

## Capítulo 5

# Cultivo celular

Emanuele Amorim Alves  
Anna Christina Rosa Guimarães

### **1. Histórico de desenvolvimento da tecnologia de cultura de tecidos**

#### **1.1. Histórico da cultura de células**

O cultivo de células se iniciou no princípio do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado. Essa técnica ainda é uma importante ferramenta de pesquisa nos laboratórios do mundo inteiro.

Os primeiros experimentos consistiam em cultivo de tecidos fragmentados mecanicamente em frascos contendo fluidos dos animais de onde provinham os tecidos. Devido a essa forma de cultivo, durante mais de 50 anos essa técnica foi chamada cultivo de tecidos – do inglês *tissue culture* –, sendo esse termo atualmente usado genericamente para denominar tanto o cultivo de células quanto o de tecidos e de órgãos.

Harrison foi um pioneiro no uso de cultura de células. Na época, ainda havia dúvidas da dinâmica do desenvolvimento do tecido nervoso, pois somente observações microscópicas não forneciam informações sobre esse processo. Harrison queria provar que as fibras nervosas eram formadas a partir de células nervosas. Para isso ele necessitou observar essas células fora do organismo para comprovar sua teoria. Mas como seria possível um tecido viver fora do organismo original? Harrison levou em consideração as necessidades básicas de uma célula e desenvolveu um experimento no qual ele mimetizou tais condições. Assim, ele dissecou o tubo medular de um embrião de sapo e o mergulhou em sua linfa fresca. Esta linfa em instantes se coagulou e, logo em seguida, Harrison selou o frasco com parafina, observando a sua preparação ao microscópio todos os dias. Uma das vantagens desse experimento era a falta de necessidade de controle de temperatura, já que os anfíbios são animais cuja temperatura varia com a temperatura ambiente. Harrison teve o cuidado de manter as condições assépticas, e suas considerações sobre a possibilidade de se manter *in vitro* células vivas por mais de uma semana foram um marco para a cultura de células.

Com esse experimento, Harrison confirmou a sua hipótese, provando que as fibras nervosas são formadas a partir das células nervosas. Com isso, muitos outros cientistas passaram a se interessar por esse modelo de experimento, introduzindo o uso de cultura de células em suas pesquisas.

Em 1912, Alexis Carrel, utilizando informações obtidas nas observações de Harrison, desenvolveu um modelo a partir de células cardíacas de embrião de galinha para o cultivo. Seus experimentos foram muito importantes, pois com Carrel descobriu-se a necessidade da troca de fonte de nutrientes contidos nos frascos. Essa renovação constante de nutrientes em cultivo permitiu que as células pudessem ser cultivadas por períodos ainda maiores do que os utilizados por Harrison.

Em 1951, George Gey cultivou células de tecido tumoral humano estabelecendo a linhagem HeLa, utilizada até hoje em todo o mundo. O fato

de que tumores humanos poderiam dar origem a células contínuas em linhagem aumentou o interesse pelo cultivo de tecidos.

O avanço na cultura de células ocorreu, em grande parte, por intermédio dos experimentos de Hayflick e Moorhead, em 1961, considerados clássicos, nos quais eles utilizaram células de vida finita.

Em 1962, Nakamura e colaboradores, no Japão, estabeleceram a linhagem VERO, oriunda de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Essa célula é uma das poucas, na atualidade, aprovadas para uso em produção de vacinas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que a torna um excelente modelo de pesquisas para o desenvolvimento de novas vacinas.

Muitas outras linhagens foram estabelecidas pelos pesquisadores. Atualmente, a cultura de células não se limita ao estudo do comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro*. Seu uso se estende à medicina, pois células em cultivo têm importante papel no tratamento de doenças degenerativas. Para a terapia celular, as pesquisas com células-tronco são um marco nessa área que, de ferramenta para outros estudos, tornou-se a protagonista do desenvolvimento tecnológico mundial.

## 1.2. Tipos de culturas

Células em cultivo são um modelo de função fisiológica muito contraditório, devido à perda de características que ocorre durante o seu desenvolvimento em cultura. A proliferação *in vitro* difere daquela *in vivo*. Assim, por mais próximo que esse modelo esteja da realidade, o processo *in vitro* ainda causa problemas para o desenvolvimento celular. Sua adesão célula – célula e célula – matriz é reduzida, não possui as características (heterogeneidade e arquitetura tridimensional) de um tecido *in vivo*, uma vez que seu meio nutricional e hormonal está modificado.

Células que, num momento anterior, cresciam tridimensionalmente agora se encontram em um meio que favorece o espalhamento, a migração e a proliferação de células não especializadas que expressem diferentes funções. A

escolha do meio ideal é um caminho a se seguir para a obtenção de uma cultura que expresse uma função específica.

Apesar disso, ainda existem muitas vantagens no uso de cultura de células como modelo experimental. O controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia são as principais vantagens dessa técnica. Atualmente, com a implementação das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), a cultura de células é o principal modelo alternativo para a substituição dos animais em experimentos de pesquisa.

### 1.2.1. Células primárias, células estabelecidas e células transformadas

Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática. As células que conseguem sobreviver ao processo de desagregação e aderirem à garrafa formarão a primeira monocamada de células daquele tecido. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas **células primárias**. Essa forma de cultivo é a mais utilizada para estudar o comportamento de determinada célula *in vitro* devido à presença de suas características genótípicas e fenotípicas.

As células primárias que conseguem manter suas características originais possuem um tempo de vida curto. No organismo, a morte celular é um mecanismo para renovação tecidual. Essa morte é programada e não causa danos. Esse processo é denominado **apoptose**. Na apoptose, a célula não é rompida, ela simplesmente se “autodigere”, formando botões apoptóticos que são degradados.

À medida que a cultura é repicada, as células com uma maior capacidade de proliferação irão predominar na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram bem ao cultivo ou que, devido a traumas do processo de desagregação, não possuem uma taxa normal de proliferação.

Essas células ainda não perderam as características do tecido de origem, mas possuem alta proliferação. Esse tipo de célula é chamado **linhagem celular contínua**, e é muito utilizado em pesquisa, pois pode ser mantido em cultura por um grande período de tempo (quando comparado às células primárias) e ainda guarda grande parte das características do tecido original. Muitas linhagens celulares contínuas podem ser propagadas sem perder suas características por até oitenta passagens, além de serem euploides, ou seja, possuem um número de cromossomos múltiplo do número original da espécie. Essas células são muito utilizadas em pesquisa e na produção de vacinas, como é o caso da linhagem MRC-5, oriunda de tecido de pulmão de feto humano e utilizada na produção da vacina de rubéola.

No momento em que as características genéticas das células são modificadas, elas deixam de ser semelhantes morfológica e geneticamente ao tecido original e são então chamadas **células transformadas**. Tais células podem ser transformadas em cultura utilizando-se substâncias químicas, vírus ou agentes físicos como a luz ultravioleta.

