

**INSTITUTO FEDERAL**  
**SANTA CATARINA**

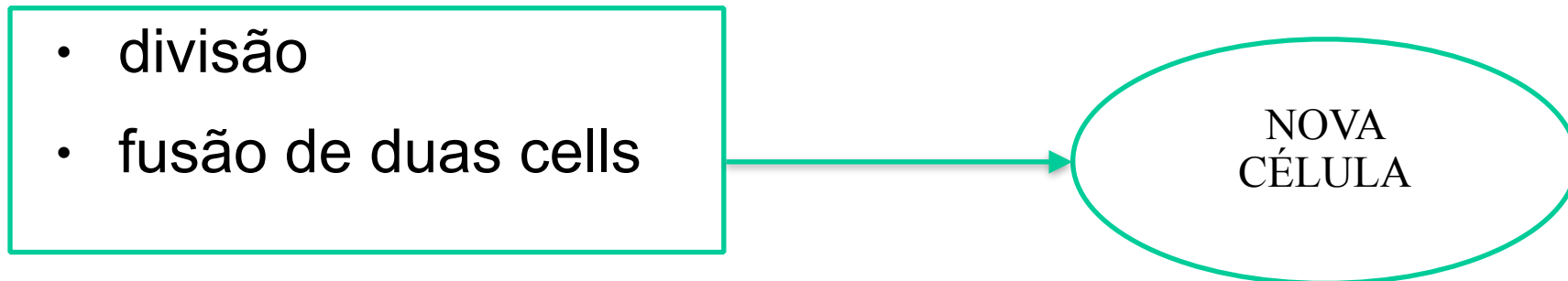
## Cultura de Células Animais

### **Aula 4 - Fases do Crescimento Celular**

Prof. Me. Leandro Parussolo

# Introdução

- A dinâmica de uma cell é + bem compreendida examinando-se o curso de sua vida;

