

Técnicas/conceitos para cultivo celular

Lavagem e preparo do material para cultura de células

A vidraria utilizada para cultura de células deve ser exclusiva e processada separadamente das demais.

A vidraria deve ser lavada imergindo-a em água com detergente neutro a 5%, durante 12 horas, e enxaguando-a 3 a 4 vezes em água comum, e 2 a 3 vezes em água destilada. O material limpo deve apresentar uma película uniforme de líquido nas paredes após o último enxágue. Caso não haja a formação desta película, o material deverá ser submetido a novo processo de lavagem, pois significa que há traços de gordura ou qualquer sujidade no material.

Frascos muito sujos, com resíduos aderidos, devem ser lavados com solução sulfocrômica (solução de bicromato de potássio a 3% em ácido sulfúrico concentrado 1:9), que requer muito cuidado no uso devido à presença do cromo IV (Cr+4). Muitos materiais necessitam de uma lavagem prévia, sob agitação durante 5 a 10 minutos, em solução detergente.

A secagem do material deve ocorrer em estufa de secagem a 120°C, por aproximadamente 6 horas. O material limpo e seco não deve conter qualquer tipo de resíduo, mancha, coloração e/ou opacidade; caso contrário, o material deve ser submetido a um novo processo de lavagem.

A montagem e embalo podem ser realizados com envelopes e/ou bolsas próprios para esterilização, ou ainda material do tipo “não tecido”. Deve ser evitado o uso de papel Kraft por gerar aerossóis.

A esterilização da vidraria em geral é realizada por autoclavação sob pressão a 121°C por 20 minutos. Outros materiais podem ser esterilizados por mais tempo se necessário. Toda vidraria estéril também deve ser mantida livre de poeira em armários bem fechados. Pipetas graduadas e tubos de centrífuga são preferencialmente descartáveis.

Manutenção das culturas: propagação e criopreservação

Propagação celular

Para manter as células em cultura é necessário utilizar técnicas básicas que evitem a morte celular dentro da garrafa de cultivo. As células normalmente possuem inibição por contato e, quando em uma garrafa de cultivo, se a quantidade de células exceder um número tal que impossibilite o crescimento normal da monocamada, as células se inibirão e haverá morte. Assim, é extremamente importante que se retire quantidades de células periodicamente da garrafa de modo a manter a população sempre com um número ideal.

O processo de renovação de células de uma garrafa para outra é chamado passagem. O número de passagens se refere ao número de vezes que essa cultura foi subcultivada. Muitas linhagens contínuas

são capazes de manter as características iniciais do tecido original com algumas passagens, enquanto as células transformadas não mantêm as características originais e são capazes de permanecer em cultura por um grande número passagens (chegando até virtualmente ao infinito número de passagens).

Para as células não aderentes, o procedimento de passagem se assemelha a uma diluição e basta retirar células da garrafa de cultivo, adicionando novo meio ao seu lugar. Isso ocorre porque estas células se encontram em suspensão no meio, sendo possível retirá-las sem que seja necessário um procedimento específico.