A transformação celular é uma alteração genética que permite mutações em genes responsáveis pelo controle do ciclo celular (proto-oncogenes e genes supressores de tumor). A mutação pode resultar de uma superexpressão de proto-oncogenes ou da inativação de genes supressores de tumor. O principal reflexo dessa mutação é a presença da telomerase ativa. Durante a divisão, a célula perde um pedaço da porção final de seus cromossomos – o telômero. Esse processo é um tipo de controle para que a célula, ao “checar” se há possibilidade de divisão (*check point*), realize apoptose ao perceber que seu DNA está danificado a ponto de alterar alguma transcrição. A telomerase repõe o telômero perdido permitindo que a célula se divida indefinidamente sem que perca um pedaço de seu DNA codante. A proliferação exacerbada está diretamente ligada ao processo de transformação.

As células transformadas também podem ser obtidas diretamente de tecidos já mutados, como é o caso de tecidos tumorais. O exemplo mais famoso desse tipo de célula são as células HeLa oriundas de um tumor de cérvix uterina humana. As células HeLa são células genética e morfologicamente diferentes do tecido original, e não possuem dependência de ancoragem nem inibição por contato, além de serem capazes de proliferar infinitamente quando em cultura.

Essas células são muito utilizadas em estudos de citotoxicidade, controle de qualidade, entre outros. As células transformadas não são ainda amplamente utilizadas na produção de vacinas, em face do risco de o DNA alterado dessa célula alterar o DNA do indivíduo que fez uso dessa vacina. A única célula transformada usada na fabricação de vacinas é a célula VERO. Porém, existem controles rígidos quanto à quantidade de DNA celular residual presente em cada vial<sup>1</sup> da vacina. A OMS estabelece um limite de 10 ng de DNA por vial.

### 1.2.2. Células aderentes e células não aderentes

As células em cultura possuem, inicialmente, características semelhantes aos seus tecidos de origem. Assim, células provenientes de tecidos epiteliais terão uma maior dependência de interação célula – célula, enquanto células hematopoiéticas não necessitam de nenhuma interação.

As células cultivadas podem apresentar dois aspectos distintos, isto é, podem ser aderentes ou não aderentes, o que significa dizer que algumas células poderão se ligar ao fundo da garrafa de cultura enquanto outras ficarão em suspensão no meio. As **células aderentes** são oriundas de tecidos duros e, por isso, são dependentes de ancoragem, ou seja, necessitam de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a sua proliferação. Para as células aderentes, as garrafas de cultura devem possuir uma carga negativa. Essa

<sup>1</sup> Frasco de vidro com volume variado utilizado no armazenamento de produtos biológicos.

carga medeia a produção de proteínas de adesão e proteoglicanos que irão iniciar o processo de adesão da célula à superfície da garrafa. É a matriz extracelular que interage com a carga negativa da garrafa e, então, as células se ligam à matriz por receptores específicos. Nas células epiteliais ainda há a interação célula – célula mediada por moléculas de adesão célula – célula (CAMs) e pelas caderinas (dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$ ).

Quando em cultura, as células aderentes se espalham por todo o fundo da garrafa formando o que é chamado monocamada celular.

As células **não aderentes** podem ser cultivadas em suspensão no meio e são derivadas de tecidos que não necessitam de ancoragem para proliferar e sobreviver. Essa capacidade está restrita às células hematopoiéticas, às linhagens transformadas ou às células de tecido tumoral.

Figura 1. Linhagem MA 104 (rim de macaco-verde africano). Linhagem aderente.

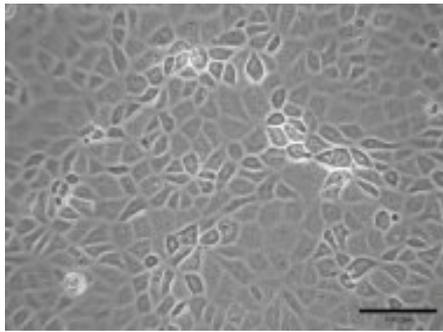
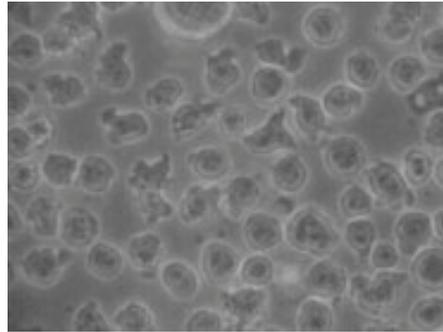


Figura 2. Linhagem MM6 (monocítica leucêmica humana). Linhagem não aderente.



Fonte: Fotos cedidas pelo Setor de Cultura de Células do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fiocruz.

## **2. Biossegurança aplicada a laboratórios de cultivo celular**

Como em qualquer atividade laboratorial, antes do início do cultivo celular, deve-se planejar o trabalho a ser realizado de modo a executá-lo com segurança.

Deve ser preparado um procedimento com as especificações das atividades realizadas e todo pessoal deve ser orientado sobre os possíveis riscos e para a necessidade de seguir as especificações de cada rotina de trabalho, os procedimentos de biossegurança e práticas de segurança.

Há, pelo menos, 24 casos documentados de infecção em funcionários de laboratório que manipulam culturas de células primárias (por exemplo, células de macaco *Rhesus*) nos últimos 30 anos.

Embora um número limitado de infecções adquiridas em laboratórios tenha sido relatado como resultado da manipulação de células humanas e de outros primatas, há um risco significativamente maior em adquirir uma infecção pelo HIV ou pelo HBV por meio da exposição ao sangue humano e a outros líquidos corporais.

Os riscos potenciais associados às células e tecidos humanos incluem os patógenos do sangue HBV e HIV, bem como agentes presentes nos tecidos humanos, como *Mycobacterium tuberculosis*, que pode estar presente nos tecidos pulmonares.

Outros riscos potenciais aos trabalhadores são representados pelo uso de células transformadas por agentes virais, como o SV-40, assim como as células que carregam material genético viral. As células humanas tumorigênicas também podem oferecer riscos potenciais como resultado de uma autoinoculação.

Além do risco biológico, um laboratório de cultivo celular possui os riscos:

- químicos – líquidos combustíveis, corantes tóxicos (azul de Tripan, MTT, bis-benzimida), gases tóxicos;
- físicos – calor, radiação, vibração e frio.

### 2.1. Barreiras de contenção no trabalho em cultura de células

Antes de iniciar os procedimentos de manipulação, o pesquisador, ou técnico, deve usar guarda-pó limpo ou descartável, gorro, máscara cirúrgica e sapatilha, como contenção primária. Lavar as mãos e a parte anterior do antebraço com água e sabão, preferencialmente antisséptico, realizar antissepsia das mãos com álcool 70% (v/v) e calçar luvas cirúrgicas. Tais procedimentos são muito importantes para a manipulação de células. O profissional não deve usar anéis, pulseiras, relógios ou outros ornamentos durante as manipulações.

Células animais devem ser manipuladas usando-se as práticas e a contenção do nível de biossegurança 2. O trabalho deve ser realizado em cabine de segurança biológica, e todo o material deverá ser descontaminado antes do descarte. A contenção secundária é obtida mediante a combinação de elementos relacionados à infraestrutura laboratorial.

