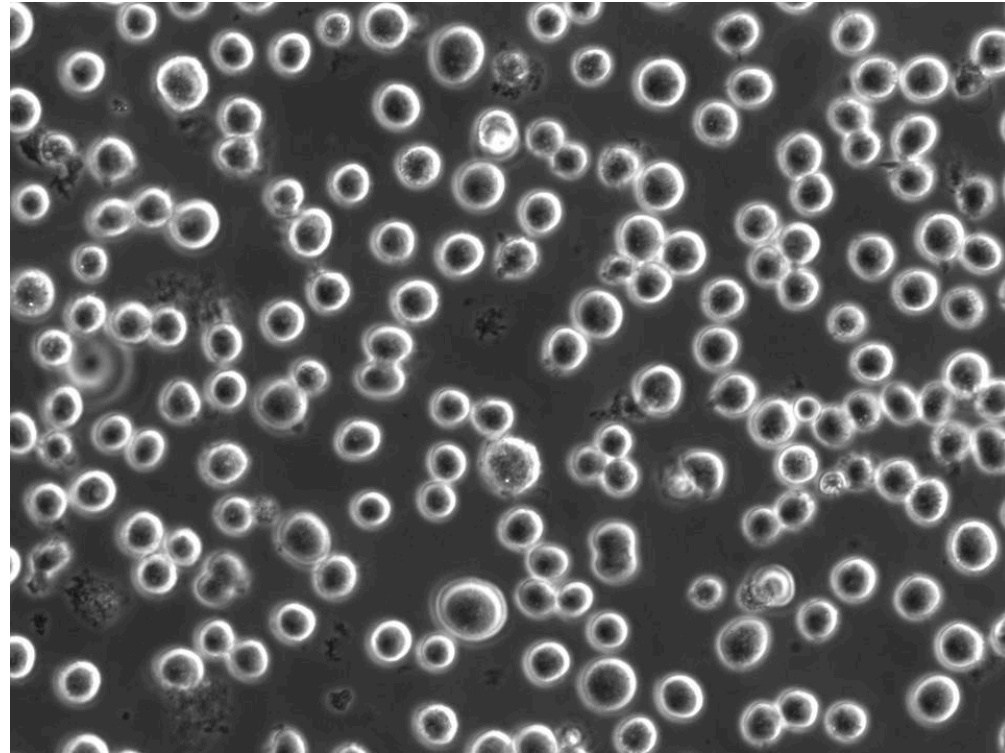
Células transformadas:

- morfológica e geneticamente diferentes do tecido original
- podem ser transformadas em cultura via substâncias químicas, vírus ou agentes físicos (ex. luz UV)
- Podem ser obtidas diretamente de tecidos tumorais.

Células não aderentes

Não aderentes

- podem ser cultivadas em **suspensão** no meio
- são derivadas de tecidos cujas células não necessitam de ancoragem para proliferar e sobreviver.
- Restrita às células hematopoiéticas, às linhagens transformadas ou às células de tecido tumoral.

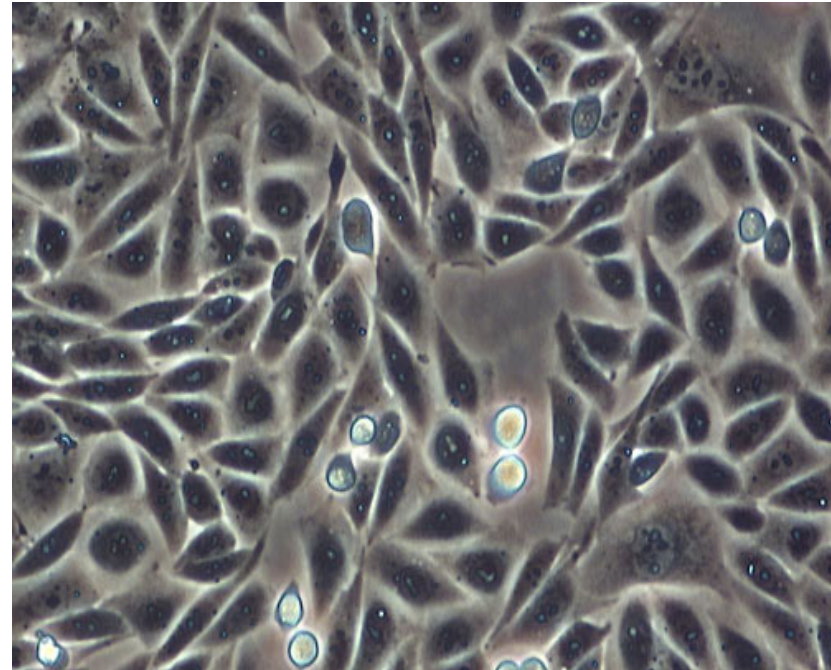


Linhagem K562 (eritroleucemia)



