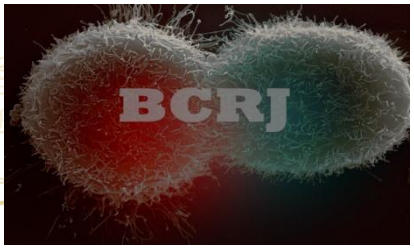


Cultura de Células Humanas e Animais

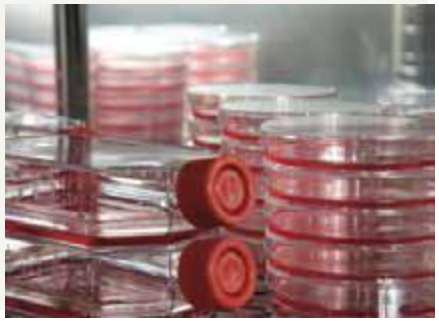
Nivea Ferreira
Enfermeira – Gerente do BCRJ

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas

O que é Cultura de Células?

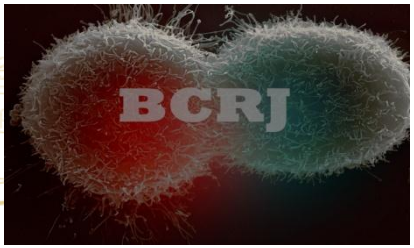
- **E o processo pelo qual células são mantidas vivas e em crescimento fora de seu tecido original em condições controladas.**

- **Conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas fora do organismo onde existem, mantendo as características próprias.**



- Podem fazer-se culturas a partir tecidos humanos, animais e vegetais;

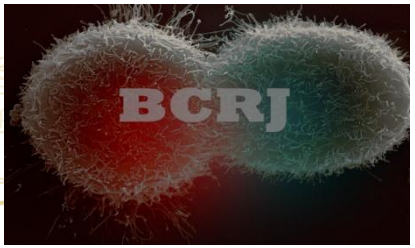
A cultura de tecidos implica a prévia desagregação (mecânica ou enzimática) do tecido original e em que as células são cultivadas numa camada aderente, num substrato sólido ou em suspensão em meio de cultura.



Aplicação da Cultura de Células

Nívea Ferreira

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas

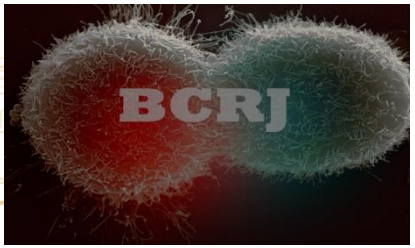


Cultura de Células

- Bioengenharia
- Diferenciação Celular
- Metabolismo Celular
- Interação Celular
- Terapia Celular
- Transplantes de Tecidos
- Produção de Hormônios
- Diagnóstico Laboratorial
- Produção de Vacinas
- Estudos e Análises de Citotoxidade
- Estudos de Biocompatibilidade

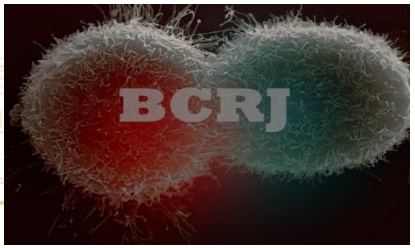
Nívea Ferreira

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas



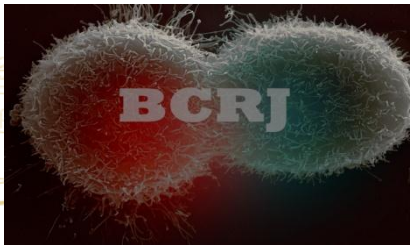
Produto	Proteína	Indicação	Célula	Data aprovação
Epogen	Eritropoetina	Anemia	CHO	1989
Kogenate	Fator VIII	Hemofilia A	BHK	1993
Gonal-f	Hormônio folículo-estimulante	Infertilidade feminina	CHO	1995
Avonex	Interferon-β	Esclerose múltipla	CHO	1996
BeneFIX	Fator IX	Hemofilia B	CHO	1997
Herceptin	Anticorpo monoclonal	Câncer de mama	CHO	1998
Simulect	Anticorpo monoclonal	Rejeição aguda a transplante renal	Mieloma de rato	1998
Campath	Anticorpo monoclonal	Leucemia	CHO	2001
Xolair	Anticorpo monoclonal	Asma	CHO	2003
Avastin	Anticorpo monoclonal	Carcinoma de colo ou reto	CHO	2004

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas



Fonte	Tipo de célula	Aplicações
Medula óssea	Hematopoiética	Câncer Imunodeficiências Doenças metabólicas Hemoglobinopatias Infarto do miocárdio
Tecido embriônico neuronal	Neuronal	Mal de Parkinson
Pele	Epitelial	Queimaduras Úlceras Doenças genéticas da pele
Pâncreas	Pancreática	diabetes

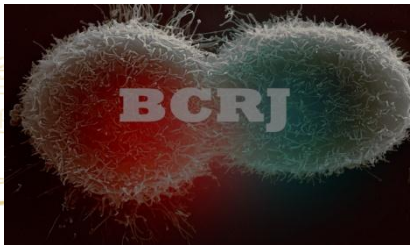
Mercado :
Biofármacos 2004 > $ 50 bilhões
Anticorpos monoclonais terapêuticos $ 13 bilhões
Eritropoetina $ 8 bilhões



Breve histórico da cultura de células

✓ Meados do séc. XIX: ROUX – Cultivo de bactérias (células procarióticas não aderentes)

✓ 1907: ROSS GRANVILLE HARRISON – Fragmentos de crista neural de sapos foram mantidos em linfa coagulada por algumas semanas;

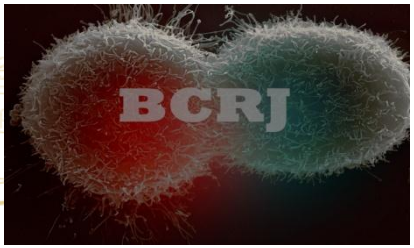


✓DESCOBERTA:

– 1907: Ross Granville Harrison (Embriologista - John Hopkins Medical School)

"…Ele dissecou o tubo medular de um embrião de sapo de cerca de meio centímetro e o mergulho em linfa fresca de sapo, que logo coagulou." (Peres & Curi, 2005). Assim começou a cultura de tecidos…

(TRABALHO PUBLICADO: Harrison, R.G. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 4: 140-13, 1907)



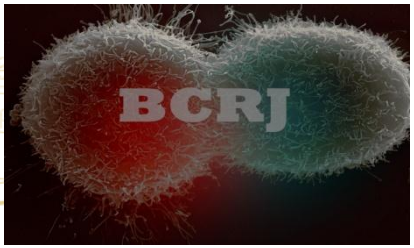
✓Trecho do Trabalho de Harrison (1907):

• “Quando se tomam as **precauções assépticas** adequadas, os tecidos sobrevivem nessas condições por um semana e, em alguns casos foram mantidos espécimes vivos durante aproximadamente quatro semanas.”

✓**Alexis Carrel** (Rockefeller Institute for Medical Research) – buscava formas de prolongar o tempo de vida das células em cultura.

✓**1912 – Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina**

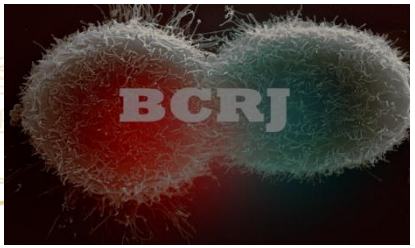
Descobriu que a TROCA DE MEIO onde eram mantidas as células favorecia o prolongamento do tempo de vida das células. Carrel, A. Journal of Experimental Medicine, 15: 516-528, 1912.



✓1916: PEYTON ROUS e FRED JONES – desenvolvem o método de **subcultivo** para explantes empregando **tripsina** em tecidos de aves e mamíferos;

✓1923: CARREL et al. – desenvolve os primeiros frascos de cultura, circulares e de vidro, chamados frascos-D;

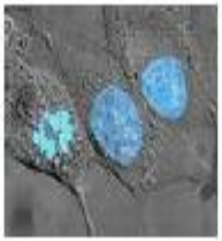
*Eberling - cultura de células derivadas de corações de galinha - lenda do coração imortal de galinha (34 anos)..



✓1948: KEILOVA – introdução de antibióticos em culturas;

✓1952 - 1959: EAGLE, SANFORD, LEIBOVITZ, DULBECCO – desenvolvimento de meios básicos para cultivo (Eagles basal medium, Eagles minimum essential medium, L15, Dulbecco's modified Eagle's medium,...);

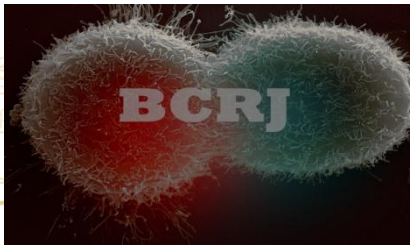
✓Histórico do Cultivo de Células e Tecidos – 1a. Linhagem imortal



✓**George Gey** (John Hopkins Medical School) – 1952

•Henrietta Lacks –cancêr de útero

•Células HeLa – **linhagem contínua** de células derivadas de um carcinoma cervical humano (HeLa); crescimento rápido



O que é necessário para trabalhar com cultura de células?

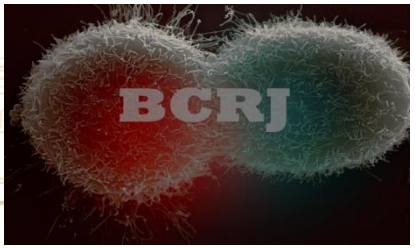
Biossegurança

Biossegurança (*biosafety*): ***utilização de princípios de contenção, tecnologias e práticas que*** **são implementadas para prevenir a exposição involuntária a agentes patogênicos e toxinas, ou a sua liberação acidental.**

Modulo de Cultura

Composição individual (vantagens = melhor concentração, maior rendimento, evita contaminações, logo proporciona melhoria no produto final)

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas



Avisos Importantes nas portas, paredes e equipamentos

ESPECIFICAÇÃO DOS RISCOS DE SERVIÇO DE SAÚDE

	ESPECIFICAÇÃO	EPI'S	Em caso de acidentes, procurar: (Local e respectivos ramais)
BIOLÓGICO	Consideram-se como agentes de risco biológico as bactérias, vírus, fungos, parasitas, células ou fluidos corpóreos que possam conter algum desses patógenos.		Imediatamente o Curador, em caso de ausência o Gerente da Qualidade. Na ausência de ambos, procurar: Serviço de Saúde e Segurança Ocupacional (SESAO) - Ramal: 9463 Dias úteis 8h – 16h
FÍSICO	Consideram-se agentes de risco físico as diversas formas de energia a que possam estar expostos os trabalhadores, tais como: ruído, calor, frio, pressão, umidade, radiações ionizantes e não-ionizantes, vibração, etc.		Imediatamente o Curador, em caso de ausência o Gerente da Qualidade. Na ausência de ambos, procurar: Serviço de Saúde e Segurança Ocupacional (SESAO) - Ramal: 9463 Dias úteis 8h – 16h
QUÍMICO	Consideram-se agentes de risco químico as substancias, compostos ou produtos que possam penetrar no organismo do trabalhador pela via respiratória, nas formas de poeiras, fumos gases, neblinas, névoas ou vapores, ou que seja, pela natureza da atividade, de exposição, possam ter contato ou ser absorvido pelo organismo através da pele ou por ingestão.		Imediatamente o Curador, em caso de ausência o Gerente da Qualidade. Na ausência de ambos, procurar: Serviço de Saúde e Segurança Ocupacional (SESAO) - Ramal: 9463 Dias úteis 8h – 16h
ERGONÔMICO	Qualquer fator que interfira nas características psicofisiológicas do trabalhador, causando desconforto ou efetando sua saúde. São exemplos de risco ergonômico: levantamento de peso, ritmo excessivo de trabalho, monotonia, repetitividade, postura inadequada de trabalho, etc	ND	Imediatamente o Curador, em caso de ausência o Gerente da Qualidade. Na ausência de ambos, procurar: Serviço de Saúde e Segurança Ocupacional (SESAO) - Ramal: 9463 Dias úteis 8h – 16h

Nívea Ferreira

Equipamentos Laboratório de Cultura de Células

Fluxo Laminar # Cabines de Segurança Biológica

Qual a Aplicação fluxo horizontal?