### 2.2. Infraestrutura laboratorial

A organização de um laboratório voltado à pesquisa com células depende da sua finalidade e do número de pessoas que nele vão trabalhar. De maneira geral, o laboratório necessita dos seguintes espaços:

- área para lavagem e esterilização;
- área para preparo de meios;
- área para incubação e observação das culturas;
- área para manipulação asséptica das culturas.

As diversas áreas devem estar funcionalmente distribuídas, facilitando o deslocamento de pessoal e o fluxo de materiais, com a menor circulação possível nas áreas de manipulação asséptica das culturas.

A área destinada a manipulações, onde se localizam as cabines de fluxo, deve ser preferencialmente fechada e muito limpa. Deve-se trabalhar com avental limpo, exclusivo para uso nessa sala.

A superfície das bancadas deve ser impermeável à água e resistente a ácidos, álcalis, solventes orgânicos e a calor moderado. As instalações devem ser desenhadas de modo a permitir espaços entre as bancadas, equipamentos e cabines, que devem permitir fácil limpeza.

Os equipamentos necessários também dependem das finalidades do laboratório. Em geral, o laboratório necessita de:

- estufa incubadora com atmosfera de  $\text{CO}_2$ ;
- autoclave;
- deionizador de água;
- estufa para secagem de material;
- cabine de segurança biológica (câmara de fluxo de ar laminar estéril);
- medidor de pH;
- balança analítica;
- geladeira;
- freezer;
- microscópio invertido;
- agitador magnético;
- centrífuga refrigerada;
- banho-maria;
- bomba de vácuo.

Para trabalhos com culturas de células, inúmeros instrumentos são necessários, tais como: câmara para contagem, pipetador automático, micropipetas, estante para tubos, além de uma variedade de vidrarias e reagentes necessários para preparo de meios de cultura e soluções.

As salas devem ser sinalizadas com símbolo universal de risco biológico, com acesso restrito à equipe técnica de apoio.

### 2.3. Limpeza, desinfecção e esterilização

A superfície da área de trabalho deve sempre ser limpa, utilizando-se álcool a 70% (v/v), uma vez por dia ou após cada atividade. O álcool etílico a 70% (v/v) é um excelente desinfetante por sua ação de limpeza ou detergente, sendo eficaz também na redução da flora bacteriana da pele. Suas propriedades desidratante e desnaturante de proteínas podem ser responsáveis por sua ação antimicrobiana.

A água sanitária comercial (2% a 5% de cloro) é, também, um bom desinfetante quando diluída de 5 a 10 vezes, por ser um agente oxidante e agir sobre os constituintes da membrana, levando os microrganismos à morte.

Todo material aquecido no banho-maria, como meios de cultura e soluções, deve ter processo prévio de assepsia antes de sua introdução na cabine de segurança biológica. Deve-se, ao retirar o material do banho-maria, remover o excesso de umidade com auxílio de uma gaze e posterior limpeza com álcool 70% (v/v).

Antes de se iniciarem os procedimentos, a câmara interna do fluxo deve ser limpa com gaze embebida em álcool etílico 70% (v/v). O fluxo de ar, assim como a lâmpada de ultravioleta devem ser ligados trinta minutos antes do uso. Todo material deve ser limpo com álcool etílico a 70% (v/v) antes de ser introduzido na câmara. Após o término dos procedimentos, deve-se realizar a limpeza da câmara interna, removendo possíveis sujidades. Manter o intervalo

de pelo menos vinte minutos, com o fluxo de ar e a lâmpada de ultravioleta ligados, antes de iniciar outro procedimento ou encerrar as atividades. Realizar avaliação e monitoramento ambiental da cabine pelo método de exposição de placas, tal como descrito no item “controle microbiológico de ambientes e processos”.

#### **2.4. Controle microbiológico de ambientes e processos**

○ trabalho com cultivos celulares exige uma série de cuidados para se reduzirem os riscos de contaminação. As técnicas assépticas reduzem a probabilidade de infecção, sendo importante que sejam mantidas a todo momento: antes, durante e ao término do experimento. A necessidade de manutenção da assepsia inclui uma série de procedimentos que vão desde a esterilização dos meios de cultura e instrumentos, até a adoção de quarentena para os cultivos novos. Isso porque as células são cultivadas em meios ricos em nutrientes e a possibilidade de ocorrer propagação de microrganismos contaminantes é alta.

As culturas, assim como todos os resíduos da manipulação, devem ser descontaminadas, antes do descarte, em autoclave durante uma hora a 121°C. Culturas contaminadas não devem ser abertas para lavagem antes da descontaminação. Esse material deve ser retirado do laboratório imediatamente em recipientes rígidos e à prova de vazamentos.

Deve-se controlar a temperatura e a umidade para evitar o crescimento de microrganismos no ambiente. A climatização de uma sala de 15m<sup>2</sup> (45m<sup>3</sup>) pode ser feita por um aparelho de ar condicionado de 15.000 BTUs, levando-se em conta que existe o aquecimento produzido pelos equipamentos.

○ monitoramento microbiológico da sala, bem como das cabines de segurança biológica para o cultivo de células, pode ser realizado pela pesquisa de microrganismos, como fungos e bactérias. Um procedimento rotineiro indicado para controle ambiental é o método de exposição de placas com meios

nutritivos ágar caseína de soja (*trypticase soy agar-TSA*) e ágar sabouraud 4% de glicose (Sab4).

O laboratório deve possuir um programa rotineiro adequado de controle de insetos e roedores. Todas as áreas que permitam ventilação deverão conter barreiras físicas para impedir a passagem de insetos ou outros animais.

### **3. Técnicas/conceitos para cultivo celular**

#### **3.1. 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 ( $\text{Cr}^{+4}$ ). 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.

### **3.2. Manutenção das culturas: propagação e criopreservação**

#### **3.2.1. 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.

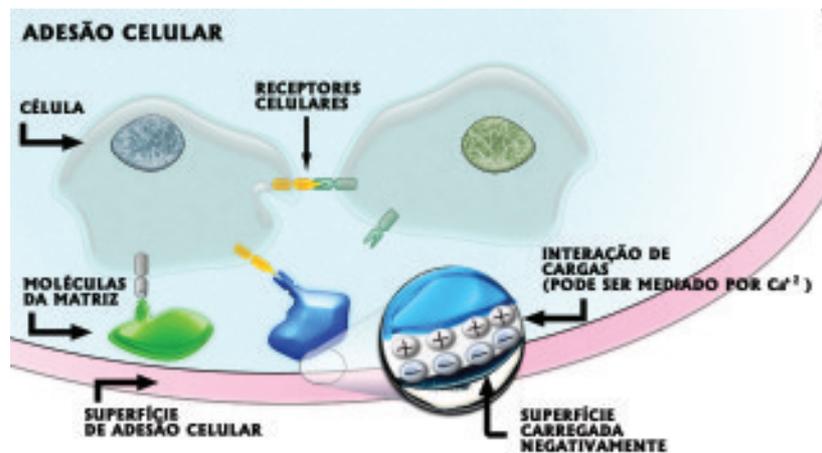
As células aderentes possuem um método específico para efetuar a sua passagem, por se encontrarem aderidas ao fundo da garrafa de cultivo. Para que as células aderentes possam se ligar ao fundo da garrafa é necessário que o fundo tenha uma carga negativa. Superfícies como vidro e metal, que possuem uma 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  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ . 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, “espraiair” 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.

