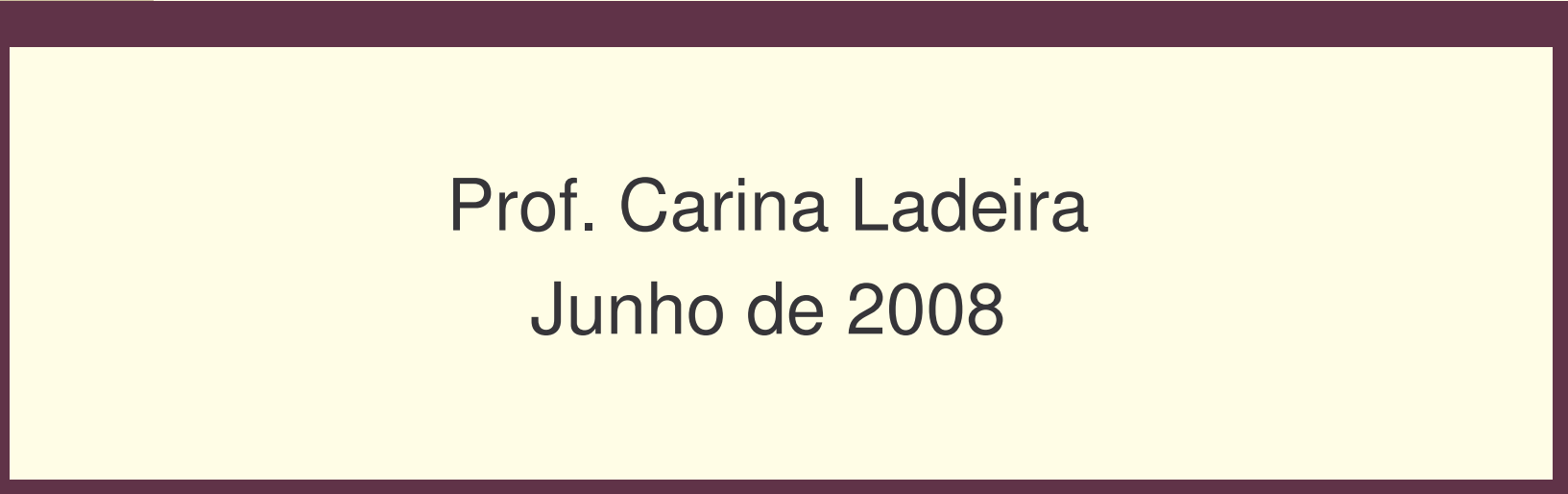






CULTURAS CELULARES



Prof. Carina Ladeira
Junho de 2008

Culturas Celulares

- O que são?
- Para que se utilizam e porquê?
- Limitações?
- Categorias celulares

Culturas Celulares

- Surgiram nos princípios do séc. XX como método de estudo do comportamento de células animais fora do organismo multicelular, livres de influências sistêmicas
- Inicialmente realizadas em tecido não desagregado
- Passado meio século expandiu-se a técnica da cultura de células dispersas
- No início foi usado tecido de anfíbio, depois foi transportado para a galinha e, finalmente, para o mamífero

Lista de células cultivadas

- Tecido conjuntivo: fibroblastos, cartilagem, osso
- Músculo: esquelético, cardíaco, liso
- Epitélios: diversas origens
- Células neurais: glia, neurónios
- Células endócrinas
- Melanócitos
- Células tumorais

Interesses de cultivar células

- Interesse médico
- Interesse científico
- Interesse industrial e ambiental
- Interesse social e ético

Interesse médico

- Produção de vacinas antivirais
- Compreensão de fenómenos neoplásicos
- Produção de anticorpos monoclonais
- Transformação de células humanas para produção de fármacos
- Amniocentese
- Cirurgia reconstrutiva (células epidérmicas e endoteliais)
- Manipulação genética de células para re-implantação
- Efeitos tóxicos farmacológicos

Interesses

Interesse científico

- Interações intercelulares
- Mecanismos de controlo de diferenciação celular/ desenvolvimento

Interesse Industrial e ambiental

- Efeito de certos poluentes ambientais

Interesse social e ético

- “Direito dos animais”: substituição parcial da experimentação animal (ex.: indústria de cosméticos)

Culturas de células - Vantagens

- Controlo das condições físico-químicas e fisiológicas
- Aumento da homogeneidade das células
- Factores económicos:



Exposição directa a reagentes:
concentração reduzida

Poupança no uso de animais

Cultura de células - Desvantagens

- Custo de esforço e material: produção de pouco material biológico
- “Desdiferenciação” e selecção das células: perda de características fenotípicas
- Rastreio das células: expressão de marcadores do tecido original
- Instabilidade ao longo das passagens: taxa de crescimento, n.º cromossómico, entre outros

Culturas de células - Limitações

- Perda de interações intercelulares
- Ausência de regulação pelos sistemas endócrino e nervoso
- Aspectos metabólicos