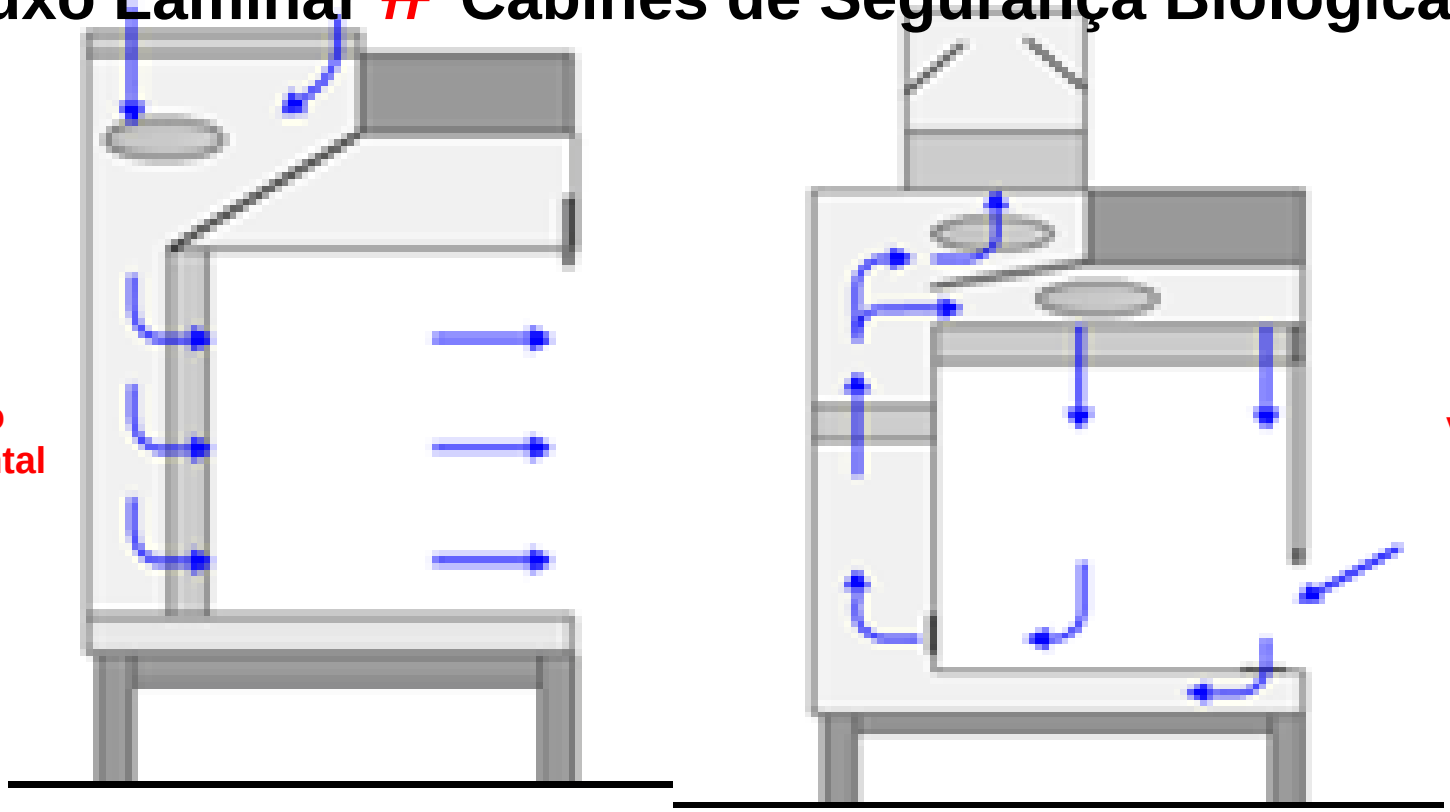
Preparo de meios e soluções

Manutenção

- Limpeza diária e a cada operação
- Lavagem periódica
- Controle microbiológico
- Uso da UV (controle do tempo de uso)
- Validação

Equipamentos Laboratório de Cultura de Células

Fluxo Laminar # Cabines de Segurança Biológica



Equipamentos Laboratório de Cultura de Células

Fluxo Laminar # Cabines de Segurança Biológica

Qual a aplicação Fluxo vertical?

Uso de material biológico

Manutenção

- Limpeza diária e a cada operação
- Lavagem periódica
- Controle microbiológico
- Uso da UV (controle do tempo de uso)
- Validação

O Trabalho no Fluxo Laminar

Treinamento

Concentração

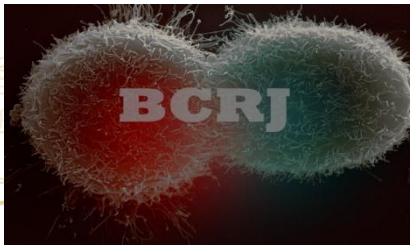
Planejamento

Assepsia constante

Medidas de segurança

Uso de EPIs

Metodologia



O Trabalho no Fluxo Laminar

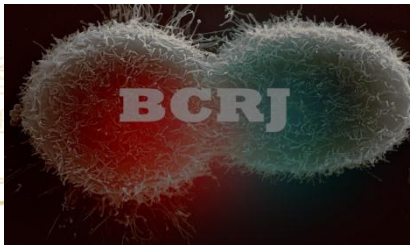
Passo a Passo

1. Desinfetar o fluxo utilizando **álcool 70%** antes de começar o trabalho, **estabilizar** por cerca de 20 – 30 minutos.

2. Desinfetar **luvas**, devem ser borrifados com álcool 70% e deixando secar ao ar por cerca de 30 segundos antes de começar o trabalho.

3. Colocar todos os **materiais dentro do fluxo** antes de começar a trabalhar. Os materiais que serão retirados de armários durante os procedimentos de cultura de células (garrafas de meio, caixas de pipeta ponta, pipeta ajudas) devem ser limpos com **gaze embebido com álcool 70%** antes do uso.

4. Durante o trabalho procurar **não contaminar** as luvas ao tocar qualquer coisa fora do fluxo (especialmente rosto e cabelo). Se contaminar as luvas contaminados borrifar com álcool 70% como acima antes de prosseguir.



O Trabalho no Fluxo Laminar – Passo a Passo

5**. Descarte as luvas** depois de manusear culturas contaminadas e no final de todos os procedimentos de cultura de células.

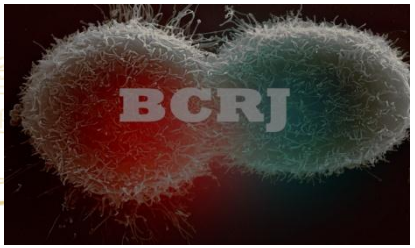
6. Os movimentos dentro do fluxo **não devem ser rápidos**. O movimento lento permitirá que o ar dentro do fluxo circule corretamente.

7. **Conversas**, espirros e tosses devem ser dirigidos para longe do fluxo de modo a não interromper as correntes de ar.

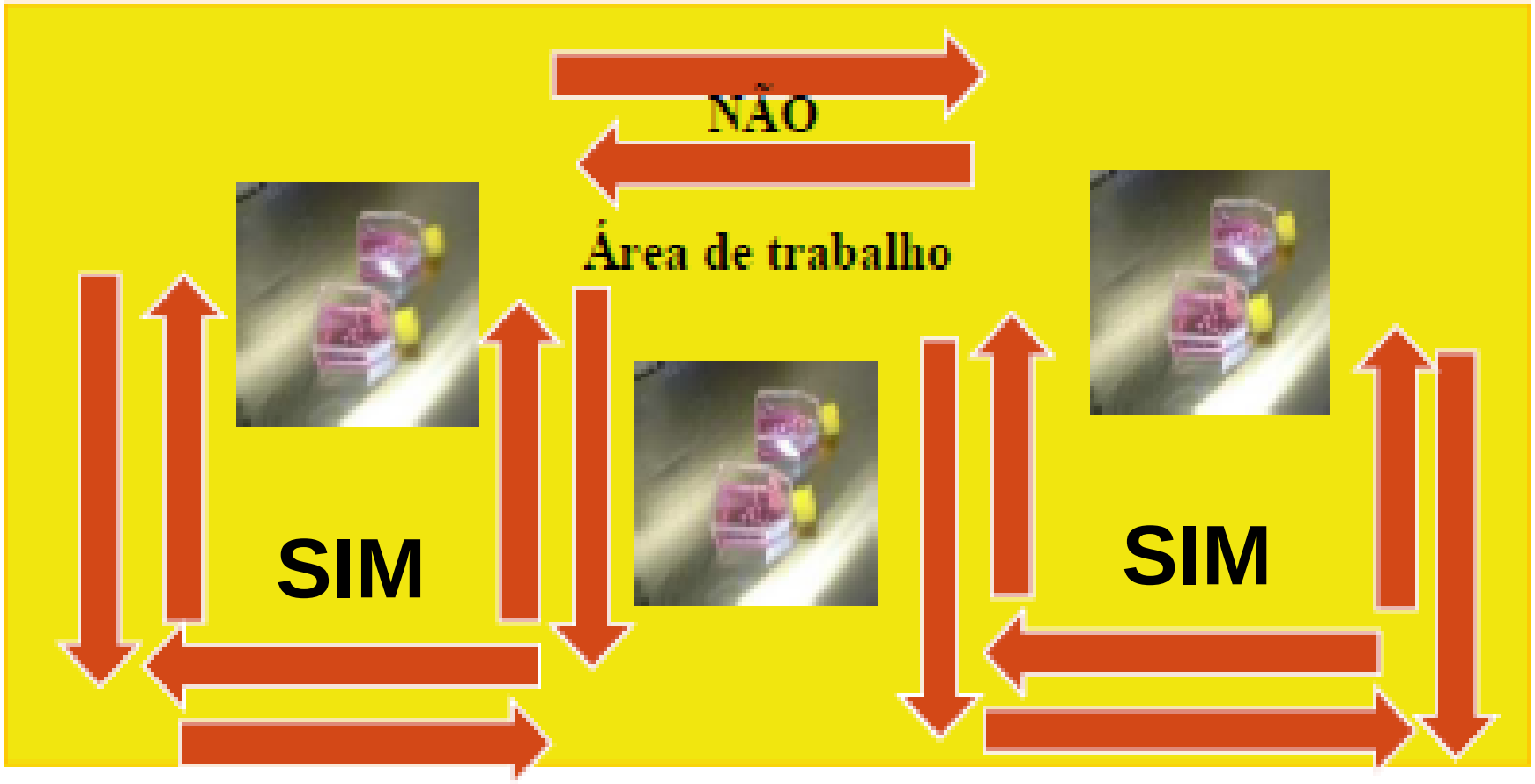
8. Depois de completo o trabalho **desinfecar todos os equipamentos e materiais** antes de removê-los do fluxo. **Pulverizar as superfícies** de trabalho dentro do fluxo com álcool 70% e passar a gaze. Recomenda-se incinerar as gazes usadas (considerar biossegurança nível II).