Figura 3. Adesão celular medida 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 macrófágicas 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.

### 3.2.2. 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.

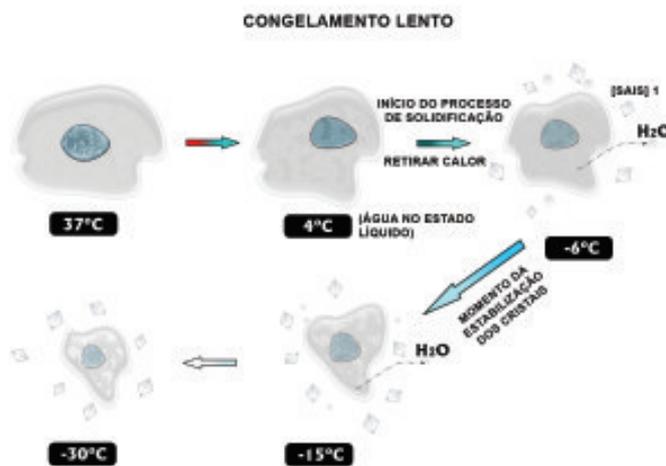
Manter células congeladas significa atrasar, em anos, quaisquer alterações que poderiam ocorrer quando em cultura. Tais alterações são dispensáveis para os laboratórios de cultura de células e os grandes bancos mundiais fornecedores de linhagens.

As células em cultura geralmente são congeladas em nitrogênio líquido em uma temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ . 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.

Figura 4. 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 fosfolipídeos de membrana, estabilizando-a no momento do congelamento.

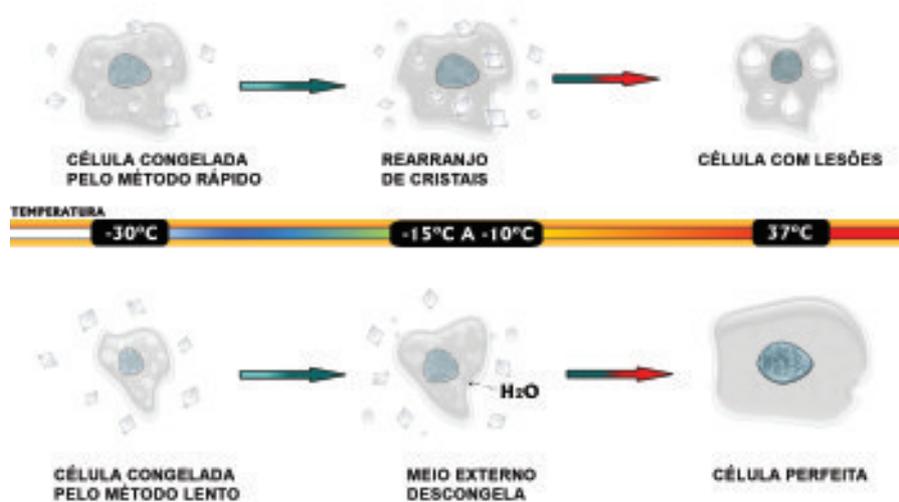
O DMSO é uma molécula sem carga real, mas que possui um momento dipolar. Sua ação está relacionada à interação da molécula com as membranas fosfolipídicas e com o ambiente externo à membrana. Assim, durante um congelamento, a molécula impede fases de transmissão dos lipídeos de membrana que chegam a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

### 3.2.3. 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.

Figura 5. 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.

### **3.3. Quantificação celular**

Quando se trabalha com experimentos que necessitam do uso de células em cultura é necessária a avaliação constante das células. Uma das formas de se avaliar o crescimento celular é utilizando-se métodos de quantificação celular. Quantificar uma cultura significa dizer quantas células se encontram em determinada garrafa de cultivo.

A quantificação é utilizada para definir a viabilidade celular, as condições de crescimento e o início de experimentos nos quais o número de células utilizado deve ser preciso.

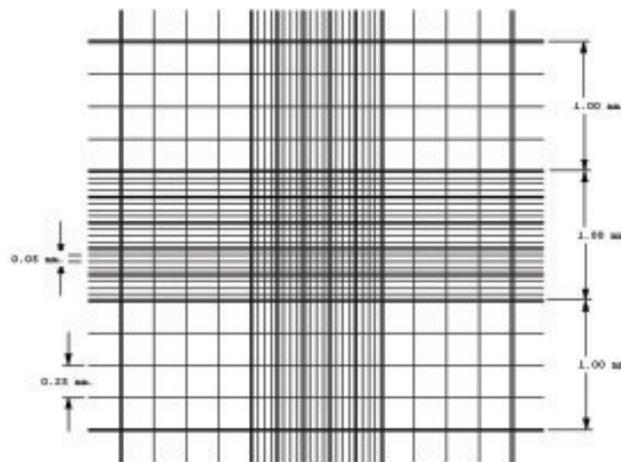
Existem duas maneiras de se quantificar células em cultura. Na forma direta, conta-se diretamente o número de células presente na garrafa de cultivo; a forma indireta é feita por meio da quantificação de determinadas estruturas celulares, como proteínas, ou pela medição do metabolismo celular.

Como forma de quantificação direta, o método mais utilizado é a contagem em câmara de Neubauer. No método indireto existem muitas técnicas baseadas no metabolismo celular ou até mesmo na dosagem de macromoléculas presentes na célula, como as proteínas ou o DNA.

Para a contagem em câmara de Neubauer, as células devem estar totalmente individualizadas. Para células aderentes, é necessário fazer uma tripsinização prévia, o que não é feito no caso de células não aderentes.

A câmara de Neubauer é uma lâmina de vidro com divisões que auxiliam na contagem, possuindo 9 quadrados que medem  $1 \text{ mm}^2$  de área. O esquema de uma câmara ao microscópio ótico se encontra na Figura 6. Somente os quatro quadrados externos são utilizados na contagem de células animais. Cada quadrado externo é formado por mais 16 quadrados menores que auxiliam a contagem.

Figura 6. Esquema da câmara de Neubauer.



Para a contagem, é necessário colocar uma lamínula de vidro sobre a câmara, que servirá para conter a suspensão celular. O espaço formado entre a lamínula e a câmara é de  $0,1 \text{ mm}$ . Dessa forma, o volume determinado por cada quadrado é equivalente a  $0,1 \text{ mm}^3$ . As células contadas em um quadrado contidas em  $1 \text{ mL}$  equivalem ao valor de células contado multiplicado por  $10^4$  (fator de correção da câmara).