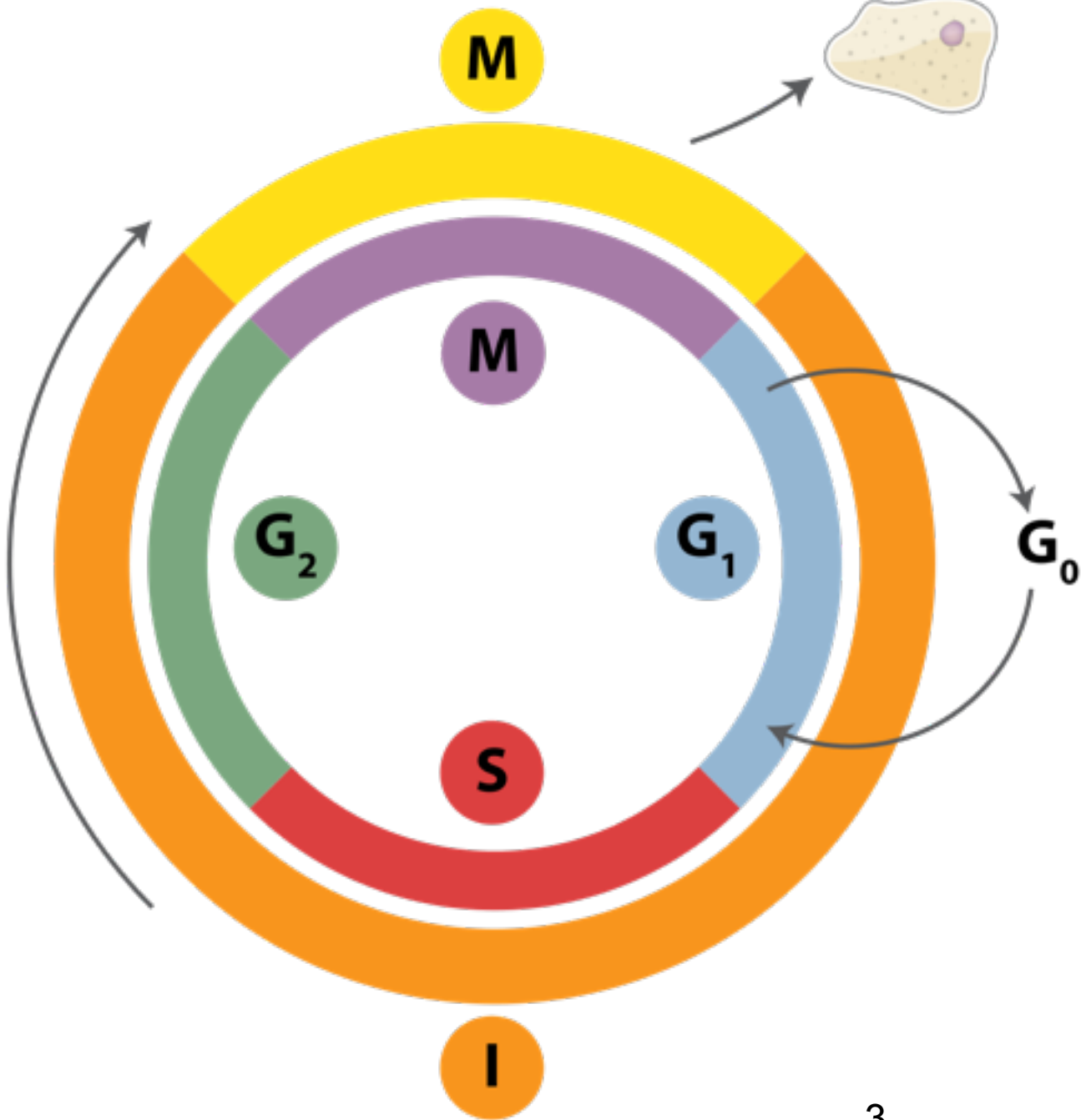


- Isso envolve períodos de

CRESCIMENTO CELULAR — DUPLICAÇÃO DNA — DIVISÃO CELULAR

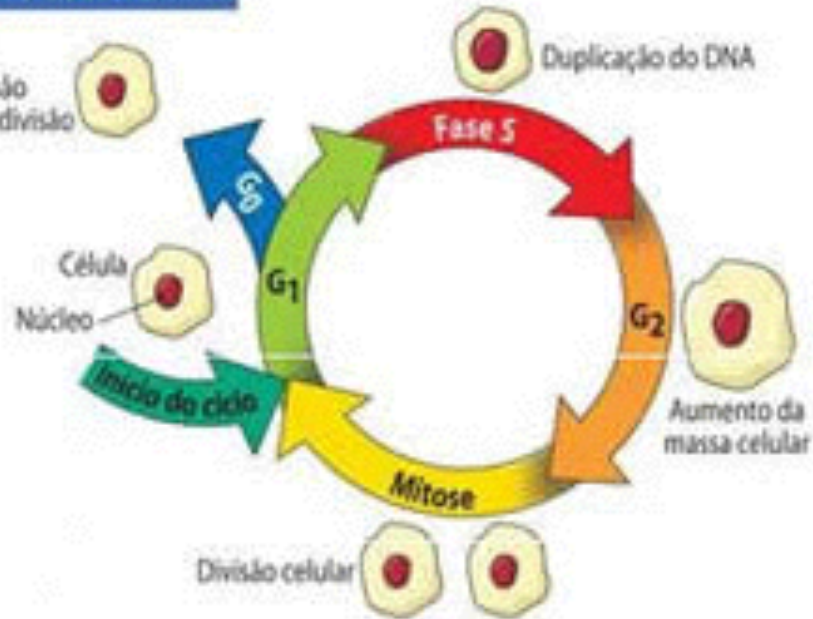


# Ciclo Celular

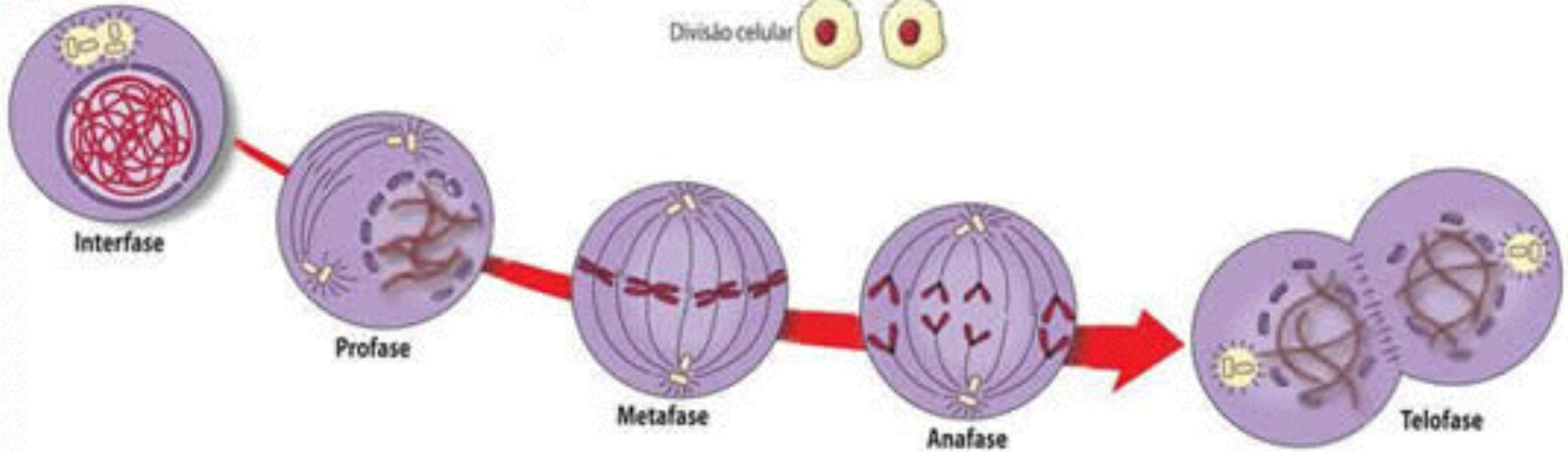


## Ciclo celular

A célula não entra em divisão



## Mitose



# Fases Crescimento Celular

**Em CULTURA** — população de cells apresenta-se, geralmente, em diferentes fases do ciclo celular

SE todas as cells de uma determinada população estiverem atravessando as etapas do ciclo celular ao mesmo tempo — população **SINCRÔNICA**

**Sincronismo celular** — permite identificar e caracterizar os eventos celulares, bioquímicos e moleculares que ocorrem durante os estágios específicos do ciclo