9. **Resíduos líquidos** de cultura de células descartados Conforme risco -

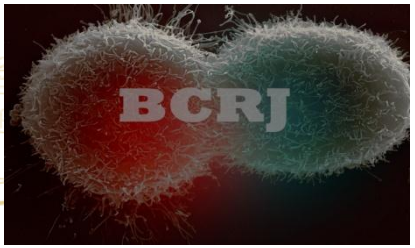
uso do ASPIRAMAX



Movimentos no Fluxo Laminar

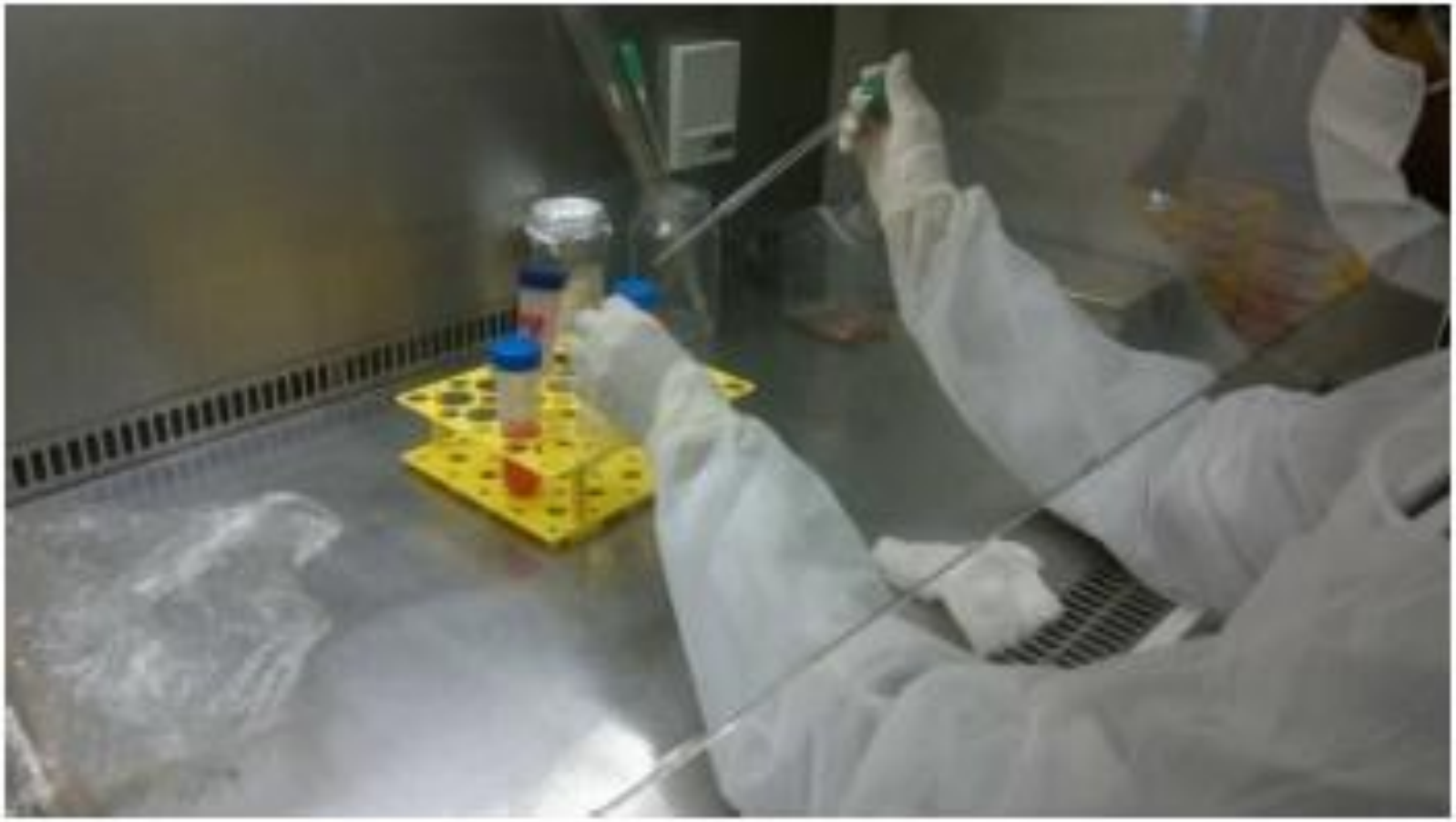


Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas



Fonte: R. Ian Freshney

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas



Nívea Ferreira

Estufas de CO2

Temperatura	37 ºC
	28 ºC
CO2	5%
	10%
Umidade	95%

Manutenção

Controle diário
Limpeza semanal
Troca da água

Estufa de secagem

Temperatura 50 – 60 ºC

Secar o material após a lavagem.

Secar o material após a autoclavação.

Manutenção:

Limpeza semanal

Autoclave

Autoclave para **esterilização**

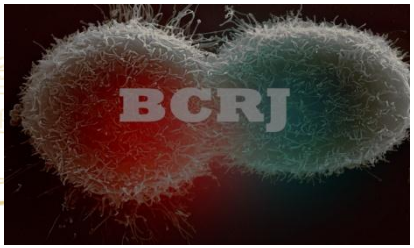
Autoclave para **desinfecção**

Manutenção

Troca diária da água

Limpeza semanal

Uso de controles



Autoclave

Controles de Esterilização

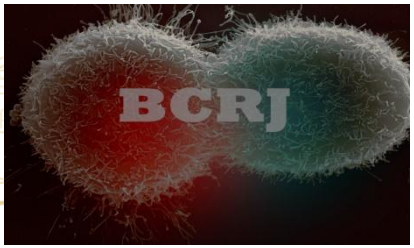
Indicadores Químico

Classe 1 – fita apenas indica que passou pelo processo de autoclavação

Classe 6 - emulador para Temperatura específica

Usados normalmente na 1ª autoclavação do dia

Mostram a exatidão do ciclo, altera a cor quando



Autoclave

Controles de Esterilização

Indicadores Biológico

Geobacillus stearotermophilus(usados como desafio da autoclavação)

Indicador controle muda de cor roxo para amarelo, indicada pela alteração de pH da solução que resulta a atividade microbiana.

Indicador teste não deve mudar de cor, pois o esperado é que os microorganismos tenham sido destruídos no processo

Microscópio invertido

Contraste de Fase

Focar primeiro com o menor aumento

Avaliar a cultura percorrendo toda a garrafa

Manutenção

Cuidados com a limpeza com abrasivos

Usar 50% éter + 50% álcool

Manual do fabricante

Centrífuga

Manutenção

Limpeza diária

Lavagem 15 dias

Manual do fabricante

Banho-maria

Crítico como fonte de contaminantes

Manutenção

Limpeza diária

Potenciômetro

Manutenção

Limpeza semanal do eletrodo e no uso

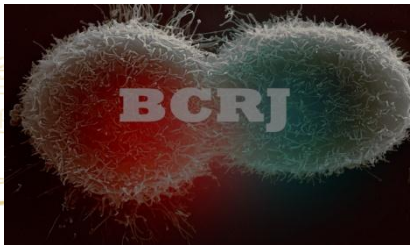
Freezer -80ºC e Congelador automático

Container Nitrogênio

Uso de EPIs

Alarme de O^2

Controle do abastecimento



Preparo de Material

Lavagem – Montagem - Esterilização

Técnico treinado e consciente da **importância do seu trabalho**

Procedimentos adequados

Limpeza e organização da sala

Controle de Equipamentos

Autoclave para desinfecção

Autoclave para esterilização

Constante verificação dos materiais antes da liberação

Lavagem de material

Material usado imerso em água ou extran. Não deixar secar após o uso.

Metodologia Lavagem

Extran over-night

Água da bica exaustivamente

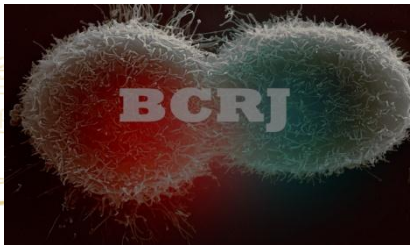
Água destilada 6x 30 minutos

Secar

Montar

Esterilizar

OBS. Troca do extran com mais de 12 horas (caso de final de semana ou feriados)

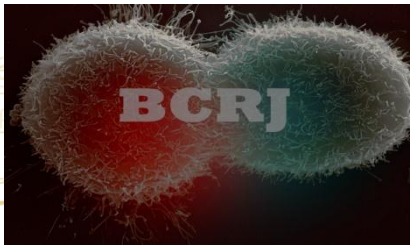


Meio de Cultura

Conjunto de fatores capazes de reproduzir um microambiente capaz de simular as condições fisiológicas de um organismo multicelular em seu âmbito tridimensional, o que nos permite o cultivo de células;

A escolha do meio de cultivo depende do tipo celular a ser cultivado;

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas



Meios de Cultura

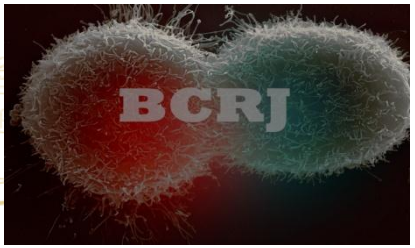
Meio Basal →

Atende as necessidades básicas de Nutrientes
-Sais
-Controle do pH

Suplementos →

Induz proliferação celular no meio basal

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas

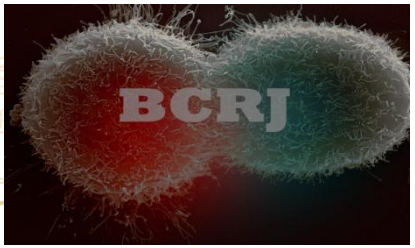


Meios de Cultura

Media Type	Examples	Uses
Balanced salt solutions	PBS, Hanks' BSS, Earle's salts DPBS HBSS EBSS	Form the basis of many complex media
Basal media	MEM	Primary and diploid culture
	DMEM	Modification of MEM containing increased level of amino acids and vitamins. Supports a wide range of cell types including hybridomas
	GMEM	Glasgows modified MEM was defined for BHK-21 cells
Complex media	RPMI 1640	Originally derived for human leukaemic cells. It supports a wide range of mammalian cells including hybridomas
	Iscoves DMEM	Further enriched modification of DMEM which supports high density growth
	Leibovitz L-15	Designed for CO_2 free environments
	TC 100 Graces Insect medium Schneider's Insect medium	Designed for culturing insect cells
Serum free media	CHO HEK293	For use in serum free applications
	Ham F10 and derivatives Ham F12 DMEM/F12	Note: these media must be supplemented with other factors such as insulin, transferrin and epidermal growth factor. These media are usually HEPES buffered
Insect cells	Serum-Free Insect Medium 1 (Cat no. S3777)	Specifically designed for use with Sf9 insect cells

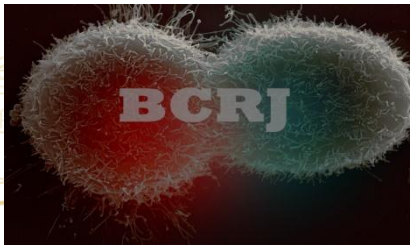
Table 2. Different types of culture medium and their uses (S3777)

Fonte Catálogo ECACC



Composição de um Meio Típico Adequado para o Cultivo de Células de Mamíferos

Aminoácidos	Vitaminas	Sais	Outros	Proteínas (necessárias em meios sem soro, quimicamente definidos)
Arginina	Biotina	NaCl	Glicose	Insulina
Cistina	Colina	KCl	Penicilina	Transferrina
Glutamina	Folato	NaH_2PO_4	Estreptomicina	Factores específicos de crescimento
Histidina	Nicotinamida	$NaHCO_3$	Vermelho de fenol	
Isoleucina	Pantotenato	$CaCl_2$	Soro	
Leucina	Piridoxal	$MgCl_2$		
Lisina	Tiamina			
Metionina	Riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptofano				
Tirosina				
Valina				



Meio de Cultura

Componentes

Sais Inorgânicos – equilíbrio osmótico

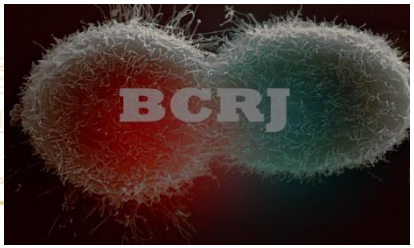
Sistemas Tampão – regular o pH

Carboidratos – fonte de energia – glicose e galactose e alguns com frutose e maltose.