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

$$\frac{Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4}{4} \times 10^4 \times \text{fator de diluição} = n^\circ \text{ de células / mL}$$

Para não ocorrer a contagem de uma célula mais de uma vez, deve-se fazer uma marcação em forma de “L” nos quadrados, para que, ao aparecerem células em cima das linhas, se contem somente as que estiverem sobre a marcação.

Para a análise de viabilidade celular utiliza-se o corante azul de Trypan, que não atravessa membranas íntegras. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas têm suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul.

Entre os métodos de contagem indireta mais utilizados estão o teste de brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio (MTT) e o ensaio de coloração por Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBBR – 250).

A coloração por CBBR-250 se baseia na capacidade do corante de corar proteínas celulares. Assim, faz-se uma curva padrão com concentrações celulares conhecidas e também as leituras das amostras de cultura. Para isso, deve-se corar a cultura e depois eluir a solução corante, sendo lida em espectrofotômetro.

O ensaio do MTT se baseia na redução do MTT, um sal tetrazólico, pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis para formar como produto o azul de Formazan. O ensaio mede a respiração celular, que é proporcional à quantidade de Formazan produzida, e ao número de células viáveis em cultura. A vantagem desse método é a contagem somente do número das células viáveis, o que não ocorre com o método de CBBR – 250.

### **3.4. Conceitos básicos e controle da qualidade de cultivos celulares**

Para a caracterização de células em cultivo é necessária a observação de vários aspectos, como a descrição do histórico da célula, incluindo sua origem (órgão, tecido, idade, sexo e espécie do doador), e a metodologia utilizada para obtê-la, histórico de passagens, meios de cultura usados e passagem em animais.

Testes como cariotipagem, análise de isoenzimas e *DNA fingerprinting* (impressão digital genética) servem como identificadores da espécie da linhagem celular, além de indicarem se há contaminação daquela cultura por outra célula humana ou animal.

É importante enfatizar que a autenticação celular é uma parte essencial no controle de qualidade de um cultivo, tanto para fins de pesquisa quanto para fins comerciais, devendo ser uma preocupação contínua e importante para qualquer laboratório de cultura de células.

Além de identificá-la, é importante avaliar se a célula está contaminada por fungos, bactérias, micoplasmas ou vírus.

#### 3.4.1. Cariotipagem

A análise cromossômica de uma célula é um dos principais critérios utilizados na identificação de uma linhagem, pois relaciona a linhagem em cultivo a uma determinada espécie e sexo.

O método de cariotipagem é um exame citogenético que verifica o estado do cariótipo das células. Sua análise é feita por meio de várias colorações que evidenciam partes dos cromossomos. Por meio de análises visuais destes cromossomos e com auxílio de atlas de cariótipos é possível associar determinado mapa cromossomial de uma linhagem a uma espécie e ao sexo do indivíduo.

Para a cariotipagem, é necessária a interrupção da proliferação celular das células em cultivo no momento da metáfase utilizando-se a colchicina. A colchicina é uma substância que inibe a polimerização das proteínas do fuso mitótico, parando a divisão celular em metáfase, fase em que os cromossomos se encontram mais condensados, facilitando a sua observação ao microscópio e a análise do cariótipo.

A cariotipagem ainda permite verificar se a célula é normal ou transformada, já que o perfil genético de uma célula transformada é muito alterado quando comparado ao perfil genético do indivíduo de origem.

### 3.4.2. Análise de isoenzimas

O termo isoenzima define um grupo de várias formas moleculares da mesma enzima originário de uma espécie, resultante da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas.

Assim, para utilizar isoenzimas como forma de identificação celular, deve-se obter um perfil enzimático chamado zimograma, no qual as enzimas correm em um gel de eletroforese e seu perfil de corrida é avaliado por técnicas histoquímicas.

Diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico resultam de diferenças em nível de sequências de DNA, que codificam tais enzimas, e de sua estrutura molecular. Assim, se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que estas diferenças tenham base genética e sejam herdáveis.

A análise de isoenzimas em culturas de células de tecido humano pode ser utilizada para a identificação entre dois indivíduos, devido ao polimorfismo do genoma humano, pois cada indivíduo terá o seu próprio perfil isoenzimático.

As principais enzimas utilizadas na caracterização de células humanas em cultura são a purina nucleosídeo fosforilase (NP), a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a lactato desidrogenase (LDH).

### 3.4.3. DNA fingerprinting

O DNA contém regiões que não são aparentemente transcritas. A função dessas regiões ainda não está descrita, mas acredita-se que existam regiões que possam ser utilizadas pelo DNA, caso houvesse algum tipo de evolução do indivíduo.

Essas regiões não são conservadas e possuem uma alta variabilidade entre os indivíduos, podendo ser utilizadas como marcadores de identificação individual, pois são específicas de um determinado indivíduo e diferem entre si na mesma espécie.

Enzimas de restrições são utilizadas para cortar segmentos que podem ser hibridizados com sondas e analisados por eletroforese. O perfil obtido é específico de um indivíduo, assim como sua impressão digital. Devido à especificidade dessa técnica, idealizada por Jeffreys e colaboradores em 1985. Ela foi denominada *DNA fingerprinting* e atualmente é a principal ferramenta utilizada para a identificação exata e precisa de determinada linhagem celular. É uma técnica muito utilizada para detectar a contaminação cruzada entre duas células em cultura.

### 3.5. Ciclo celular e fases de crescimento celular

#### 3.5.1. Ciclo celular

A análise do ciclo celular é o primeiro passo para a compreensão das vias de ativação e proliferação das células, sendo necessário o conhecimento das fases do ciclo celular. A sequência ordenada de eventos, durante a qual o DNA é replicado e proteínas são sintetizadas e depois dividem a célula em duas, constitui um ciclo conhecido como ciclo celular.

O ciclo celular eucariótico é tradicionalmente compreendido em dois períodos principais: a **interfase** e a **mitose** (M). Um ciclo de 16 horas em células de mamífero em cultura é dividido nos períodos ( $G_1$ , S,  $G_2$  – interfase):

**$G_1$**  (duração de 5 horas): crescimento e preparação para a replicação dos cromossomos;

**S** (duração de 7 horas): síntese de DNA (replicação);

**$G_2$**  (duração de 3 horas): preparação para a divisão mitótica;

**M** (duração de uma hora): separação das cromátides e constituição de dois núcleos idênticos.

Após a mitose as células filhas podem:

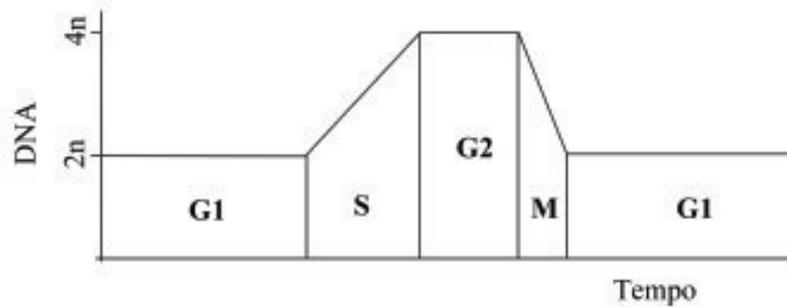
- iniciar nova fase de síntese após uma fase pós-mitótica de duração normal; ou
- entrar numa fase pós-mitótica prolongada permanecendo num estado de quiescência e, se devidamente estimuladas, podem mais tarde ingressar em ciclo no fim de G1.