# Fases do Crescimento Celular

**CELLS SINCRONIZADAS** — modelo essencial para o estudo da regulação da proliferação celular

Sincronia Celular Natural - pouco frequente

Sincronização pode ser induzida



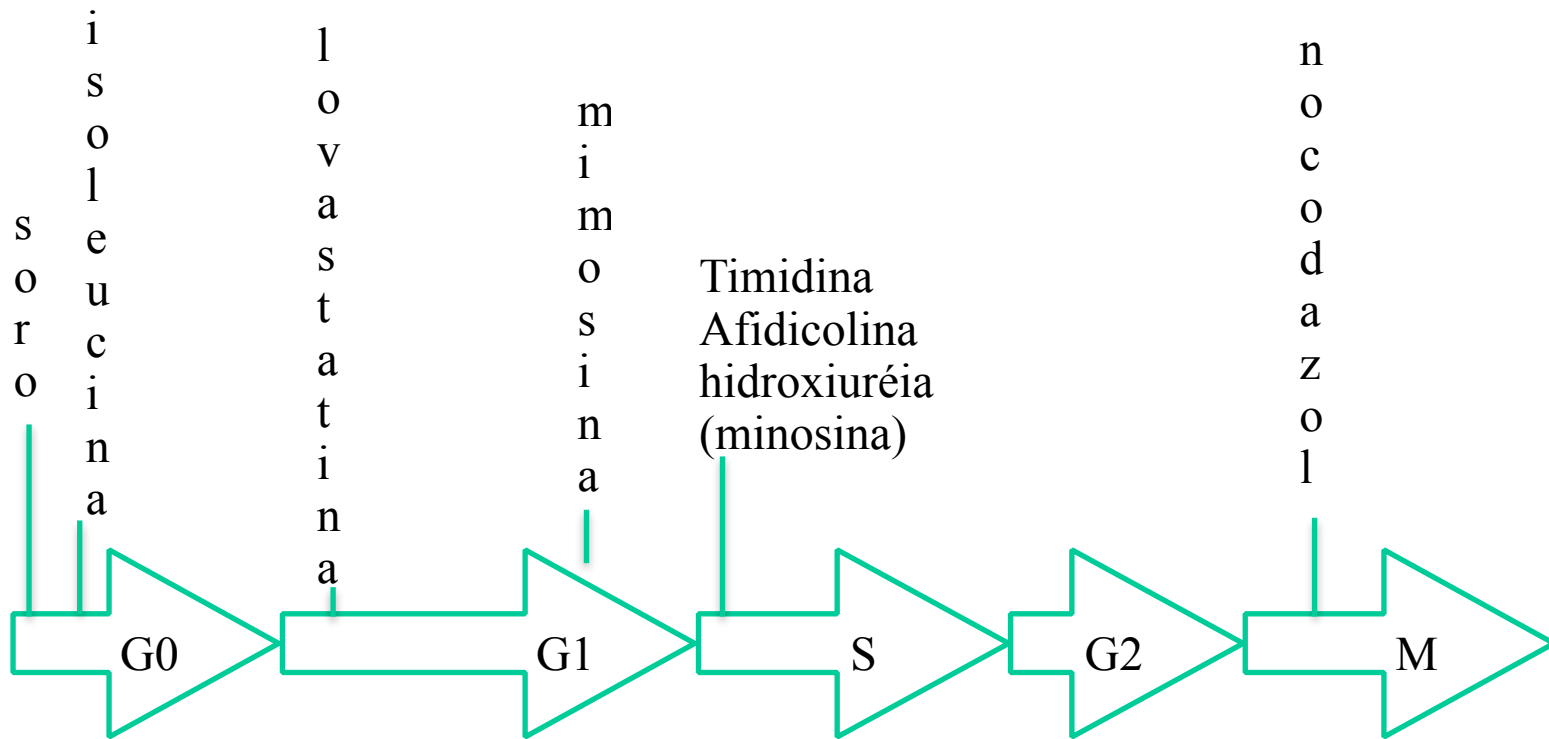
## *Indução por Seleção*

Cells de uma cultura que estão em um determinado estágio do ciclo celular são selecionadas e removidas

Posteriormente, são cultivadas separadamente como uma cultura sincrônica

## *Indução Química*

São usados inibidores metabólicos específicos de uma determinada etapa, que ao serem retirados, possibilitam a progressão das cells do ciclo de maneira sincrônica



Arraste reversível de cells em **G0** — inanição de soro e aa isoleucina

Arraste reversível de cells em **G1** — utilização de agentes químicos (lovastatina e mimosina)

Cells sincronizadas em **G1 e S** — inibidores de DNA, afidicolina, hidroxiuréia, ou excesso de timidina

Cells sincronizadas em **M** — nocodazol (inibidor de microtúbulos)



# Fases Crescimento Celular

- Para uma linhagem celular ainda não caracterizada para sincronização — experimental diferentes procedimentos a fim de se obter a técnica mais apropriada;
  - **Levar em consideração:**
    - Qual fase do ciclo celular será o foco do estudo.
    - Qual é o grau de sincronização necessário;
    - Qual o n. de cells necessária para análise.

Uso de inibidores químicos - método principal sincronismo cells em uma fase do ciclo celular

# Fases Crescimento Celular

- **Desvantagens da Sincronização química**

- possível rompimento ou distorção dos processos regulatórios do ciclo celular normal;

- dificuldade em elucidar o exato alvo celular atingido (ex: mimosina)

**Selecionar o método mais adequado para o que se pretende e seguir o protocolo para tal.**

# Fases Crescimento Celular

- **Cells normais em cultura** — padrão exponencial de crescimento



CURVA  
DE  
CRESCIMENTO

- Reflete a adaptação à cultura; às condições do ambiente; à disponibilidade de substrato e nutrientes necessários para promover a produção de novas cells

# Fases Crescimento Celular

- **Curva Crescimento** — importante para avaliar características específicas de uma cultura de cells
- Comportamento e bioquímica celular alteram-se em cada fase da curva — por isso a necessidade de controle do estágio em que as cells são coletadas ou quais reagentes são adicionados

**LAG — LOG — ESTACIONÁRIA OU *PLATEAU* — DECLÍNIO OU MORTE CELULAR**

# Fases Crescimento Celular

## FASE LAG

- N. de cells não varia muito;
- Não há proliferação imediatamente após a adição das cells a um meio de cultura;
- Pouca ou ausência de divisão celular (estende-se de 1h até dias)
- Duração fase LAG — depende do estágio de crescimento em que a cultura se encontra a cultura de origem

# Fases Crescimento Celular

## FASE LAG

- Cells provenientes de cultura em fase LAG, ESTACIONÁRIA, DECLÍNIO — demoram para iniciarem a multiplicação;
- Cells originadas da fase em crescimento ativo — possuirão fase LAG menor;
- Cultura com baixa densidade — fase LAG lenta e longa
- Fase LAG — intensa atividade metabólica (produção de proteínas estruturais e enzimas - ex: DNA polimerase)