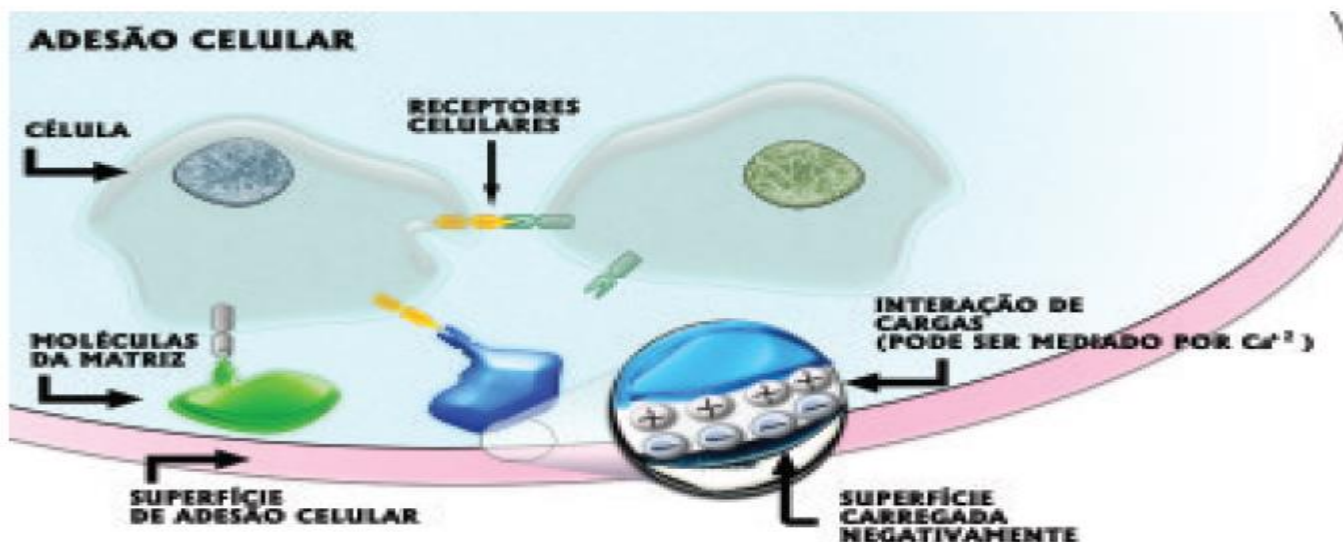
As células aderentes possuem um método específico para efetuar a sua passagem, por se encontrarem aderidas ao fundo da garrafa de cultivo. Para que as células aderentes possam se ligar ao fundo da garrafa é necessário que o fundo tenha uma carga negativa. Superfícies como vidro e metal, que possuem uma carga líquida negativa, são excelentes superfícies para a adesão celular.

Plásticos são muito utilizados em cultivo celular, mas para que o plástico desenvolva carga negativa é necessário um tratamento prévio com agentes químicos, como agentes oxidantes, ou físicos, como a luz ultravioleta e a radiação. A carga negativa é necessária, pois a adesão celular ocorre por meio de forças eletrostáticas e da interação dessas cargas com glicoproteínas de adesão e com cátions divalentes, como Ca^{+2} e Mg^{+2} . Esta interação, então, desencadeia uma sinalização intracitoplasmática que acarretará na produção e liberação de proteínas da matriz extracelular pela própria célula, onde a célula irá aderir, “espraiar” e iniciar sua proliferação.

A matriz extracelular de um tecido é uma mistura complexa de proteínas, glicoproteínas, lipídeos, glicolipídeos e mucopolissacarídeos. As macromoléculas que constituem a matriz são secretadas por células locais, especialmente fibroblastos. Essa matriz contém três importantes proteínas fibrosas – colágeno, elastina e fibronectina – contidas em um gel hidratado formado por uma rede de cadeias de glicosaminoglicanos. Todas essas macromoléculas são secretadas localmente por células em contato com a matriz.

Linhagens macrofágicas são uma exceção, pois sua adesão é mediada por proteoglicanos, um processo diferente do descrito.

Adesão celular mediada por proteínas de adesão.



Os métodos de dissociação celular são classificados em mecânicos ou enzimáticos. No mecânico ocorre a desagregação da monocamada fisicamente com a ajuda do rubber policeman, um dispositivo semelhante a um rodo estéril que retira as células do fundo da garrafa de cultivo. Na desagregação enzimática ocorre a digestão das proteínas de adesão por proteases específicas ou não.

A dissociação de tecidos envolve a dissociação da matriz e a quebra dos contatos célula – célula, sem comprometer a membrana ou danificar a superfície celular.

A dissociação mecânica é utilizada principalmente para células macrofágicas devido à sua adesão diferenciada. Esse método consiste na retirada das células por meio de agentes físicos, o que é muito danoso para as culturas.

A dissociação enzimática é uma das principais aplicações das enzimas na cultura de células. Proteases são necessárias para romper a matriz extracelular e, assim, obter células individualizadas com a finalidade de transferir as culturas para um novo substrato. A enzima proteolítica inespecífica mais utilizada é a tripsina, que hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil formando terminações de clivagem, éster e amida. Essa reação desestrutura a matriz, impossibilitando a ligação dos receptores da superfície celular, ligados ao citoesqueleto e à matriz, obrigando as células a rearrajarem seu citoesqueleto.