Categorias de culturas celulares

Culturas primárias



Desagregação mecânica ou enzimática do tecido
Purificação das células em estudo



a partir da 1ª passagem

Linhas celulares



Linhas seleccionadas para uma dada característica

Estirpes celulares



Clone Celular

(obtido a partir de uma única célula)

Categorias de culturas celulares

- **Linha celular finita** – n.º limitado de passagens (senescência)
- **Linha contínua ou imortalizada** – espontaneamente ou transformada (mutagénios, vírus, irradiação, entre outros)

Tipos de cultura

- **Cultura de órgãos** – arquitectura do órgão mantida
- **Cultura de explantes** – migração de células
- **Cultura celular** – possibilidade de passagem
- **Cultura histotípica** – reconstituição da estrutura tecidual
- **Cultura organotípica** – recombinação de diferentes tipos celulares
- **Cultura aderente** – células dependentes de “ancoragem”
- **Cultura em suspensão** – células dependentes de ancoragem (hematopoiéticas, algumas tumorais), facilidade de manipulação

Meios de cultura

As condições de cultura visam mimetizar o mais fielmente possível as condições em que as células se encontravam *in vivo*, tais como:

- Temperatura
- Osmolalidade
- Nutrição
- pH
- Oxigénio
- Dióxido de carbono

Meio de cultura básico

Objectivos

- Manutenção do pH (7.2-7.4) e osmolalidade



Vitalidade celular

- Fornecimento de nutrientes e fontes de energia



Crescimento

- Sobrevivência celular

Exemplos de meios: Eagle e derivados, Ham's F12

Meios - constituintes

- Solução salina equilibrada
- Tamponamento
- Fontes de energia
- Vitaminas
- Oligoelementos
- Antibióticos
- Outras substâncias

Solução salina equilibrada

- Sais inorgânicos (pH e pressão osmótica – meio isosmótico)

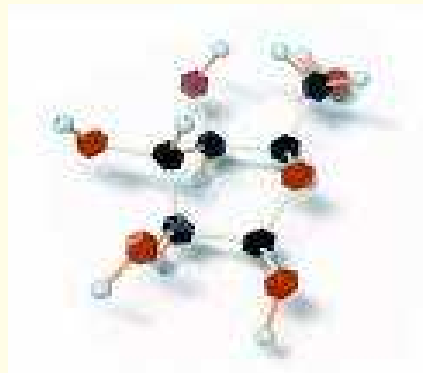


Tamponamento

- **Objectivo:** Compensar a produção de CO₂ e ácido láctico
- Bicarbonato de sódio: equilíbrio com o CO₂ dissolvido e na atmosfera da estufa
- Tampões orgânicos: independentes de CO₂ (ex. HEPES)
- Indicador de pH: vermelho de fenol

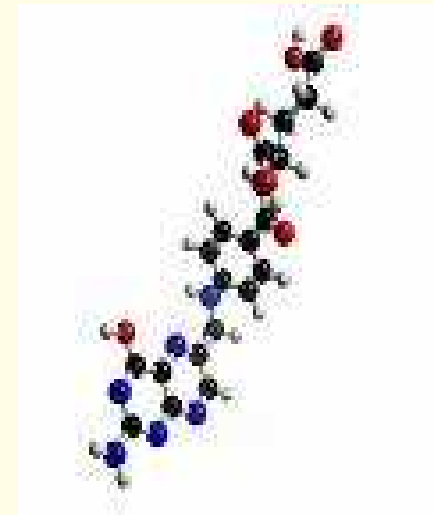
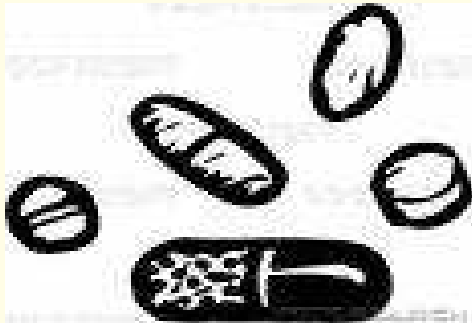
Fontes de energia

- Glucose
- Aminoácidos essenciais: arginina, isoleucina, metionina, glutamina



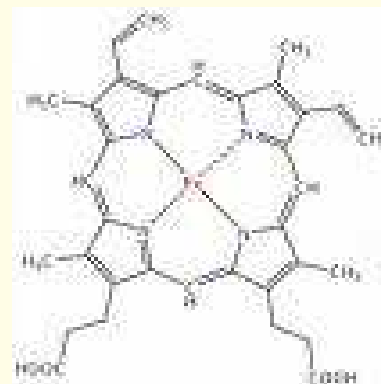
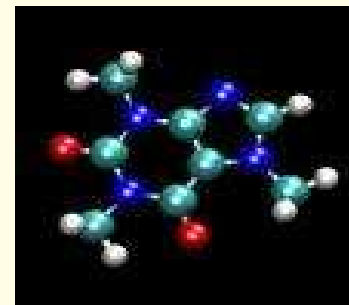
Vitaminas