Aminoácidos – essenciais e não essenciais – estimula o crescimento e prolonga a viabilidade, determina a densidade máxima da cultura.

Vitaminas – principal fonte soro, são percursores de inúmeros co-fatores – crescimento e proliferação.

Proteínas e Peptídeos – particularmente importantes em meios sem soro – albumina, transferrina, fibronectina, fetuína e etc



Meio de Cultura

Componentes

Ácidos Graxos e lipídeos – particularmente importantes em meios sem soro]

Oligoelementos – zinco, cobre, selenio, ácido tricarboxílico ajudam a remover os radicais livres.

2-Mercaptoetanol - é usado para reduzir pontes dissulfeto. Ao procurar por radicais hidroxila (entre outros), ele pode agir como um antioxidante biológico.

Insulina – regula o metabolismo e promove a sobrevivência das células

Piruvato de Sódio – fonte de energia para propagação de células

BSA - é um transportador para esteróides, ácidos gordos, e hormonas da tiróide e estabiliza volume de fluido extracelular.

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas

- **Meios de cultura base é nutricionalmente insuficiente para cultura de células e, assim, precisa ser suplementado.**

Soro - *aditivo ou suplemento quimicamente indefinido*

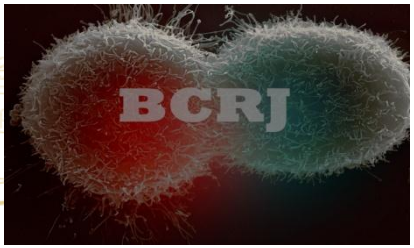
↓

Hormônios e fatores de crescimento → Induz proliferação celular no meio basal

Proteínas → Auxiliam na adesão celular

Auxiliam no transporte de hormônios, minerais e lipídeos

- **Concentração recomendada –2 a 20%**
- **O fetal bovino é o favorito por apresentar menor concentração de Imunoglobulinas e elevada proporção de fatores de crescimento em comparação a bezerros, cavalos e humanos**



Problema do Uso de Soro Fetal: Fonte Animal! Quimicamente indefinido!

Solução: Meios de cultura livres de soro

PARA SE DESENVOLVER UM MEIO COM COMPOSIÇÃO TOTALMENTE CONHECIDA, PODE-SE BUSCAR IDENTIFICAR ELEMENTOS NO SORO FETAL QUE TENHAM EFEITO POSITIVO NO CULTIVO CELULAR.

UMA DAS ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MEIOS ISENTOS DE SORO É A SUBSTITUIÇÃO DO SORO PELA ADIÇÃO DE ELEMENTOS ESPECÍFICOS COM FUNÇÕES SIMILARES, OBSERVANDO O EFEITO QUE ESSE SUPLEMENTO INDUZ NO CRESCIMENTO CELULAR.

Preparo do Meio de Cultura

Pontos críticos

- Água **ultra pura** obtida no dia
- **dissolver individualmente** por completo cada ingrediente
-pH aferido **após** todos suplementos inclusive o soro
- **Operador**
- **Fonte de contaminação** (micoplasma)
- uso de EPIs
- sala apropriada sem circulação

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas

Preparo do Meio de Cultura

Uso de EPIs

Nívea Ferreira

Filtração

Pressão Positiva

Pré filtração

Membranas ou cartuchos

0,8 um

0.45 um

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas

Preparo de Meios e Soluções

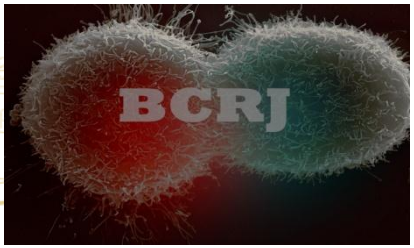
Pressão Positiva N2

Filtração esterilizante

Membrana ou cartuchos 0,2 e 0,1 um

Controle Microbiológico

Aprovação, liberação e uso



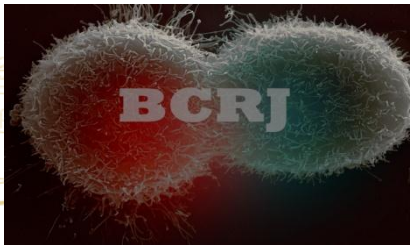
Classificação das culturas celulares quanto ao "tempo" de cultivo

Cultura Primária

Cultura Secundária/linhagem "finitas"

Linhagem Celular Estabelecida (ou contínua)

Linhagem Celular Transformada



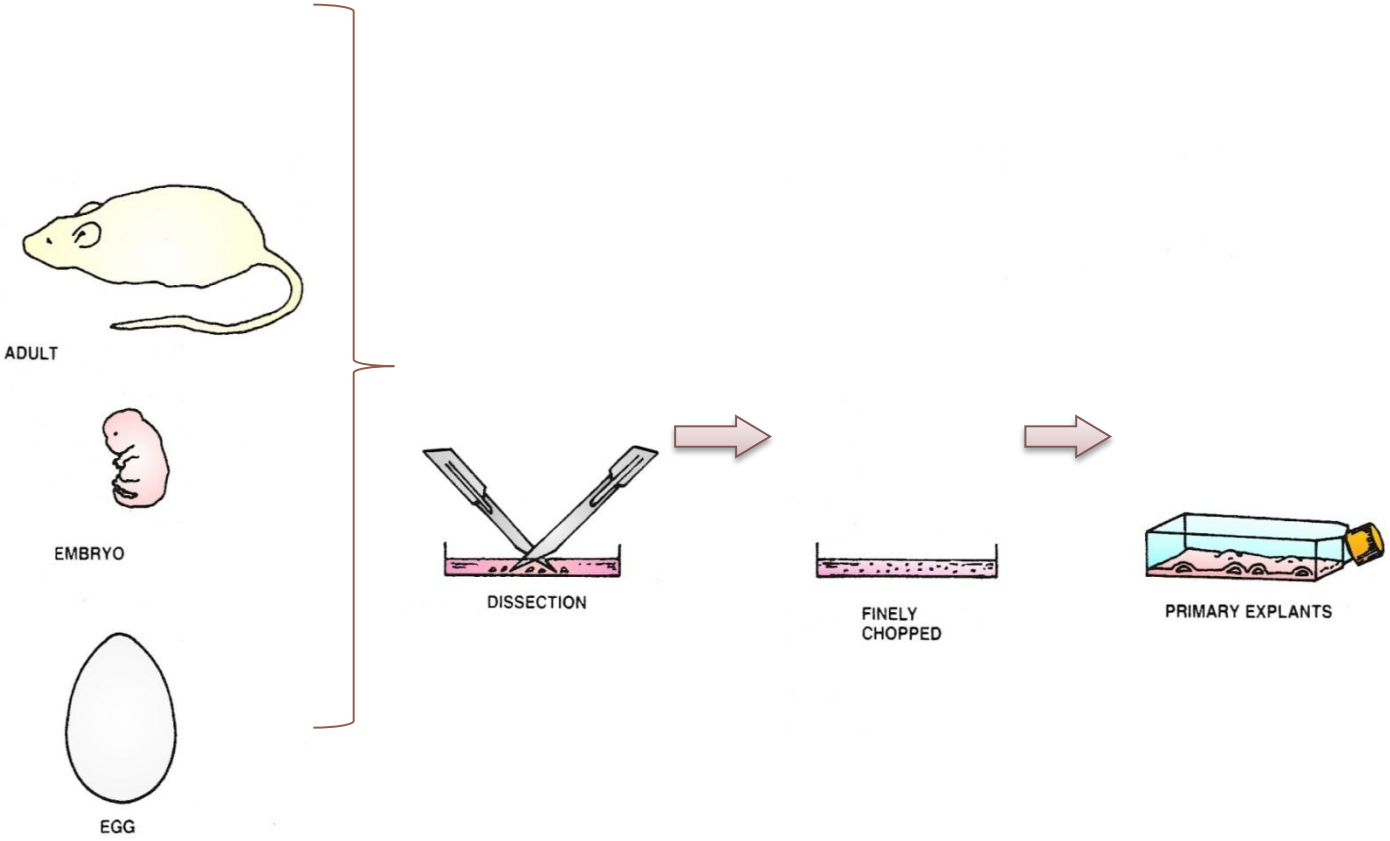
Cultura Primária

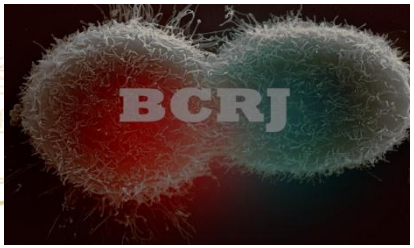
Células recém-tiradas do tecido *in vivo* e colocadas *in vitro.*

- **A partir do primeiro subcultivo (repique ou passagem), passa a ser uma linhagem celular**
- **São inicialmente heterogêneas**
- **Vantagem: Células mantêm as características do tecido de origem**
- **Desvantagem: Pouca quantidade de células b**

✓Obtenção de cultura primária em mamíferos

- **Por explantes teciduais (fragmentos de tecidos)**

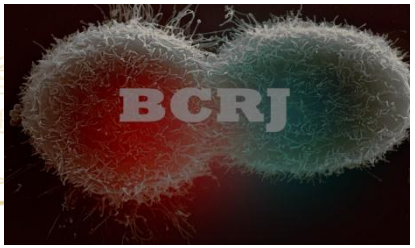




Cultura secundária

Células derivadas de culturas primárias que estão sendo cultivadas *in vitro* por algum tempo, mas não sofreram transformação. Podem sofrer senescência.

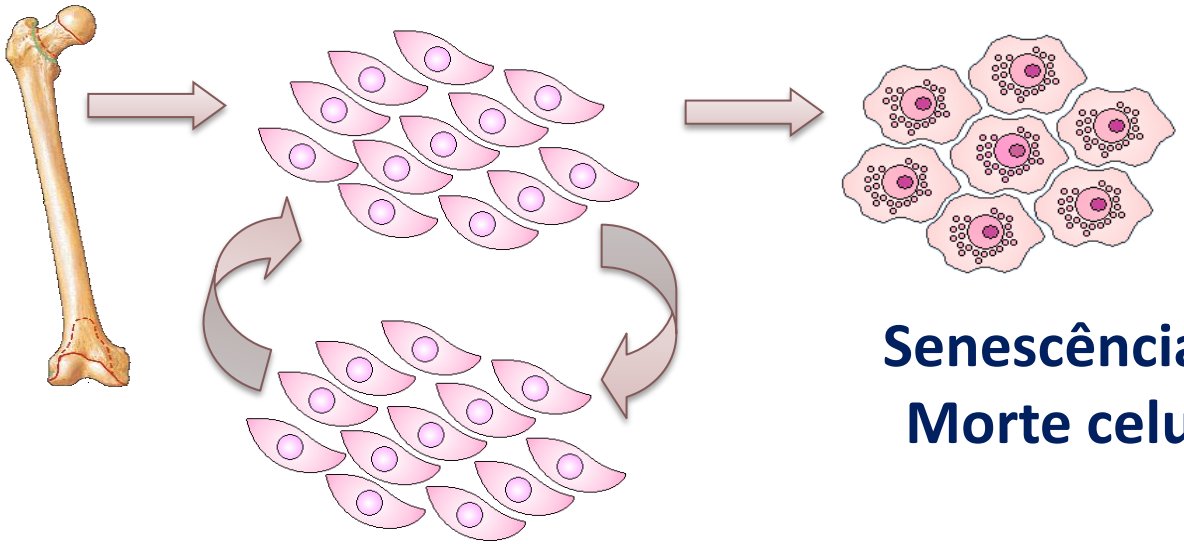
- **Obtidas pelo subcultivo das culturas primárias**
- **Culturas mais homogêneas**
- **Vantagem: Possuem maior velocidade de crescimento do que a cultura primária**
- **Desvantagem: Podem ter alterações morfológicas e de expressão de proteínas**



✓Linhagens celulares “finitas”

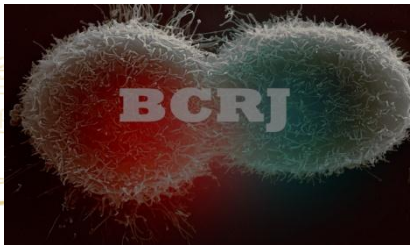
•Inibição por contato

•Senescência celular replicativa e crise



Senescência ou
Morte celular

Número definido (finito) de multiplicações

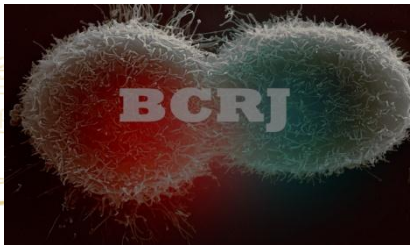


Linhagem celular estabelecida (ou contínua)

Células derivadas de culturas primárias ou linhagens celulares, que podem se dividir indefinidamente ("imortalizadas").