A regulação adequada do ciclo celular, com o controle correto da síntese de substâncias reguladoras (*ciclina dependentes de quixases - CDK*) e inibidoras (inibidores de CDK), é fundamental para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares. Uma falha nesse controle pode acarretar uma superprodução desnecessária de células, frequentemente com resultados maléficis, como a formação de tumores (câncer).

A dinâmica do processo de divisão celular é muito complexa. Ela ocorre por meio de uma série de eventos e processos nucleares e citoplasmáticos de forma coordenada e possui mecanismos de controle rigoroso envolvendo genes e proteínas regulatórias que atuam em diferentes etapas do ciclo celular.

Em cultura, as células de uma população normalmente apresentam-se em diferentes fases de ciclo celular. Se todas as células de determinada população estivessem na mesma etapa do ciclo celular, essa população estaria em sincronismo celular. Uma variedade de técnicas e substâncias pode sincronizar células em fases específicas do ciclo celular. Por exemplo, o arraste reversível de células em G1 pode ser obtido com a dedução de soro ou aminoácido isoleucina; e o inibidor de microtúbulos, o nocodazol, é empregado para sincronizar células na mitose.

Figura 7. Gráfico da quantidade de DNA variando ao longo do ciclo celular.

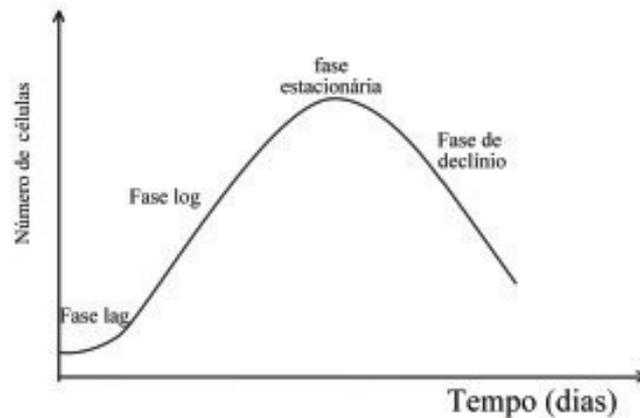


### 3.5.2. Fases do crescimento celular

Células normais em cultura possuem um padrão de crescimento representado por uma curva sigmoide (Figura 8) denominada curva de crescimento. Essa curva reflete as fases de adaptação das células às condições ambientais, à disponibilidade de nutrientes e ao suporte de ancoragem necessários para promover a produção de novas células.

A determinação da curva de crescimento é importante para a caracterização de uma cultura de células. A biologia celular modifica-se em cada fase da curva, sendo importante o controle do estágio em que as células serão coletadas, quando será realizado o repique da cultura, ou quando novos nutrientes serão adicionados.

Figura 8. Curva de crescimento celular padrão de células normais



A curva de crescimento de células em cultura é dividida nas seguintes fases de crescimento:

- **Fase lag** – período de adaptação no qual não ocorre proliferação após adição das células ao meio de cultivo. A duração da **fase lag** depende da densidade celular e do estágio de crescimento da cultura, podendo se estender de horas a alguns dias. Nesse período há produção de proteínas estruturais e enzimas, com aumento na síntese de DNA. Nesse período ocorre intensa atividade metabólica.

- **Fase log** – fase logarítmica ou exponencial, período no qual a multiplicação celular é máxima e constante. É a fase de maior viabilidade e atividade metabólica das células e, por isso, é o melhor período para estudo e experimentação. Nesta fase é determinado o tempo de duplicação, sendo a velocidade de proliferação característica para cada linhagem.

- **Fase estacionária ou plateau** – a velocidade de crescimento diminui, o número de morte celular tende a ser equivalente ao número de células novas, e a atividade metabólica decresce. Para algumas linhagens, a fase estacionária pode ser estendida se o meio for renovado.

- **Fase de declínio ou morte celular** – há redução drástica do número de células e o número de células mortas excede o de células novas.

A construção da curva de crescimento é importante para a manutenção da rotina e para saber o número de células depois de determinado o intervalo de tempo. Permite a caracterização de certos parâmetros próprios de uma população sob determinadas condições de cultivo.

Linhagens primárias e permanentes possuem curvas de crescimento diferentes; as linhagens permanentes podem ser mantidas indefinidamente, enquanto as linhagens primárias morrem após algumas gerações.

### 3.6. Principais agentes contaminantes em cultura de células

Manter a assepsia em cultura é algo muito difícil. O material esterilizado erroneamente, a manipulação sem cuidado e, principalmente, a falta de higiene e de vestimenta correta dos manipuladores podem causar contaminação de uma cultura.

Bactérias, fungos, leveduras e micoplasmas são os principais contaminantes das culturas celulares.

Em casos de contaminação, é importante avaliar onde a célula foi cultivada, quais os meios e soluções utilizados e qual técnico fez a manipulação. Isso impede que, em caso de contaminação pontual, esta se espalhe para outras culturas do laboratório, além permitir a investigação dos principais motivos da contaminação, a fim de eliminá-la.

#### 3.6.1. Contaminação bacteriana

As bactérias são organismos procariontes com capacidade de proliferação muito rápida e que, na maioria das vezes, conseguem crescer em qualquer condição. Elas estão presentes no ar, nas superfícies, no trato digestivo humano etc.

Uma contaminação bacteriana na cultura inviabiliza a sua utilização, visto que elas competem pelos nutrientes do meio fazendo com que as células morram pela falta de alimento. Além disso, metabolizam o meio de forma a torná-lo excessivamente ácido para determinadas linhagens.

As bactérias, por crescerem muito mais rápido que as células animais em cultura, especialmente em meios muito ricos, como os de cultivo de células animais, têm sua visualização ao microscópio ótico facilitada, e a contaminação é facilmente detectada. Para isso, é necessário que o cultivo ocorra em meio livre de antibióticos, para não haver mascaramento do crescimento da contaminação em cultura. A esterilidade deve ser garantida pela qualidade das soluções e do material utilizado e pelo bom treinamento dos técnicos.

### **3.6.2. Contaminação por micoplasma**

Micoplasmas são contaminantes comuns de culturas de células, microorganismos procariotos desprovidos de parede celular que possuem uma membrana lipídica em bicamadas, imperceptíveis na visualização por microscópio ótico invertido.

De difícil localização por se aderir à membrana da célula, o micoplasma é prejudicial, pois retira do meio os nutrientes necessários, em particular a arginina. O metabolismo dos micoplasmas é, em parte, dependente do metabolismo celular.

Para detectar micoplasmas, pode-se utilizar o teste de coloração fluorescente Hoescht 33258, que cora DNA. Assim, ao observarmos uma cultura contaminada em microscopia de fluorescência é possível visualizar o núcleo da célula e o seu contorno, que é formado pelo material genético dos micoplasmas aderidos à membrana.