Células aderentes

- oriundas de tecidos duros e, por isso, **dependentes de ancoragem** (necessitam de adesão para iniciar a proliferação).
- As garrafas de cultura devem “atrair” as células (possuir uma carga negativa ou receber *coating*)
- se espalham por todo o fundo da garrafa formando uma ***monocamada celular***.



Etapas para cultura de células de mamíferos

1. Preparar um ambiente asséptico

Trabalhar sempre no fluxo laminar

2. Verificar o meio de crescimento celular

Qual o meio para a linhagem que está utilizando?

Há necessidade de suplementação?

3. Ter o ambiente adequado para a cultura celular

A maioria das linhagens crescerá sem a necessidades de especiais;

Algumas exigirão matrizes especiais (colágeno, fibronectina, etc) para promover a fixação, a diferenciação ou o crescimento celular.

Etapas para cultura de células de mamíferos

4. Acompanhamento das culturas

- As células devem ser observadas ao microscópio diariamente para garantir que elas estejam crescendo saudáveis.
- Células aderidas devem se manter fixadas ao fundo do frasco, mantendo sua forma.

Etapas da cultura de células de mamíferos

5. Renovar o meio de cultura:

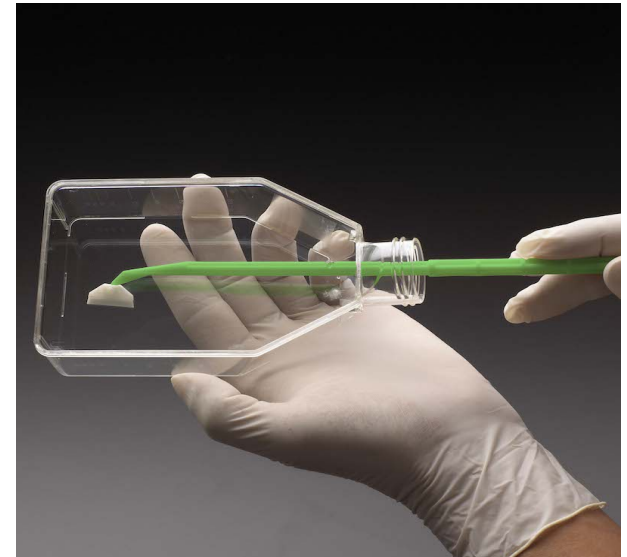
- **Se as células estão crescendo bem por alguns dias, mas ainda não estão confluentes :**
 - precisarão de meio novo para reabastecer os nutrientes e manter o pH correto.
 - Se o meio começa a ficar laranja : troca de meio o mais rápido possível.
 - Antes de mudar o meio: aquecer os meios de cultura frescos;

6. Número de passagem é o número de subculturas que as células passaram. Deve ser anotado e não ser muito alto para evitar o uso de células com variações genéticas.