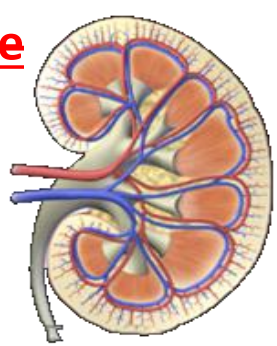
- **Imortalização pode ocorrer ESPONTANEAMENTE ou INDUZIDA (vírus oncogênicos ou ttos químicos)**
- **<u>Vantagem:</u> Pode ser propagada *in vitro* por tempo indeterminado (não sofre senescência)**
- **<u>Desvantagem:</u> As células não possuem todas as suas características originais**

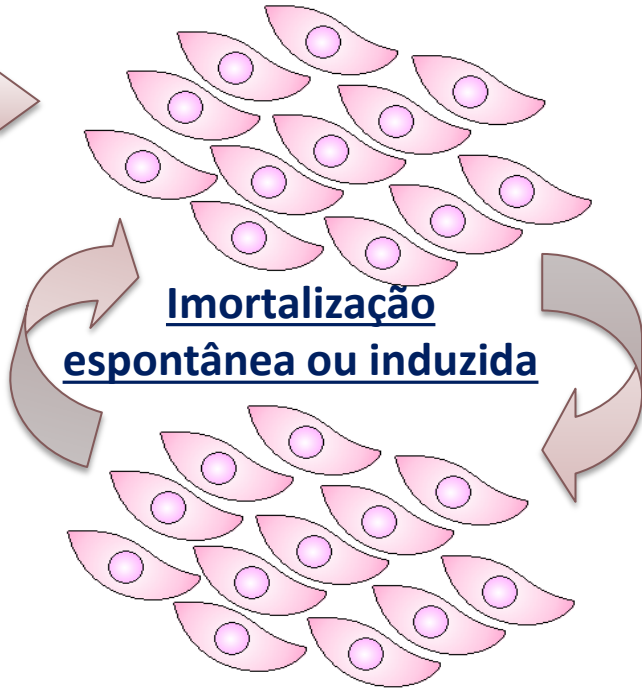
Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas



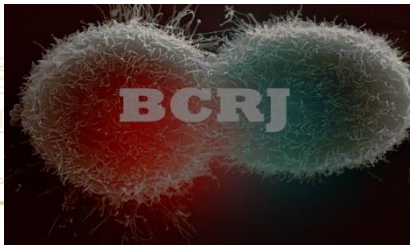
✓ **Linhagens celulares contínuas (estabelecidas)**

- **Inibição por contato**
- ~~**Senescência celular replicativa e crise**~~





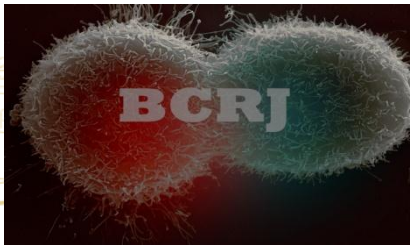
Número indefinido de multiplicações



Linhagem Celular Transformada

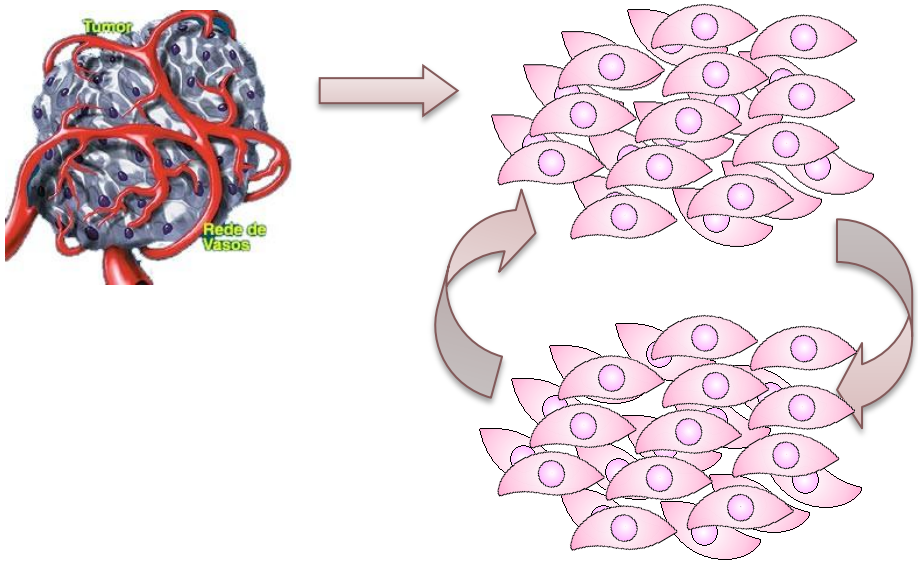
Células com características tumorais/ cancerígenas.

- Quando alterações na linhagem celular afetam o controle do ciclo celular
- Morfologia alterada
- Alta taxa de crescimento
- Menor dependência de soro e de ancoragem
- Aumento da variação cromossômica entre células
- Vantagem: Quantidade de células é praticamente ilimitado
- Desvantagem: Células mantêm poucas características originais do tecido proveniente



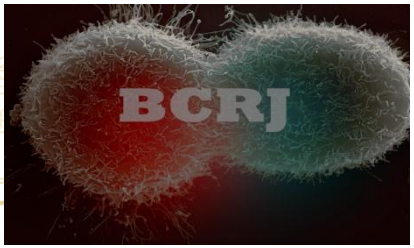
✓Linhagens celulares transformadas

- ~~Inibição por contato~~
- ~~Senescência celular replicativa e crise~~



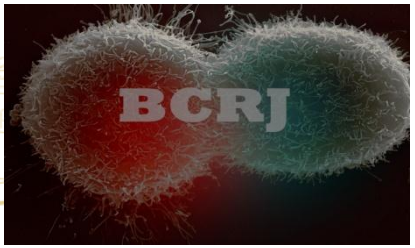
Transformação espontânea ou induzida

Número indefinido de multiplicações



Manutenção das células

Nívea Ferreira



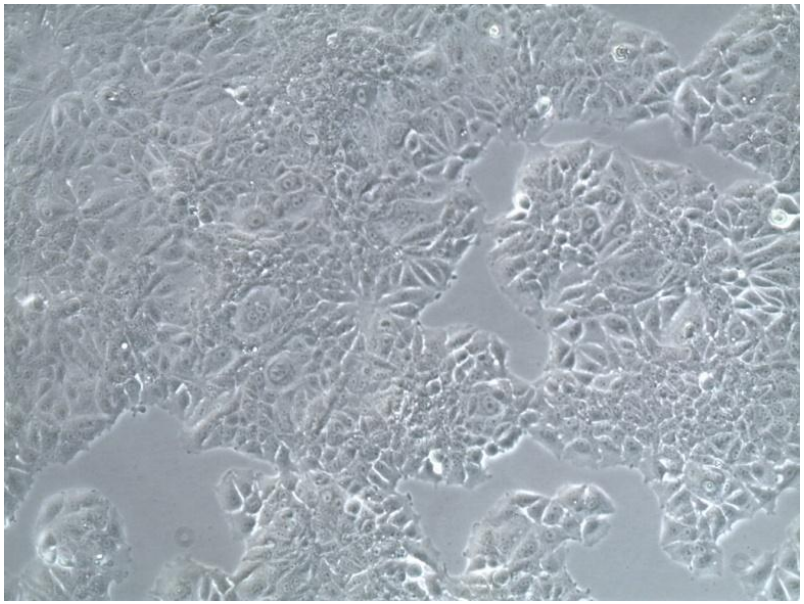
Características das células em cultura

Células aderentes

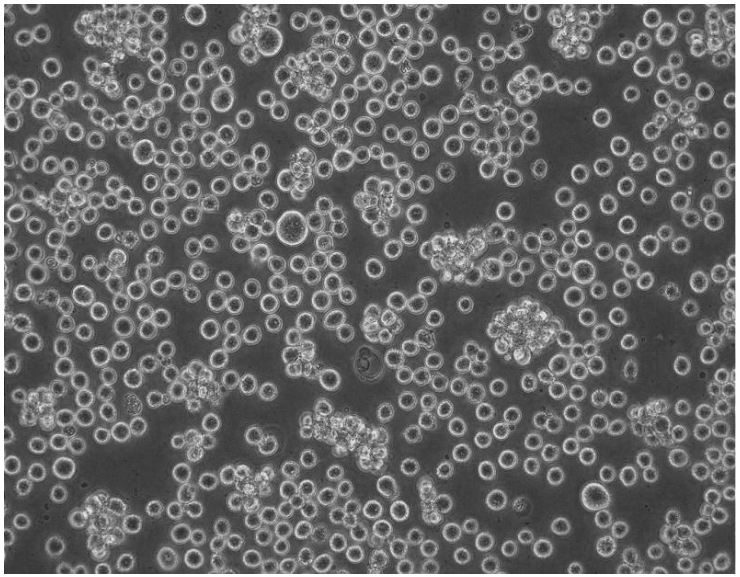
Célula em suspensão

Células Mistas (suspensão e aderentes)

Células Aderentes x Células em Suspensão x células mistas (aderentes e suspensão)