Contaminar uma cultura com micoplasmas é muito fácil, pois eles se encontram na via respiratória humana; porém, a descontaminação envolve a

utilização de antibióticos, como ciprofloxacina e kanamicina associada à tetraciclina, extremamente prejudiciais à célula, e, havendo posterior “febre”, com o aumento da temperatura de 37 °C para 41 °C. Isso diminui o número de células viáveis, e o processo nem sempre é um sucesso.

### 3.6.3. Contaminação por leveduras

Leveduras são fungos unicelulares muito comuns em cultura. Caracterizam-se por serem menores do que as células animais. Multiplicam-se principalmente por brotamento, formando na cultura estruturas características na forma de esferas menores anexadas a esferas maiores.

## 4. Meios de cultura e soluções utilizadas em cultivos celulares

Os meios nutritivos (meios de cultura ou de cultivo) utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam o crescimento *in vitro*.

As mesmas vias metabólicas e bioquímicas básicas no organismo são consideradas nas células cultivadas. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais específicas das células. Sendo assim, os meios de cultura devem apresentar em sua formulação sais minerais, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, proteínas, peptídeos, lipídeos e ácidos graxos (ver Tabela 1). Costuma-se adicionar também soros, tampões, antibióticos e indicadores de pH.

Os meios de cultivo foram estabelecidos a partir de 1950, com várias formulações de meios que proporcionassem o crescimento celular *in vitro*. Os meios de cultura, tais como o meio 199 de Morgan e colaboradores de 1950, o meio CMRL, de Parker e colaboradores de 1957, e os meios basais de Eagle de 1955 e 1959, são utilizados hoje.

Foram elaborados, também a partir de 1950, alguns meios de cultura mais complexos, com o intuito de eliminar a utilização de fluidos animais, como o meio NCTC 109, desenvolvido por Evans e colaboradores a partir 1956. Esses meios livres de soro devem fornecer todos os fatores que as células em cultura necessitam, tais como: metais traço, vários suplementos e fatores de crescimento, insulina, transferrina, hormônios, dentre outros. A exigência desses fatores e a complexidade do meio variam de acordo com o tipo celular a que se destina e, por ser altamente específico, em muitos casos precisa ser adaptado para cada tipo celular. Devido à sua complexidade, esses meios são muito dispendiosos, e utilizados apenas para fins específicos.

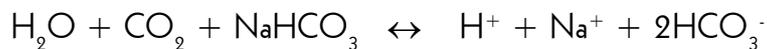
Tabela 1. Tabela de componentes básicos de um meio típico.

aminoácidos	vitaminas	sais	outros	proteínas (necessárias em meios sem soro quimicamente definidos)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arginina</li> <li>• Cistina</li> <li>• Glutamina</li> <li>• Histidina</li> <li>• Isoleucina</li> <li>• Leucina</li> <li>• Lisina</li> <li>• Metionina</li> <li>• Fenilalanina</li> <li>• Treonina</li> <li>• Triptofano</li> <li>• Tirosina</li> <li>• Valina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biotina</li> <li>• Colina</li> <li>• Folato</li> <li>• Nicotinamida</li> <li>• Pantotenato</li> <li>• Piridoxal</li> <li>• Tiamina</li> <li>• Riboflavina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NaCl</li> <li>• KCl</li> <li>• <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math></li> <li>• <math>\text{NaHCO}_3</math></li> <li>• <math>\text{CaCl}_2</math></li> <li>• <math>\text{MgCl}_2</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicose</li> <li>• Penicilina</li> <li>• Estreptomina</li> <li>• Vermelho de fenol</li> <li>• Soro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insulina</li> <li>• Transferrina</li> <li>• Factores específicos de crescimento</li> </ul>

Para escolher o meio de cultivo adequado ao de uma determinada linhagem, consulta-se primeiro a literatura e as referências de bancos oficiais.

No sistema de cultivo de células, é importante o controle do pH ótimo (7,0-7,6), utilizando para isso tampão e o suplemento do meio de cultivo que resiste às variações do pH, principalmente na **fase lag** do crescimento celular. Na fase **lag** do crescimento celular, ou em baixa densidade celular, a tensão de CO<sub>2</sub> deve ser mantida para controle do pH e, por isso, as culturas são mantidas em atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>.

Para compensar a diminuição do pH gerado pelos metabólitos do consumo da glicose, há a suplementação do meio com bicarbonato de sódio e manutenção do nível de CO<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> dissolvido em equilíbrio com íons bicarbonato gera um sistema de tamponamento no meio, como mostra a equação abaixo:



O composto HEPES (N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) e outros tampões orgânicos podem ser utilizados em culturas em que o tampão bicarbonato não é adequado. A sensibilidade da cultura pelo tampão varia, podendo até ser tóxica para as células. Portanto, deve-se ser criterioso na escolha do melhor tampão e da sua concentração.

Antibióticos e fungicidas são utilizados nos meios nutritivos para controle da contaminação microbiológica. Com essa finalidade, os compostos mais utilizados são a gentamicina, a estreptomicina, a penicilina e a anfotericina.

É importante rotular, imediatamente, qualquer reagente ou solução preparada com etiquetas com as seguintes informações: nome da solução preparada, lote, data do preparo, prazo de validade, nome dos técnicos responsáveis e temperatura de estocagem. A temperatura adequada para os meios de cultura é de +4-8 °C.

#### 4.1. Controle da qualidade da água e reagentes

A água é o componente predominante na preparação dos meios e soluções, mas é uma fonte potencial de impurezas que podem afetar o crescimento de culturas *in vitro*. Para evitar contaminação por compostos orgânicos voláteis, que permanecem após a destilação e que inibem o crescimento das culturas, deve-se utilizar água classificada como ultrapura, que consiste num sistema de purificação por filtração com carvão ativo, colunas de troca iônica e filtros de acetato de celulose. Embora de custo elevado, a água é produzida com alto grau de pureza. No entanto, a água deionizada pode ser aplicada para o preparo da maioria das soluções.

Devem-se utilizar substâncias testadas para culturas de células e com alto grau de pureza. No rótulo, sempre que possível, deve constar o número do lote, o prazo de validade e as condições de estocagem. Deve-se utilizar tripsina na diluição 1:250, obtida de pâncreas suíno e testada em cultura de células. A L-glutamina é um aminoácido essencial e suplemento fundamental dos meios de cultura. Como a L-glutamina é degradada a 36,5 °C, ela deve ser adicionada a meios de cultura suplementados a mais de 15 dias.

#### 4.2. Soro fetal

Apesar da sua constituição química, os meios de cultivo são usualmente suplementados com 5% a 20% de soro, pois as células em cultura também necessitam de fatores de crescimento, hormônios, proteínas e peptídeos, nucleosídeos, lipídeos e inibidores que podem ser supridos por esse fluido animal.