Devido à inespecificidade da enzima, não se deve deixar a célula muito tempo em sua presença, para não haver lise celular.

Congelamento

Na natureza é muito comum que os indivíduos se adaptem cada vez mais ao meio ambiente por meio de mutações genéticas. Esse procedimento evolutivo descrito por Darwin ocorre em todos os seres vivos e não seria diferente pensar que também ocorreria em células cultivadas.

A partir do momento em que uma célula se encontra em uma cultura primária ocorrem adaptações para o seu estabelecimento como uma linhagem.

Células em cultura por longos períodos acabam perdendo suas características fenotípicas, pois após várias divisões, há grande probabilidade de ocorrerem alterações demasiadas em seu DNA.

Manter células congeladas significa atrasar, em anos, quaisquer alterações que poderiam ocorrer quando em cultura. Tais alterações são dispensáveis para os laboratórios de cultura de células e os grandes bancos mundiais fornecedores de linhagens.

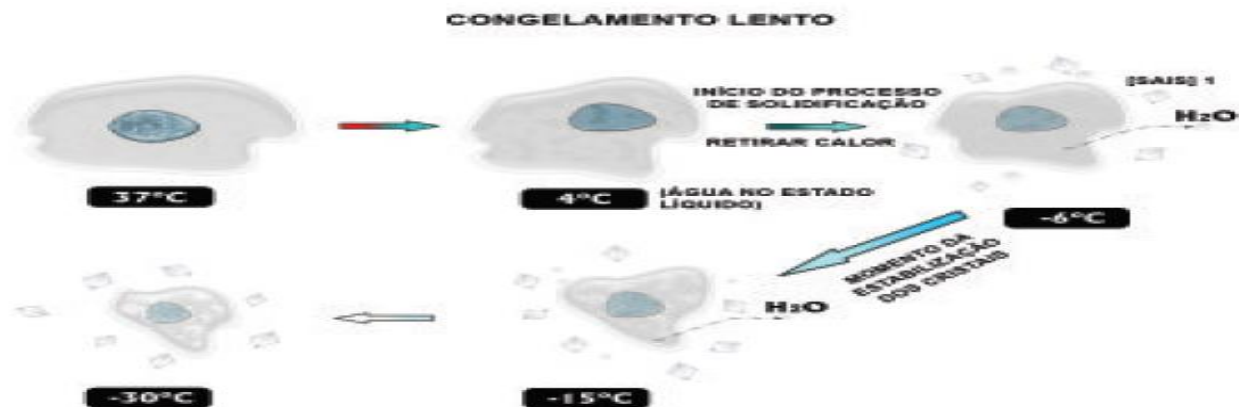
As células em cultura geralmente são congeladas em nitrogênio líquido em uma temperatura de -196°C . Nessa temperatura, todas as reações bioquímicas nas células ficam paralisadas impedindo qualquer alteração na cultura criopreservada.

O procedimento mais utilizado no congelamento celular é o lento.

Nesse processo há diminuição da temperatura, vagarosamente acarretando a solidificação da água que se encontra no meio de cultura. Isso aumenta a concentração de soluto fora da célula e faz com que a água saia através do processo de osmose. A saída da água da célula faz com que ela murche.

Assim, à medida que a água sai, ela se congela no exterior, deixando a célula desidratada. Nesse processo, a água do meio externo é congelada formando cristais que podem se reorganizar no exterior da célula. A formação de cristais e reorganização dentro da célula leva ao rompimento da membrana celular, matando as células. Isso é impedido com o processo lento de congelamento.

Esquema do congelamento lento.



Quando o congelamento é lento, a viabilidade das células descongeladas é maior do que a das congeladas pelo método rápido, ou seja, quando imersas diretamente no nitrogênio líquido.