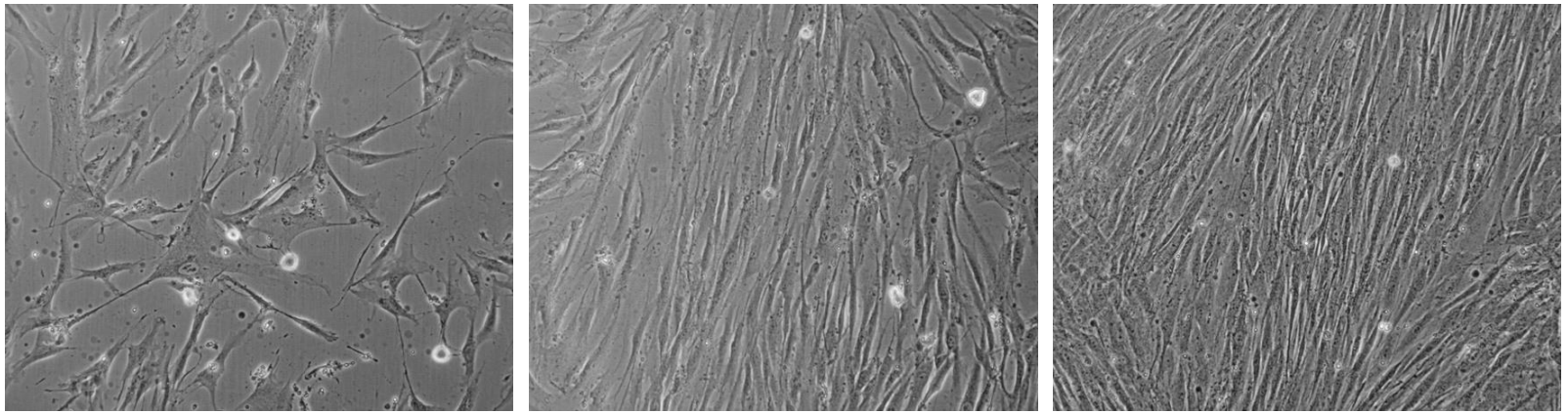


Célula MCF7 – Tumor de mama



Célula K562 – Leucemia miolóide crônica

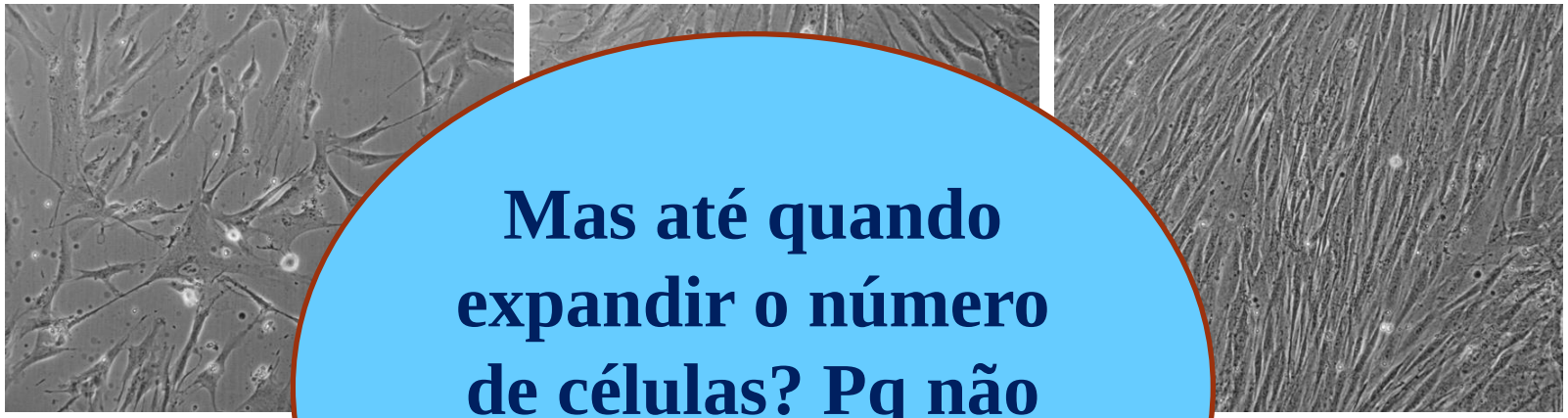
Proliferação e Confluência de Células em Monocamada – Subcultivo de Células Aderentes



Ação enzimática:

- Tripsina
  - quebra proteínas nas regiões de carboxila dos aminoácidos lisina e arginina
  - atividade alta a 37° C.

Proliferação e Confluência de Células em Monocamada – Subcultivo de Células Aderentes



Mas até quando expandir o número de células? Pq não expandir indefinidamente?

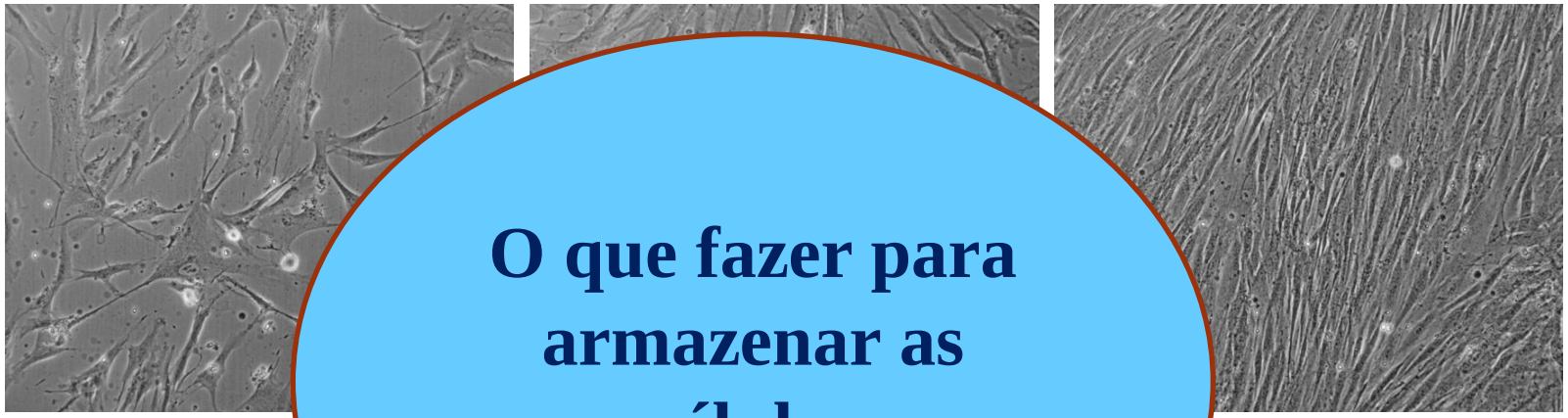
Ação enzimát

Tripsina

quebra pr ia dos aminoácidos lisina e arginina

atividade alta a 37° C.

Proliferação e Confluência de Células em Monocamada – Subcultivo de Células Aderentes



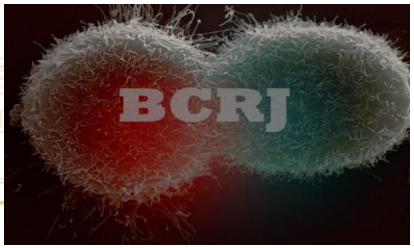
O que fazer para armazenar as células expandidas?

Ação enzimáti

Tripsina

quebra pro ila dos aminoácidos lisina e arginina

atividade alta a 37° C.



Solução:

CRIOPRESERVAÇÃO

Nívea Ferreira

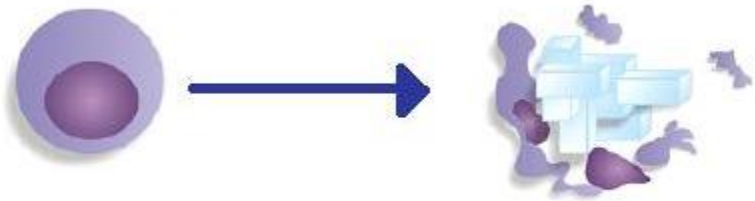
Princípios da Criopreservação

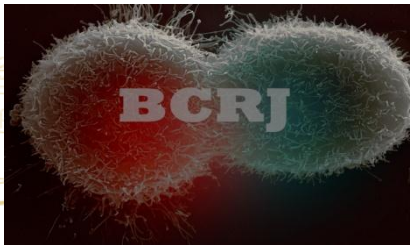
Desidratação celular

• Retirada de água intracelular para impedir a formação de cristais de gelo

• **Consequências dos cristais de gelo:**

Rompimento de organelas e da membrana citoplasmática

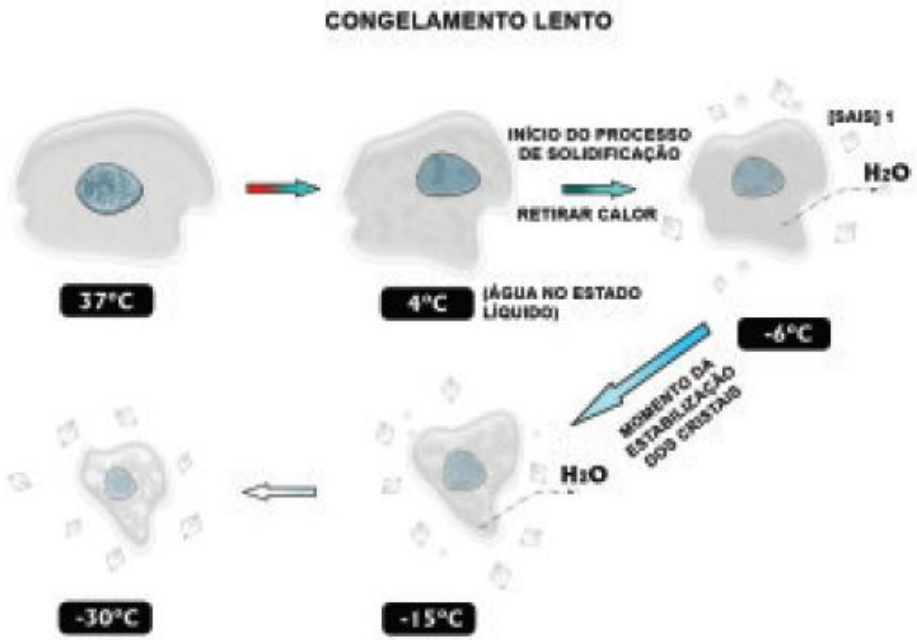




Princípios da Criopreservação

Como promover a desidratação celular?

Congelamento lento (1°C/min)



congelamento da água extracelular

↓

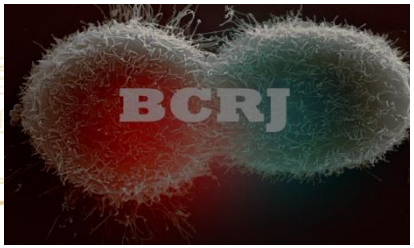
Aumenta a concentração de solutos extracelular

↓

Perda de água para o meio extracelular

↓

DESIDRATAÇÃO



Problema: A maioria das células morrem em temperaturas muito baixas (-5°C a -20°C).

Solução: Adição de Crioprotetores:

Compostos químicos que limitam os danos aos tecidos biológicos em condições de congelamento, pois tornam a membrana das células protegidas dos cristais.

Mais utilizados são: Glicerol e DMSO (na concentração de 5-10%)

IMPORTANTE: SÃO TÓXICOS PARA A CÉLULA À TEMPERATURA AMBIENTE!!!

Criopreservação – Cooler Mr Frosty

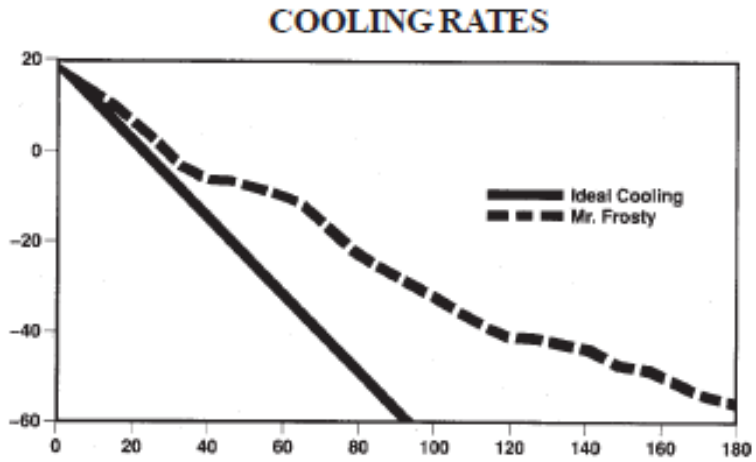


Fig. 6 The ideal cell cooling rate and the cooling rate provided by NALGENE "Mr. Frosty" 1°C freezing container, NALGENE Cat. No. 5100-0001.