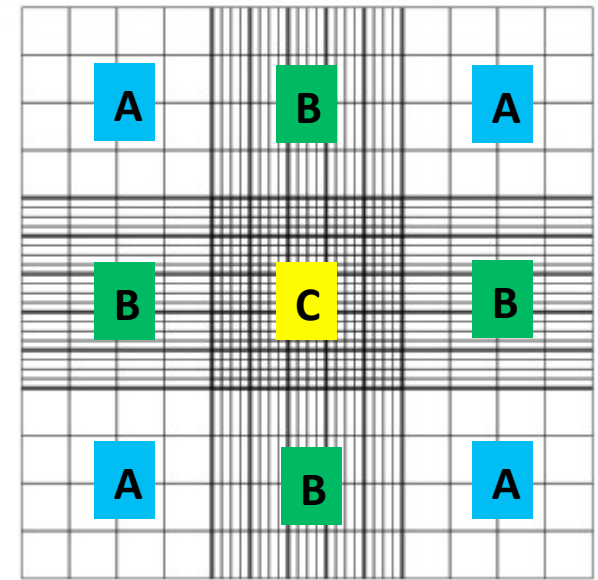
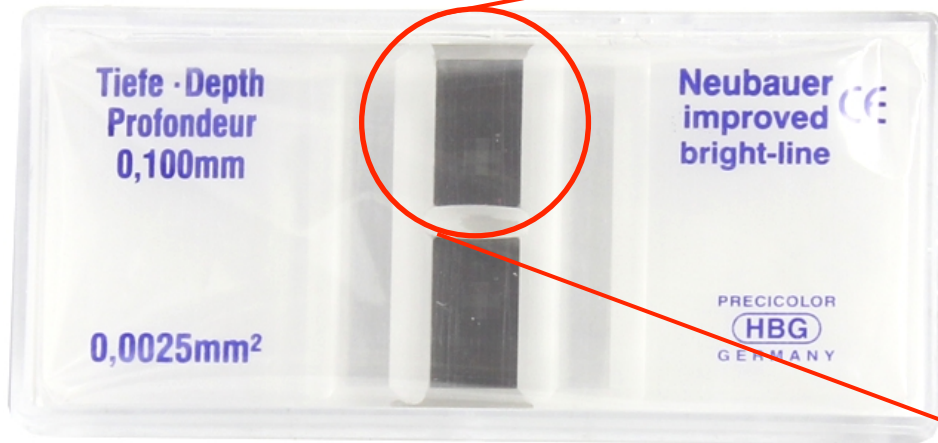
Subcultivo

Linhagens aderentes requerem a desadesão para propagação:

- via incubação com tripsina,
- Via raspagem das células;
- uso de detergentes suaves;



Contagem de células em câmara de Neubauer



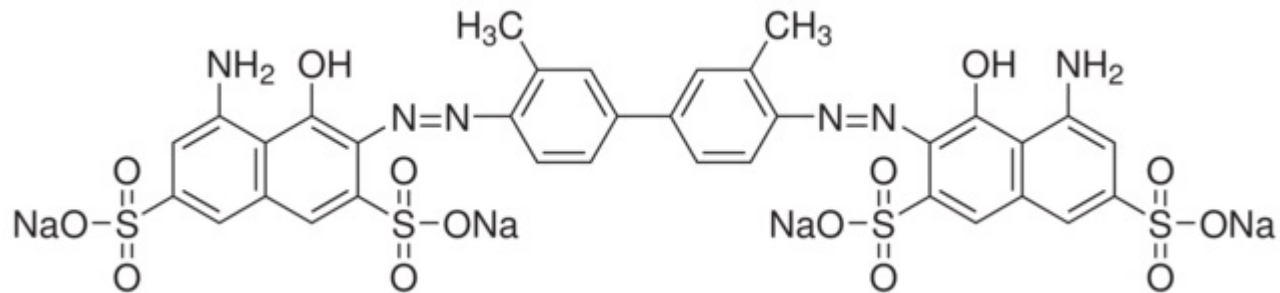
Cada região (A, B e C) = 1 mm² **Lamínula** → Cada região (A, B e C) = 1 mm³

$$1 \text{ mm}^3 = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ mL} = 10^{-4} \text{ mL}$$