# Fases Crescimento Celular

## FASE LOG

- Fase logarítmica ou exponencial;
- Período de multiplicação celular máxima e constante;
- Aprox. 90 a 95% das cells estão no ciclo celular;
- Cells distribuídas ao acaso ao longo das fases do ciclo celular — em determinadas situações é necessário sincronismo

# Fases Crescimento Celular

## FASE LOG

- Maior viabilidade e atividade metabólica das células



Melhor fase para estudos e experimentação

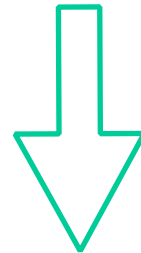
- **Duração da fase** — depende da linhagem de cells; densidade inicial das cells e taxa de crescimento da linhagem



# Fases Crescimento Celular

## FASE ESTACIONÁRIA OU *PLATEAU*

- Quando ocorre formação de grande n. de cells — **velocidade de crescimento diminui**



- N. de morte celular tende a ser equivalente ao n. de cells novas
- Atividade metabólica decresce — **cells + susceptíveis a danos**

# Fases Crescimento Celular

## FASE ESTACIONÁRIA OU *PLATEAU*

- Motivos da redução normal das cells:
  - contato entre cell-cell (reduz capacidade de dispersão destas)
  - diminuição da qtde de nutrientes e de fatores de crescimento;
- Em algumas linhagens — fase é estendida com a suplementação do meio

# Fases Crescimento Celular

## FASE ESTACIONÁRIA OU *PLATEAU*

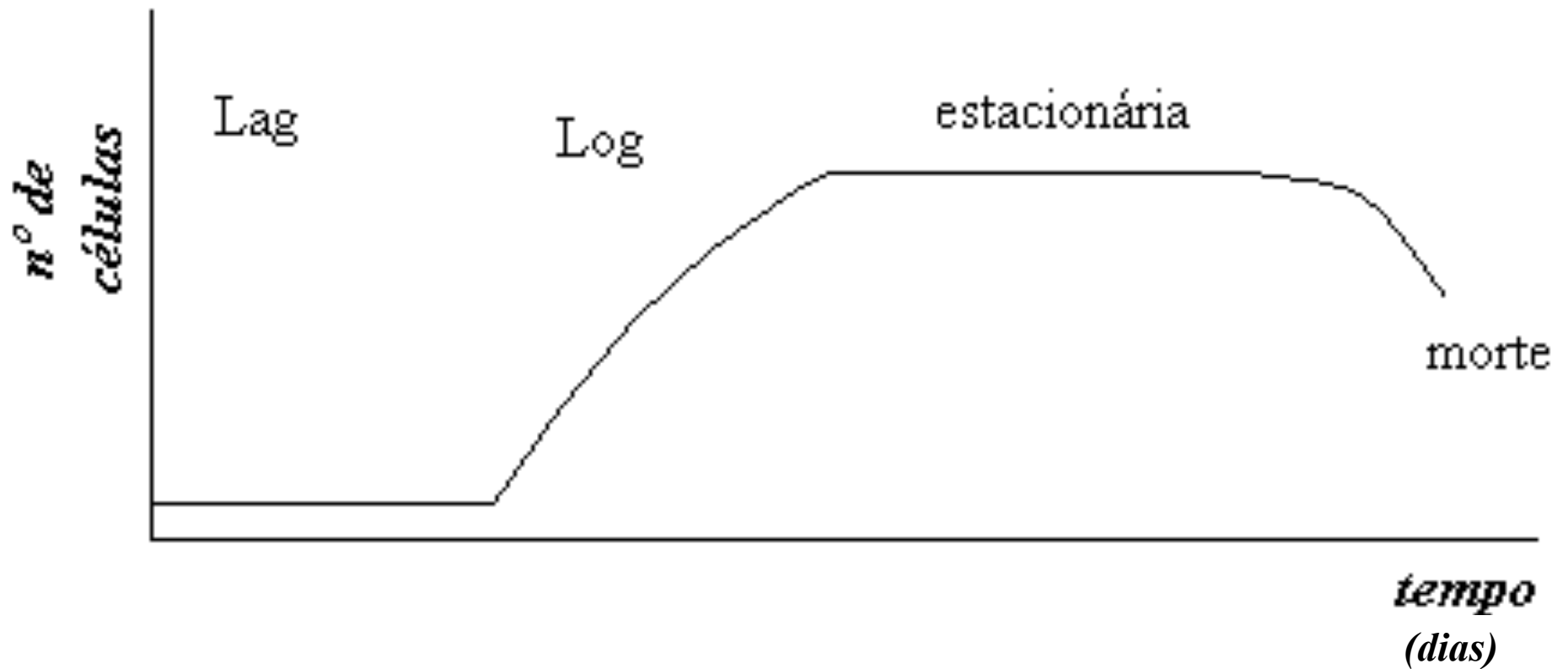
- **Culturas transformadas** (espontaneamente, por vírus ou agentes carcinogênicos) geralmente atingem densidade **MAIS ALTA** que o normal;
- Fase estacionária — é o equilíbrio da proliferação celular (nesses casos)