DESVANTAGENS

Única curva de congelamento 1 - 2º C / min

VANTAGENS

Baixo custo do equipamento e operacional

Criopreservação

Congelador Automático Programável

DESVANTAGENS

Custo elevado do equipamento

Instalação adequada

Elevado custo de N2 e de Manutenção

VANTAGENS

Programação da curva de congelamento

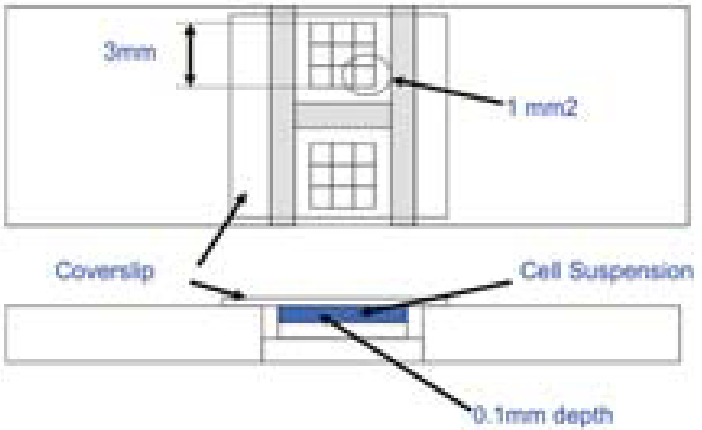
Registro dos congelamentos

Quantificação Celular

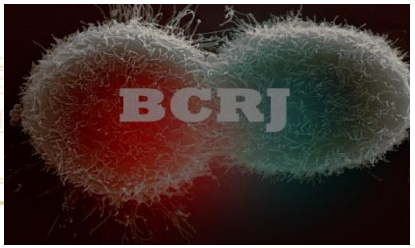
Câmara de Neubauer

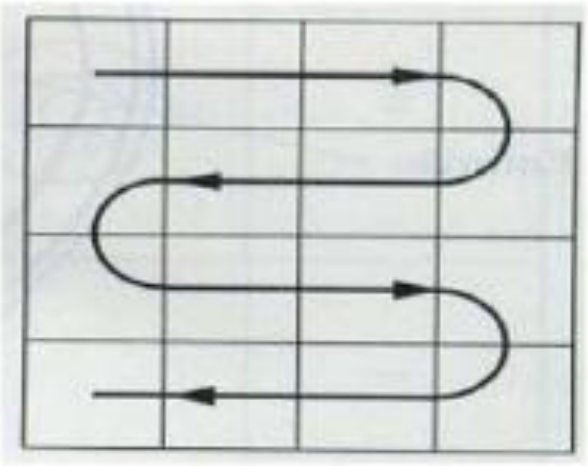
Procedimentos de contagem

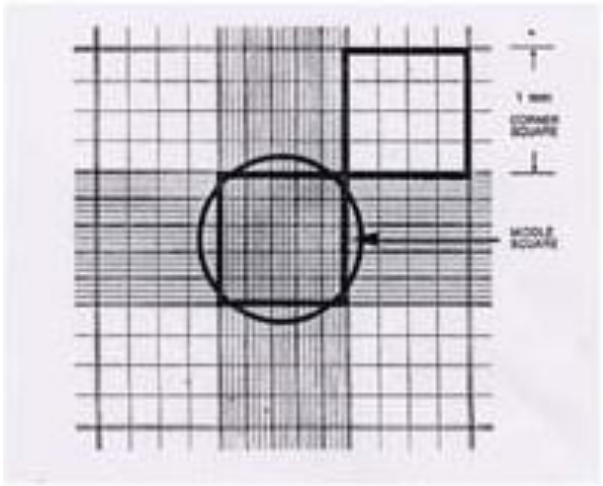
- Limpar o câmara
- umedecer a lamínula com água, fazer uma leve pressão até visualizar por refração os anéis de Newton
- Diluição 1:1 com corante Azul de Trypan
- preencher ambos os lados da câmara com a suspensão de células (+/- 10 ul) o observar ao microscópio
- ideal nº de células entre 100 – 200 (exatidão na contagem)
- contar e calcular as células viáveis e não viáveis

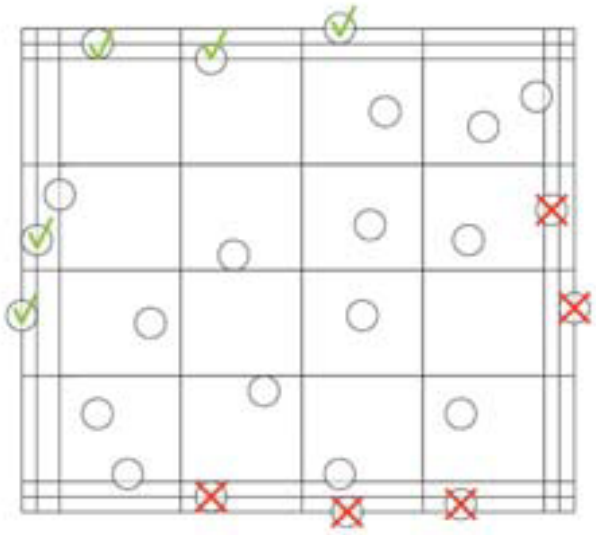


Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas



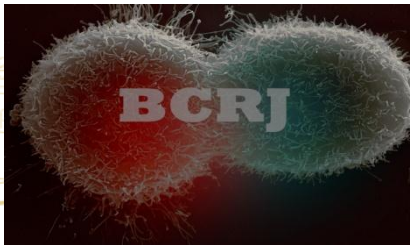






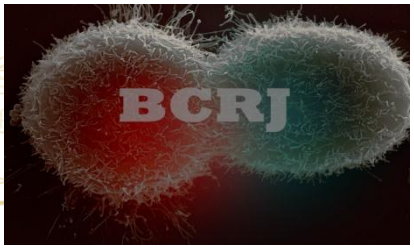
Guia para a contagem de células com câmara , incluir as células no meio do grid e as células que se sobrepõem borda em dois lados (marcado), excluir as células que se sobrepõem vantagem sobre outros dois lados (cruzados)

Nívea Ferreira



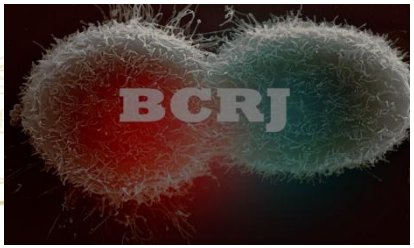
O número de células por mL de uma suspensão quando contado em câmara de Neubauer é obtido pela equação:

$$\frac{Q_1+Q_2+Q_3+Q_4}{4} X10^4 X \text{ faror de diluição} = n^\circ \text{ de células / mL}$$



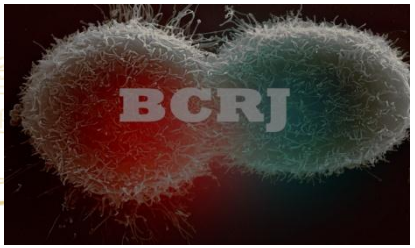
Vantagens do cultivo de células *in vitro*

- Estudo do comportamento da células em condições controladas - sem a influência animal.
- Obtenção de células com boa homogeneidade e bem caracterizadas;
- Reprodutibilidade dos experimentos
- Redução do uso de animais
- Exposição a fármacos em concentrações definidas (farmacocinética)
- Economia de animais, reagentes, tempo, etc.
- Possibilidade de não realizar experimentos em seres humanos



Limitações do cultivo celular in vitro

- Mão de obra especializada e requer ambiente controlado.
- Uso de produtos de origem animal – instabilidade dos lotes.
- Custo elevado
- Custo do esforço e material (baixa quantidade de células produzidas para o material e esforço gasto);
- Perda de características fenotípicas;
- Necessidade do uso de marcadores devido à perda de características fenotípicas;
- Intabilidade genética
- Instabilidade das células (sobretudo em linhagens celulares imortais).

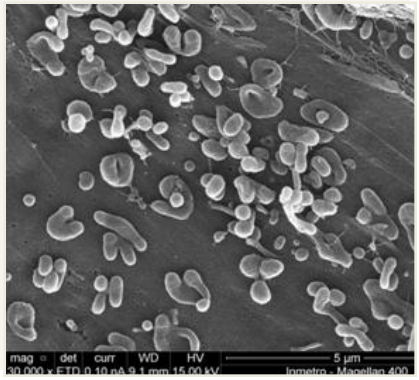


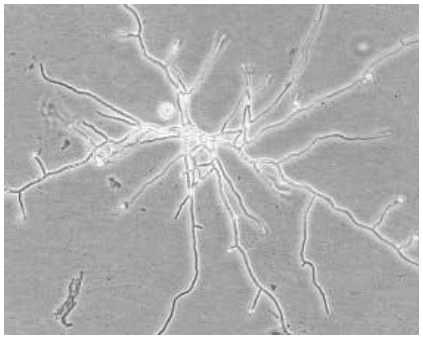
Problemas em cultura de células

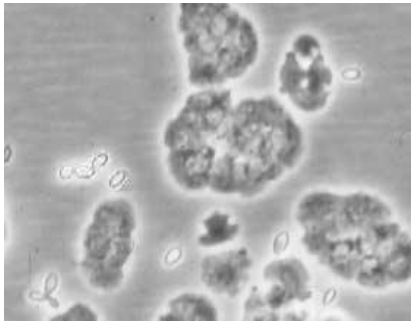
- **Contaminações**
- **Biológicas**
- Bactérias, fungos, leveduras, vírus, micoplasma e célula - célula

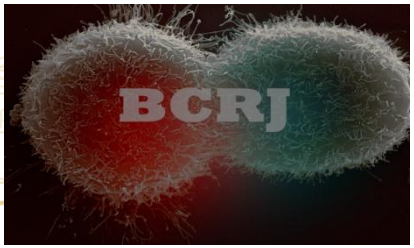
Químicas

- Resíduos químicos
- Resíduos de produtos químicos (ex. detergentes, lisoform, álcool etc) encontrados na vidraria, estufas, fluxos e etc.
- Suplementos deteriorados (ex. glutamina)
- Impurezas CO2
- Endotoxinas (soro, elaboração de meios, etc)
- Insumos citotóxicos (ex. garrafas, tubos plásticos, etc)
- Resíduos na água



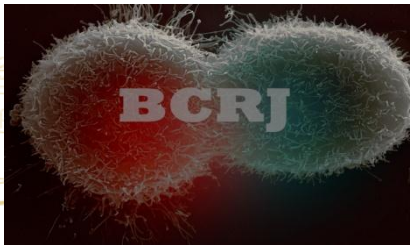






Principais Fontes de Contaminação

- Banho-maria
- Estufa de CO2
- Garrafa de cultura (corpo e a tampa)
- Fluxo Laminar sem verificação e validação
- Falta de Controle do uso dos insumos
- Uso individual dos materiais não aplicado(caixa de pipeta, garrafas de meios e soluções etc)
- Aerosois (descarte inadequado) - Contaminações cruzadas
- Laboratório (pressões de ar, limpeza inadequada, fontes de contaminação etc)
- Ausência ou inadequado treinamento
- **Operador**



Reduzi o risco de contaminações e erros de identificação

A – Manter excelentes registros **(documentos de rastreabilidade da origem das células, dos procedimentos, dos controles das distribuições, dos insumos, dos equipamentos e etc)**

B – Usar Boas Práticas de cultura de células

C – Testar a cultura e os reagentes utilizados regularmente

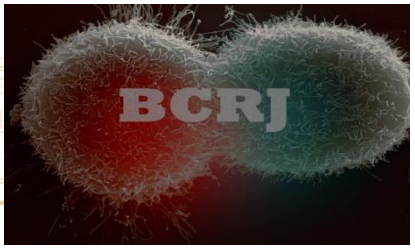
Manter excelentes registros

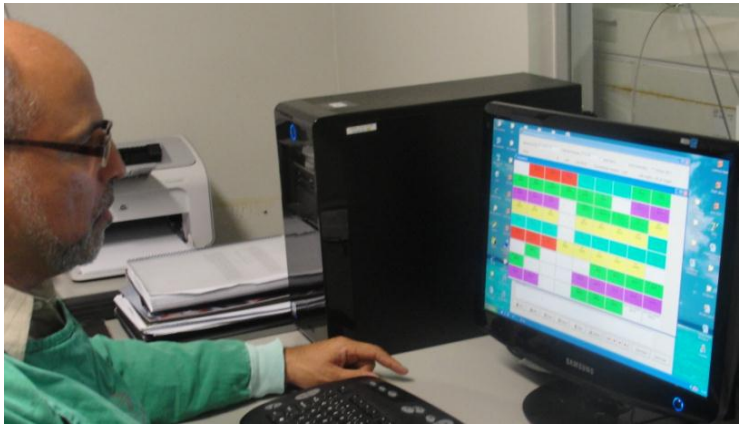
Células com rotulagem questionável – garrafa ou criotubo