Deve-se utilizar um soro fetal certificado, estéril, inativado a 56 °C por 30 minutos, livre de micoplasmas e sem endotoxinas. Atualmente, os soros estão disponíveis comercialmente e os mais utilizados em cultivos celulares são os soros de origem bovina, de cavalo e humano. O soro é obtido do plasma,

sob condições assépticas e estéreis, por punção cardíaca ou venosa. A coleta, a manipulação, o processamento e a estocagem são realizados visando-se manter as propriedades e qualidades do soro. A escolha do soro depende de requisitos de cada tipo celular, e um dos mais utilizados é o soro fetal bovino. No caso do soro fetal bovino, cada procedimento corresponde a uma partida, ou lote diferente.

As variações qualitativas e quantitativas dos componentes do soro podem interferir no crescimento das células em cultura. Dessa forma, a capacidade de possibilitar o crescimento celular deve ser avaliada para cada lote de soro adquirido. Cada lote deve ter um certificado com todos os dados dos testes bioquímicos e microbiológicos realizados, devendo ser testados para detecção de bactérias, fungos, *Mycoplasma* e agentes virais.

### 4.3. Sistema de filtração

Para substâncias orgânicas que não resistem ao processo de esterilização por autoclave, convém dispor-se de dispositivo para filtração por membranas. Algumas substâncias orgânicas são degradadas pelo calor, sendo lábeis à autoclavação, precisando ser esterilizadas com um filtro especial de acetato de celulose com porosidade inferior a  $0,22 \mu\text{m}$ . Uma reação que pode ocorrer durante a autoclavação é a caramelização (reação entre açúcares e aminoácidos) e a hidrólise da sacarose. Essas reações se intensificam com o aumento do tempo da autoclavação.

Assim, utiliza-se o processo de filtração, que consiste na passagem de líquido por membrana filtrante com pequenos poros que impedem a passagem de microrganismos. Filtros reutilizáveis podem ser esterilizados por autoclavação, sendo os descartáveis também muito utilizados e, apesar de mais caros, o processo é mais rápido e mais seguro.

A maioria das soluções estéreis de uso em cultura de células é preparada por filtração em membrana esterilizante de  $0,22\ \mu\text{m}$ . Contudo, algumas soluções podem ser esterilizadas por autoclavagem a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Utilizam-se também membranas de  $0,45\ \mu\text{m}$ , como pré-filtro para clarificar soluções menos lípidas.

Em câmara de fluxo laminar, a filtração é realizada com um sistema para filtração sob pressão com filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$  em volumes maiores que 10 L; para volumes entre 0,1 e 10 L esterilizam-se em sistema de filtração a vácuo com filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$  e, para até 100 mL, sistema de filtração por seringa com filtro de  $0,20\ \mu\text{m}$ .

Após a realização da filtração, é fundamental testar o material filtrado para verificar a eficiência do procedimento, por meio da realização de teste de esterilidade por inoculação direta do filtrado em meio de cultivo.

## **5. Aplicações dos cultivos celulares**

### **5.1. Produção de imunológicos**

Existem muitas aplicações para a cultura de células. As primeiras aplicações se relacionam com a produção de anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais têm sua maior aplicação nos imunoenaios, como o ELISA. Além disso, esses anticorpos também são muito utilizados associados a marcadores radioativos em imunocintilografia.

Os anticorpos monoclonais são produzidos em células denominadas hibridomas, que resultam da fusão de células de mieloma murino com linfócitos B produtores de um determinado anticorpo. As células do hibridoma são imortais e produzem anticorpos, assim como a sua precursora.

Várias proteínas diferentes de anticorpos comercializadas são produzidas a partir de cultura de células. Eritropoietina humana, fator VIII para hemofilia, dentre outras, são produzidas em células cultivadas, pois necessi-

tam de maquinário complexo para a sua produção que não é encontrado em células procariontes.

Uma aplicação importante da cultura de células em imunobiológicos se relaciona com a produção de vacinas. Para crescimento viral, é necessário o seu cultivo em células, pois os vírus se replicam em hospedeiros. A vacina de sarampo é produzida em culturas primárias de fibroblastos de embrião de galinha, enquanto a vacina de poliomelite, fabricada na França, em células de rim de macaco-verde africano (*cercopithecus aethiops*). Um dos grandes desafios da atualidade é a produção de vacinas em células de linhagens transformadas sem afetar o indivíduo que irá utilizá-las. Essas pesquisas estão em desenvolvimento e, em muitos casos, já estão sendo aplicadas. No Brasil, ainda não existem vacinas fabricadas em células transformadas, mas a célula Vero é alvo de pesquisas de muitas instituições.

## 5.2. Virologia

Na virologia, a cultura de células é muito utilizada para a obtenção viral. Como os vírus necessitam de hospedeiros, é na cultura de células que é possível cultivá-los.

A cultura de células permite o isolamento do vírus para avaliar o seu efeito em determinados tipos celulares, além de verificar quais células são suscetíveis a determinados vírus.

## 5.3. Terapia celular

O termo terapia celular identifica uma técnica com o objetivo de restabelecer a função ou a estrutura de um tecido por meio da utilização de células, e vem sendo utilizada no caso de traumas, doenças degenerativas ou agressões aos tecidos do corpo.

Para a terapia celular, é necessário ressaltar a importância do conhecimento da célula em seu ambiente original, pois informações sobre a estrutura do

microambiente celular são necessárias para a reprodução desses elementos em cultura.

Na bioengenharia, a estrutura tecidual é reproduzida o mais fiel possível àquela do tecido original, tanto em conteúdo de material presente quanto ao comportamento das células presentes. Dessa forma, seria possível a substituição dos tecidos danificados por novos tecidos formados em cultura, substituindo-se aquele que sofreu algum dano em determinado momento da vida do indivíduo. Uma aplicabilidade da bioengenharia é obtenção de células do próprio paciente para o cultivo e formação de tecido. Esse tecido é cultivado em laboratório, acrescido de fatores e do microambiente necessário à diferenciação e à formação tridimensional da célula, mimetizando o tecido original que, após um determinado período, é reimplantado no paciente, substituindo o tecido lesado.

Outro avanço na terapia celular é o uso de células-tronco no tratamento de doenças degenerativas. Células-tronco possuem alta capacidade de diferenciação e de proliferação sendo possível formar a partir delas células diferenciadas que exerçam funções específicas.

As células-tronco podem ser de origem embrionária (células-tronco embrionárias) ou de tecidos adultos (células-tronco adultas). As células-tronco embrionárias têm alta capacidade de replicação e de diferenciação; no embrião todo o organismo complexo será formado a partir destas células. As células-tronco adultas são células de proliferação modulada, quiescentes, que se mobilizam para estabelecer a reposição de células que morreram ou que se ativam e proliferam intensamente no momento necessário à regeneração de um tecido danificado.

**Para saber mais:**

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica*. São Paulo: Rocca, 2007. 503 p.

MANUTENÇÃO de linhagens de células animais. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Manual da qualidade*. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008.

PERES, C. M.; CURI, R. *Como cultivar células*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283 p.

FRESHNEY, R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 4. ed. Nova York: Wiley-Liss, 1994. 397 p.

VREMEULEN, K. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targents in Cancer. *Cell Proliferation*, n. 36, p. 131-149, 2003.