# Fases Crescimento Celular

## FASE MORTE OU DECLÍNIO

- Redução drástica no n. de cells;
- Qtde de cells mortas excede a de cells novas;

## Curva de Crescimento



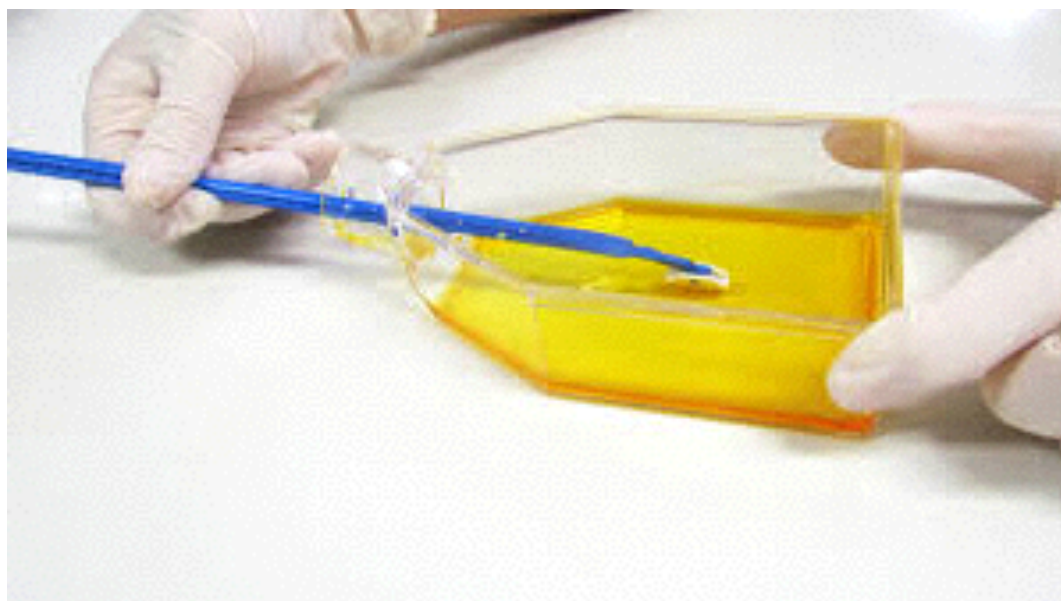
# Curva de Crescimento

- Construção da curva de crescimento permite a medição de parâmetros característicos de uma dada população sob dadas condições;
- **Quantificação do crescimento**
  - para manutenção de rotina;
  - para saber o n. de cells no futuro.

**Concentração cells para cultivo** — depende da linhagem celular (aprox.  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  cells/mL)



**COMO DETERMINAR A CURVA DE  
CRESCIMENTO DE UM TIPO CELULAR????**



# Curva de Crescimento

- Semear uma suspensão de cells em garrafas de 50 mL (ex:  $4 \times 10^4$  cells/mL)
- Determinar o n. de cells a cada 24h (microscopia óptica — Câmara de Neubauer) por 5 a 10 dias
- Verificar a viabilidade celular por exclusão (ex: contagem de cells c/ azul de tripan)
- Calcular a porcentagem de cells viáveis (n. cells não coradas/ n. cells totais)



# Curva de Crescimento

- São diferentes para linhagens **primárias** e **permanentes**
- **Linhagens primárias** — provenientes de cells animais derivadas de 1 tecido ou sangue (**geralmente morrem após algumas gerações**)
- **Linhagens Permanentes** — podem ser mantidas indefinidamente