

Aula Prática: CULTIVO DE LINHAGENS CELULARES DE MAMÍFEROS

A. Desaderência das células

- 1) Observe a garrafa de 25 cm² contra a luz, movendo o meio de cultura para um dos cantos. Repare a existência de células no fundo plástico da garrafa.
- 2) Com auxílio de uma pipeta, retire todo o meio de cultura e descarte-o no béquer com hipoclorito de sódio 3%.
- 3) Adicione 3 mL de PBS 1X, feche bem a garrafa e balance-a levemente na horizontal, sem encostar o líquido na tampa.
- 4) Retire todo o PBS 1X. Descarte-o no béquer contendo hipoclorito de sódio 3%.
- 5) Adicione 3 mL de PBS-tripsina 1X, feche bem a garrafa e balance-a levemente na horizontal, sem encostar o líquido na tampa.
- 6) Incube a garrafa a 37 °C por 5 min.
- 7) Bata levemente na borda da garrafa para auxiliar a desaderência das células.
- 8) Observe a garrafa contra a luz para confirmar a desaderência celular.
- 9) Adicione 3 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e misture.
- 10) Transfira todo o conteúdo para um tubo de 15 mL.
- 11) Centrifugue o tubo a 1.300 rpm, por 5 min.
- 12) Cuidadosamente, retire o sobrenadante. Cuidado para não retirar o *pellet*.
- 13) Ressuspenda as células com 3 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Reserve o tubo em gelo.

Questões

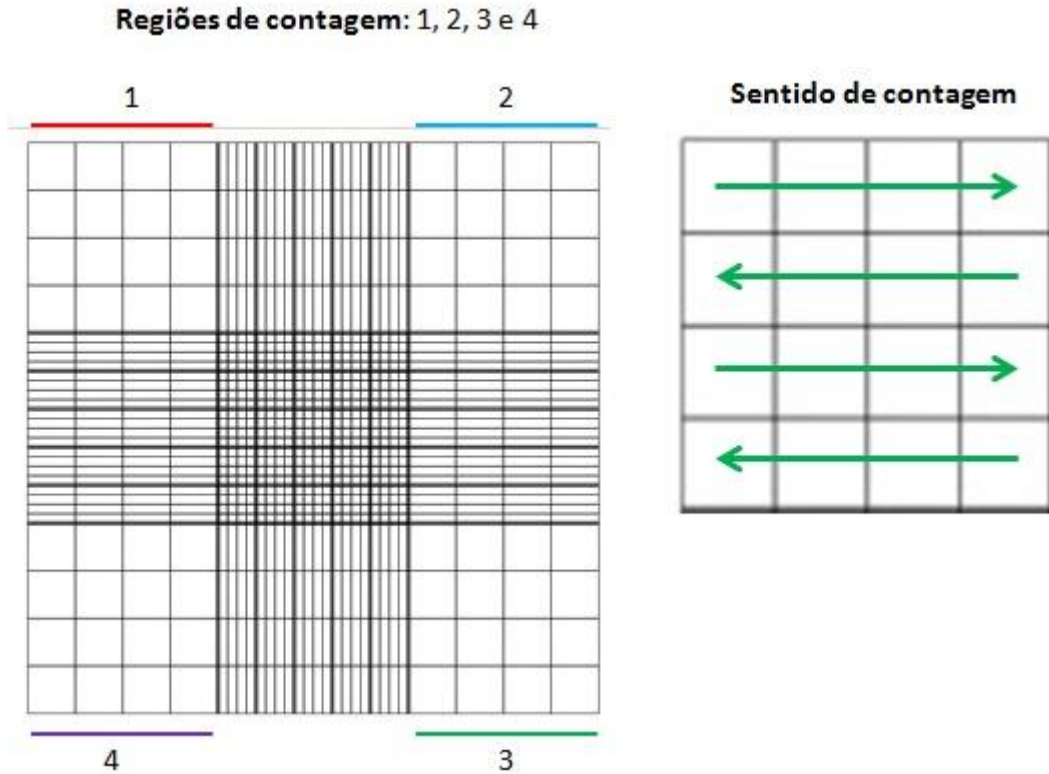
- 1) Quais as funções das seguintes soluções: PBS 1X e PBS-tripsina?
- 2) Por que se adiciona DMEM com 10% de SFB na garrafa contendo células desaderidas em PBS-tripsina?
- 3) A morfologia celular variou devido à desaderência? Explique.

B. Contagem das células em câmara de Neubauer

- 1) Misture bem o meio de cultura contendo as células.
- 2) Faça uma diluição 1:10 (10⁻¹, ou 10 vezes): Retire 20 µL do meio de cultura com as células e transfira para um tubo de 1,5 mL. Adicione 180 µL de meio DMEM contendo 10% de SFB e misture bem.
- 3) Faça uma diluição 1:1 (2 vezes): Retire 10 µL do conteúdo no tubo de 1,5 mL e transfira para um tubo de 0,6 mL. Adicione 10 µL do corante Azul de Trypan e misture bem.
- 4) Limpe uma câmara de Neubauer com álcool 70% e papel higiênico, espere secar e coloque uma lamínula sobre uma das regiões.
- 5) Misture novamente o conteúdo do tubo de 0,6 mL, retire 10 µL e, sem retirar a lamínula, aplique entre a câmara e a lamínula. Observe o líquido corado em azul se espalhar, preenchendo totalmente o espaço da câmara.
- 6) Observe a câmara de Neubauer ao microscópio utilizando a objetiva de 10X.
- 7) Identifique as 4 regiões de contagem da câmara (utilize a figura a seguir como guia). Conte o número de células dentro das 4 regiões.