- Vitamina B essencial para o crescimento
- Precursores de co-factores (biotina, ácido fólico, riboflavina)



Oligoelementos

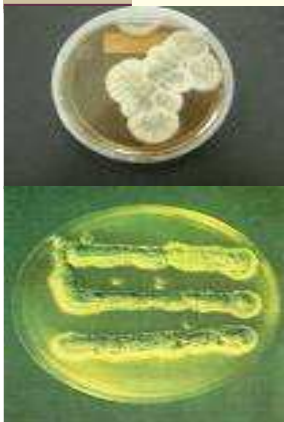
- Ferro
- Cobre
- Zinco
- Selénio



Antibióticos

De baixa toxicidade e espectro alargado

- Penicilina + estreptomicina
- Gentamicina



Outras substâncias

Substâncias a adicionar, principalmente na ausência de soro:

- Hormonas e factores de crescimento: insulina, hidrocortisona
- Proteínas e polipéptidos: fetuína, fibronectina, albumina, transferrina
- Ácidos gordos e outros lípidos

Soro

Constituintes:

- Factores de crescimento e hormonas
 - Proteínas transportadoras
 - Agentes protectores: anti-proteases
 - Factores de adesão celular: fibronectina, laminina
 - Nutrientes: aminoácidos, glucose
-
- Pré-esterilizado, testado e congelado
 - Inactivado pelo calor (56°C, 30'): destruição de proteínas

Soro - Vantagens

- Capacidade de estimular o crescimento das células
- Eficaz em muitos tipos celulares
- Minimização de efeitos tóxicos e perturbações do meio

Soro - Desvantagens

- Componentes e concentrações mal definidas
- Variabilidade de lotes
- Presença de anticorpos
- Riscos de contaminação (BSE)
- Introdução de dificuldades experimentais acrescidas

Outras soluções necessárias

- **Água**

Contaminantes inorgânicos (metais) e orgânicos (produtos provenientes de algas e micróbios)

Maior pureza possível
(desionização+destilação+filtração)

- **Soluções salinas**

Meios de lavagem

Ex.: Earle's BSS, Dulbecco's PBS, Hank's BSS

- **Enzimas**

Proteolíticos

Tripsina com ou sem EDTA

Contaminações

- Inexperiência
- Omissão de etapas na técnica asséptica
- Ambiente (pó, humidade, operador, animais)
- Causa recorrente (verificação do equipamento e stocks)

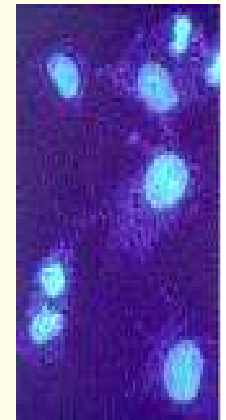
Detecção de contaminações

- Mudança repentina de pH
- Meio turvo
- Observação em MOC (bactérias, fungos e leveduras)
- Observação em ME (vírus)
- Testes de esterilidade
- Deterioração das condições de cultura, alteração do metabolismo celular

Mycoplasma



Microorganismos cujo tamanho e complexidade os situa entre as bactérias e os vírus. São os menores organismos de vida livre conhecidos.



Procedimentos de rotina

- Sementeira
- Passagem
- Teste de viabilidade
- Contagem
- Congelação
- Descongelação

Culturas de células epiteliais

- As células epiteliais são muitas vezes responsáveis pelas funções dos órgãos, tais como: absorção no rim, secreção no fígado e pâncreas e trocas gasosas no pulmão
- São também muito interessante como modelos de diferenciação e cinética de células estaminais (especialmente os queratinócitos) e também porque são os tecidos mais comuns em situações de cancro

Culturas de células epiteliais

- Devido a estas razões, as células epiteliais tem sido foco de atenção durante vários anos
- O maior problema deste tipo de culturas é o crescimento de tecido conjuntivo
- Para prevenir este crescimento devem ser efectuadas alterações a nível nutricional

Culturas de células epiteliais

- Epiderme
- Mama
- Cóló do útero
- Tracto gastrointestinal
- Fígado
- Pâncreas
- Rim
- Traqueia
- Brônquio

Células mesenquimatosas

- Incluem as células que derivam da mesoderme embrionária, excluindo o sistema hematopoiético
- Exemplos de culturas de células da mesoderme:
 - Tecido conjuntivo
 - Tecido adiposo
 - Tecido muscular
 - Cartilagem
 - Osso

Células neuroectodermais

- Células que derivam das células da neuroectoderme embrionária

Exemplos de culturas:

- Células da glia
- Células endócrinas

Outros tipos de culturas celulares

- Células hematopoiéticas
- Macrófagos
- Gonádas
- Teratomas
- Tecidos tumorais

RESUMO

- Culturas celulares
- Interesses de cultivar células
- Vantagens, desvantagens e limitações
- Categorias e tipos de cultura
- Meios
- Soro
- Diferentes tipos de culturas