Fator de correção = 10⁴

Contagem de células em câmara de Neubauer

Azul de Trypan – corante de exclusão



Células viáveis

Membrana celular íntegra → Corante não é incorporado → Células brancas

Células inviáveis

Membrana celular rompida → Corante é incorporado → Células azuis

Contagem de células em câmara de Neubauer

Diluições das células



3 mL de células em
meio de cultura
DMEM

Diluição 10x



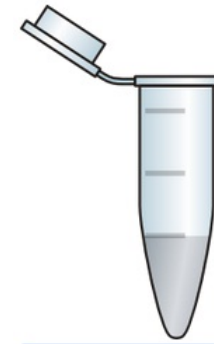
20 μ L células
+
180 μ L de DMEM



Diluição 2x



10 μ L células
+
10 μ L de azul de
Trypan

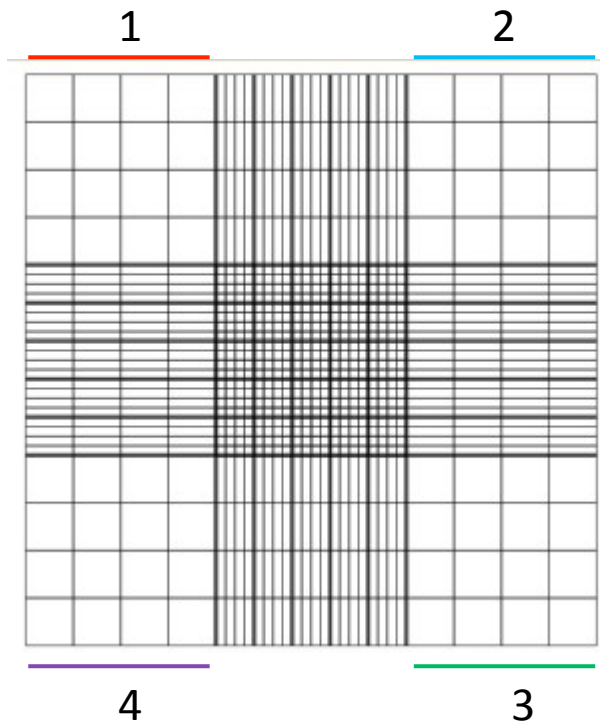


10 μ L

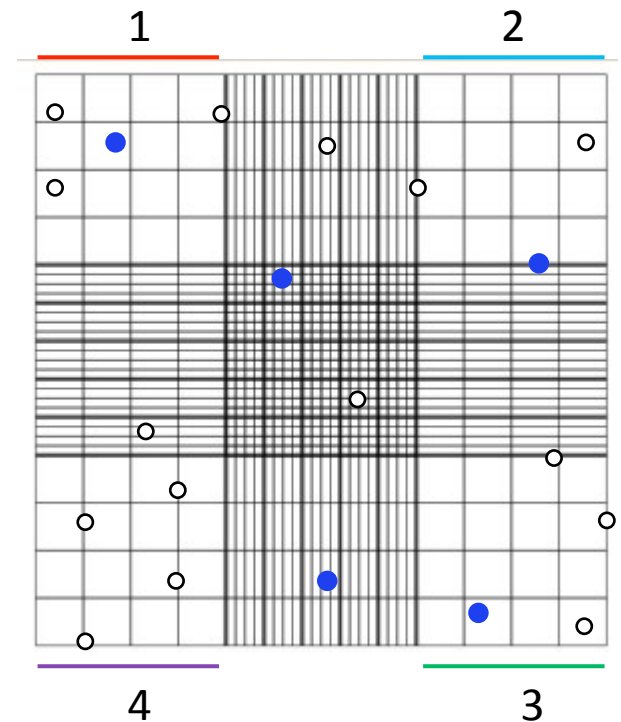
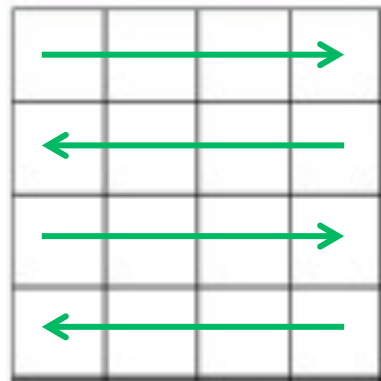


Contagem de células em câmara de Neubauer

Regiões de contagem: 1, 2, 3 e 4



Sentido de contagem



Regras de contagem

- 1) **Grupos:** contar o número de células no grupo **ou** considerá-lo como 1 célula
- 2) **Células sobre a linha:** contar somente células sobre as linhas superior e direita

Contagem de células em câmara de Neubauer

Número de células/mL =

$$\frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de quadrantes contados}} \times \text{Diluição} \times \text{Fator de correção da câmara (10}^4\text{)}$$

Número de células/mL =

$$\frac{10}{4} \times 10 \times 2 \times 10^4 = 50 \times 10^4 \text{ células/mL}$$

Se queremos 1×10^4 células em um volume de 100 μL :

$$50 \times 10^4 - 1 \text{ mL}$$

$$1 \times 10^4 - \mathbf{X} \text{ mL}$$

X = 0,02 mL = 20 μL de meio de cultura contendo células

Adicionar 80 μL para completar o volume para 100 μL .