✓ **Regras para contagem**

- 1) Células que estão em grumos: tente contar o número de células por grumo, se não for possível, conte o grumo como uma célula;
- 2) Células que estão sobre a linha limite da região: conte somente as células das linhas superior e direita.



7) Calcule o número de células por mL utilizando a seguinte fórmula:

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

8) Exemplo

- Número de células contadas: 100
- Número de quadrantes contados: 4
- Diluições: Duas diluições, sendo a primeira de 10 vezes (item 1) e a segunda de 2 vezes (item 2). Portanto: $10 \times 2 = 20$ vezes.

$$\text{Número de células/mL} = \frac{100}{4} \times 20 \times 10^4 = 500 \times 10^4 = 5 \times 10^6$$

C. Plaqueamento das células em lamínulas de vidro para observação em microscopia

A visualização das células por microscopia de fluorescência e confocal requer que as mesmas estejam dispostas entre lâmina e lamínula. Para tal, células são desaderidas da garrafa de cultivo e diretamente cultivadas sobre lamínulas de vidro, que estão contidas dentro de placas de 12 poços. Após a aderência celular, as lamínulas contendo as células são incubadas com distintos corantes fluorescentes e, ao final da preparação, as lamínulas são retiradas dos poços e colocadas sobre uma lâmina para visualização.

- 1) Observe que em cada poço de uma placa de 12 poços, encontra-se uma lamínula de vidro. Em cima da lamínula, serão colocados 100 μ L de meio de cultura contendo 10^4 células.
- 2) Calcule qual volume de meio de cultura contém 10^4 células.
- 3) Em um tubo de 1,5 mL, coloque o volume de meio que contém 10^4 células (retire do conteúdo do tubo de 15 mL que está no gelo).
- 4) Complete o volume para 100 μ L com meio DMEM suplementado com 10% de SFB.
- 5) Misture bem e aplique o volume de 100 μ L em uma só gota, exatamente sobre o centro da lamínula.

ATENÇÃO: Após o plaqueamento, não mova a placa e nem encoste na mesma, evitando que o meio de cultura contendo as células escorregue da lamínula para a placa.

- 6) Espere 30 min para a aderência das células.
- 7) Lentamente, no canto do poço e sem encostar na lamínula, adicione 300 μ L de meio DMEM suplementado com 10% de SFB.
- 8) Sem balançar a placa, leve-a para incubação a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂.
- 9) Observe as células na próxima aula.

D. Composição das soluções utilizadas

- **PBS 1X:** 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 4,3 mM de Na₂HPO₄; 1,5 mM de KH₂PO₄; pH 7,4. Autoclavar para esterilizar.

- **PBS 1X-tripsina:** PBS 1X suplementado com tripsina 1X (0,25%). Filtrar em filtro com poro de 0,22 μ m para esterilizar.

- **Meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB):** 10,8 g/L de DMEM; 3,7 g/L NaHCO₃; 40 mg/mL de gentamicina; pH 7,4. Após acertar o pH, adicionar 10% de SFB e filtrar em filtro com poro de 0,22 μ m para esterilizar.

COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DMEM			
Sais inorgânicos	mg/L	Aminoácidos	mg/L
CaCl ₂ .2 H ₂ O	265	L-arginina. HCl	84
Fe(NO ₃) ₃ .9 H ₂ O	0,1	L-cisteína	62,57
KCl	400	L-glutamina	584
MgSO ₄ .7 H ₂ O	200	Glicina	30
NaCl	6400	L-histidina.HCl.H ₂ O	42
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	125	L-isoileucina	105
NaHCO ₃	3700	L-leucina	105
Vitaminas	mg/L	L-lisina.HCl	146
Cloreto de colina	4	L-metionina	30
Pantotenato de cálcio	4	L-fenilalanina	66
Ácido fóico	4	L-serina	42
Inositol	7,2	L-treonina	95
Nicotinamida	4	L-triptofano	16
Piridoxina.HCl	4	L-tirosina	104,2
Riboflavina	0,4	L-valina	94
Tiamina.HCl	4		
Outros componentes	mg/L		
Glicose	1000		
Piruvato de sódio	110		
Vermelho de fenol	15		

Questões

- 1) Por que a solução de PBS-tripsina 1X foi filtrada ao invés de autoclavada?
- 2) O filtro com poro de 0,22 µm é eficaz para a remoção de todos os microrganismos?
- 3) O que é vermelho de fenol? Qual a coloração do meio de cultura em pH ácido, neutro ou básico? Por quê?