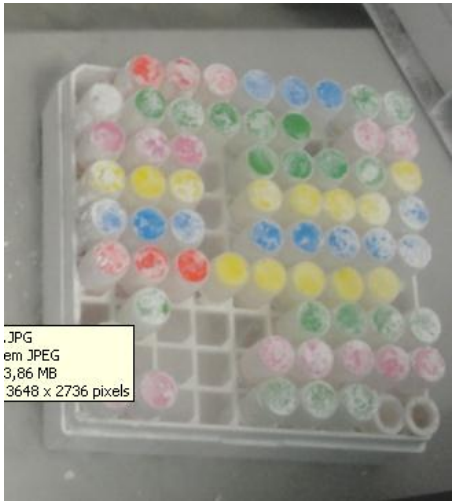
- Se não é legível
- Se não estiver catalogada
- Informações diferentes no registro e no criotubo

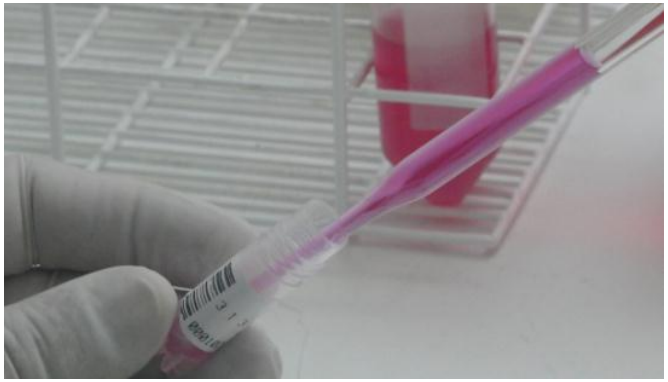
O que fazer?

Qualidade em Biotecnologia
Armazenamento









Nívea Ferreira

Sistema de Gestão da Qualidade

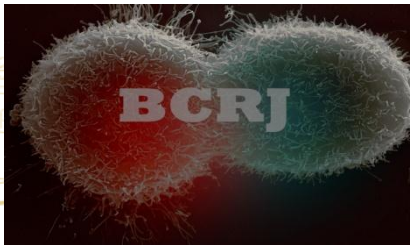
Conjunto de condutas para adequar seus processos a uma norma.

Procura assegurar a qualidade e integridade dos trabalhos desenvolvidos.

Desafios

- Motivação
- Liderança
- Participação
- Objetivos
- Definição de Metas

Adaptado de: www.mbio.ncsu.edu/ JWB/MB409/lab/labs.html



Contaminou e agora?

O que fazer em caso de contaminação com bactérias?

O que fazer em caso de contaminação com leveduras?

O que fazer em caso de contaminação com fungos?

O que fazer em caso de contaminação com micoplasma?

O que fazer em caso de contaminação com vírus?

Minicurso de Cultura de Células Humanas e Animais – Noções Básicas

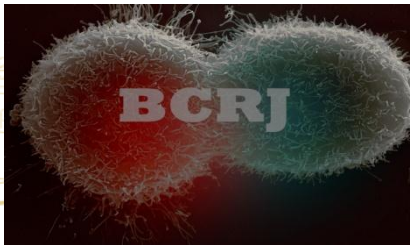
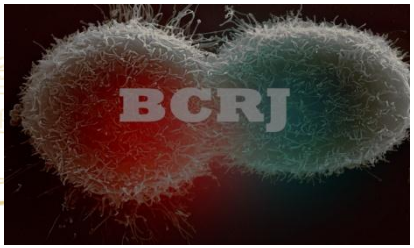


TABLE 9.4. Antibiotics Used in Tissue Culture

Antibiotic	Concentration, µg/mL (unless otherwise stated) Working	Cytotoxic	Activity against
Amphotericin B (Fungizone)	2.5	30	Fungi, yeasts
Ampicillin	2.5		Bacteria, gram positive and gram negative
Ciprofloxacin	100		Mycoplasma
Erythromycin	50	300	Mycoplasma
Gentamycin Gentamicin	50	>300	Bacteria, gram positive and gram negative; mycoplasma
Kanamycin	100	10 mg/mL	Bacteria, gram positive and gram negative; mycoplasma
MRA (ICN)	0.5		Mycoplasma
Neomycin	50	3,000	Bacteria, gram positive and gram negative
Nystatin	50		Fungi, yeasts
Penicillin-G	100 U/mL	10,000 U/mL	Bacteria, gram positive
Polymixin B	50	1 mg/mL	Bacteria, gram negative
Streptomycin SO_4	100	20 mg/mL	Bacteria, gram positive and gram negative
Tetracyclin	10	35	Bacteria, gram positive and gram negative
Tylosin	10	300	Mycoplasma

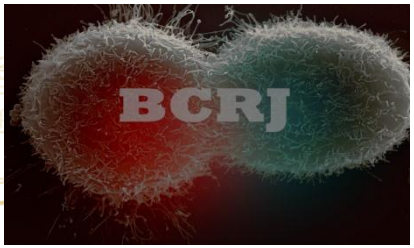
After Paul, 1975.

Fonte: R. Ian Freshney Culture of Animal Cells



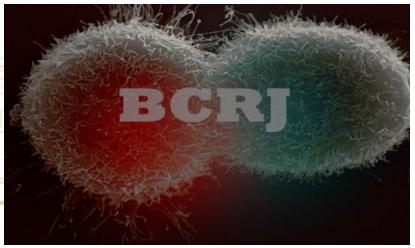
Alguns Efeitos a Longo Prazo da Contaminação por Micoplasma nas Culturas de Células

- Taxa de crescimento Alterada
- Alterações morfológicas
- Aberrações cromossômicas
- Alterações no metabolismo de aminoácidos e ácidos nucleicos



Conclusões e Considerações de Controle da Qualidade em Cultura de Células

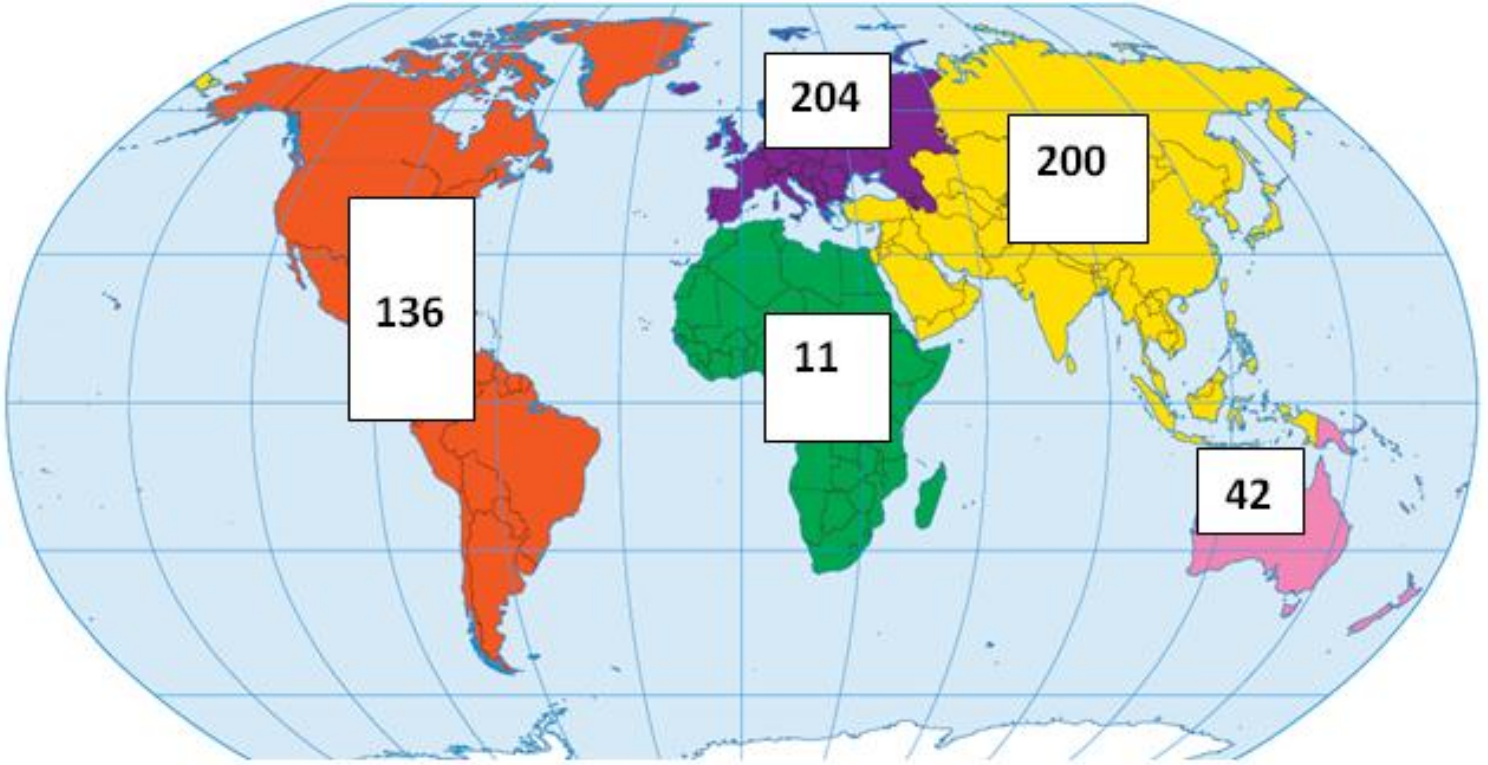
- Controle da Limpeza do Laboratório;
- Controle da Limpeza e Assepsia dos Equipamentos – estufas, banho-maria, fluxos, bancadas, etc;
- Controle da Vidraria – não lavar material descartável e correta metodologia de desinfecção, lavagem e preparo do material;
- Controle da Manutenção e Calibração Periódica dos Equipamentos;
- Controle dos Registros de Utilização do Laboratório;
- Treinamento, Conscientização e Atualização da Equipe;
- Uso dos EPIs e EPCs;
- Boas Práticas em Cultura de Células



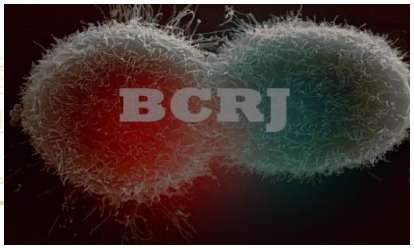
Banco de Células do Rio de Janeiro

O BCRJ é o único do Brasil e o maior Banco de Células na América do Sul, não só no acervo, mas na prestação de serviços.

Distribuições de Coleções WFCC



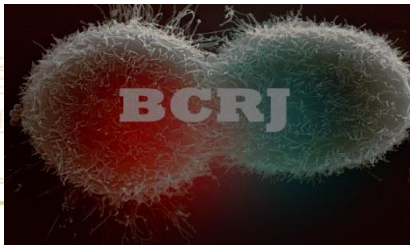
Distribuição das coleções WFCC, fonte http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/by_region/



Responsabilidades de uma Coleção

Fornecimento de uma Célula

- Livre de contaminantes
- Viável
- Autêntica
- Rastreabilidade
- Ficha Técnica
- Suporte Técnico



Obrigado

Nivea Ferreira
Gerente do BCRJ
Banco de Células do Rio de Janeiro
Pólo Tecnológico – Inmetro
Tel. / Fax. 55 21 2145.33.37 - 2145.33.38

e-mail: bcrj@hucff.ufrj.br
cellbank@hucff.ufrj.br

HP: http://www.bcrj.hucff.ufrj.br/