Mesmo controlando-se a velocidade de congelamento em 1 a 2°C por minuto e tendo o cuidado com a formação dos cristais, a célula sofrerá muitos danos nesse processo. Assim, para aumentar a viabilidade celular, utilizam-se crioprotetores.

Crioprotetores são substâncias que, sob diferentes mecanismos moleculares, tornam a membrana das células protegidas dos cristais. Os crioprotetores mais utilizados são o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO).

O efeito protetor do glicerol se relaciona com a sua capacidade de ligação com a água e à sua baixa dissociação com sais, diminuindo a osmolaridade do meio de congelamento. Além disso, suas hidroxilas são capazes de se ligar aos oxigênios do grupo fosfato dos fosfolípidos de membrana, estabilizando-a no momento do congelamento.

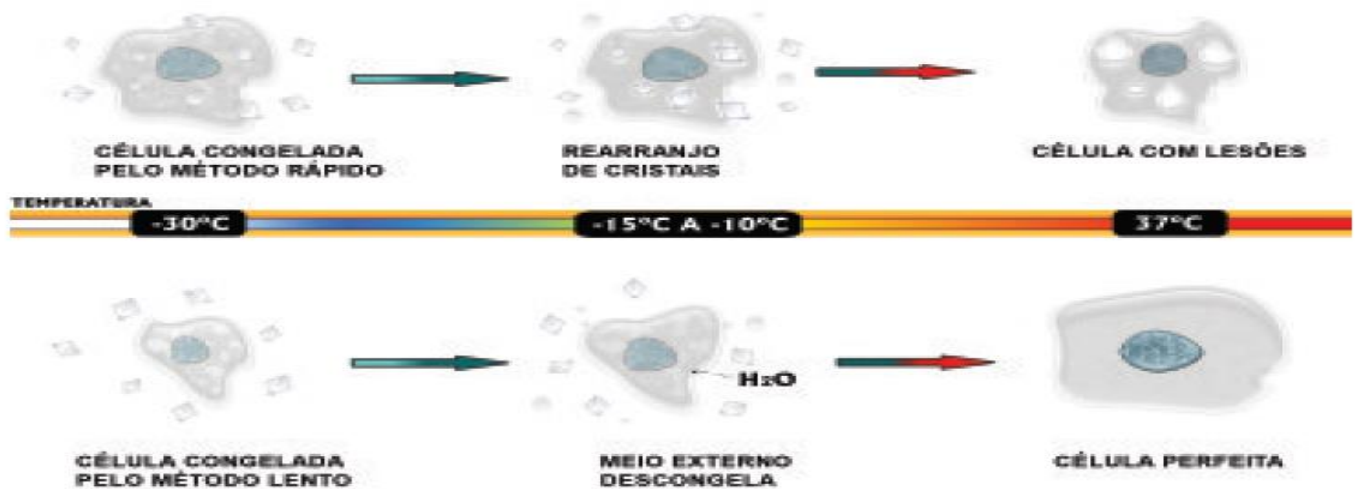
O DMSO é uma molécula sem carga real, mas que possui um momento dipolar. Sua ação está relacionada à interação da molécula com as membranas fosfolipídicas e com o ambiente externo à membrana. Assim, durante um congelamento, a molécula impede fases de transmissão dos lipídeos de membrana que chegam a promover a fusão de várias membranas.

Tanto o DMSO quanto o glicerol são tóxicos para as células e devem ser utilizados somente no momento do congelamento, sendo indispensável a sua retirada do meio após o descongelamento da cultura.

Descongelamento celular

O descongelamento geralmente ocorre de forma rápida. Simplesmente retira-se a ampola do tanque de nitrogênio líquido e coloca-se ela em água a 37 °C imediatamente.

Esquema de descongelamento lento.



Apesar de todo o cuidado durante o congelamento, o processo de criopreservação é danoso para as células e, portanto, após o seu congelamento as células devem ser colocadas em meio de cultivo com uma concentração de 20% de soro fetal bovino. As células aderentes devem ser lavadas após 24 horas de adesão para a retirada de células mortas.

Os procedimentos de congelamento e descongelamento são os mesmos para as células aderentes e para as não aderentes.