



Princípios de Cultivo Celular

Disciplina de Engenharia Tecidual

Fernanda Nedel
fernanda.nedel@gmail.com

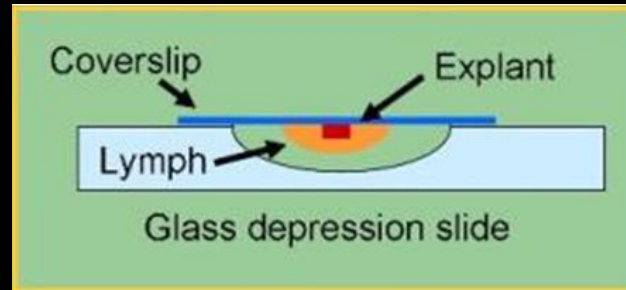
Pelotas, 2011



118 The Anatomical Record June 1, '07.
OBSERVATIONS ON THE LIVING DEVELOPING NERVE FIBER.
BY
ROSS G. HARRISON.

1907 e 1910

Tubo medular (sapo)



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

“Fibras nervosas surgem das células nervosas”

Carrel - Burrows

Linfa provenientes de pintos - cultivo de células de aves e mamíferos.

Burrows - Rockefeller Institute



CULTIVATION OF TISSUES IN VITRO AND ITS
TECHNIQUE.*

BY ALEXIS CARREL AND MONTROSE T. BURROWS.

*(From the Laboratories of the Rockefeller Institute for Medical Research,
New York.)*

1910 e 1911 - Rockefeller Institute

AN ADDITION TO THE TECHNIQUE OF THE CULTIVA-
TION OF TISSUES IN VITRO.*

BY ALEXIS CARREL AND MONTROSE T. BURROWS.

*(From the Laboratories of the Rockefeller Institute for Medical Research,
New York.)*

1950 – Tripsina

Desenvolvimento de Meios de Cultivo

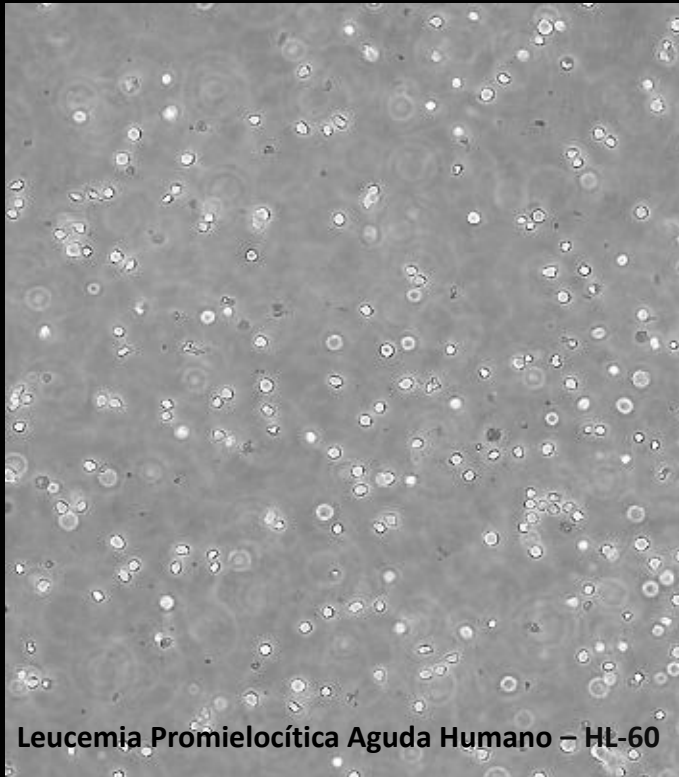
Antibióticos

1952 – 1955 Primeira linhagem de células humana HeLa
(George Gey)

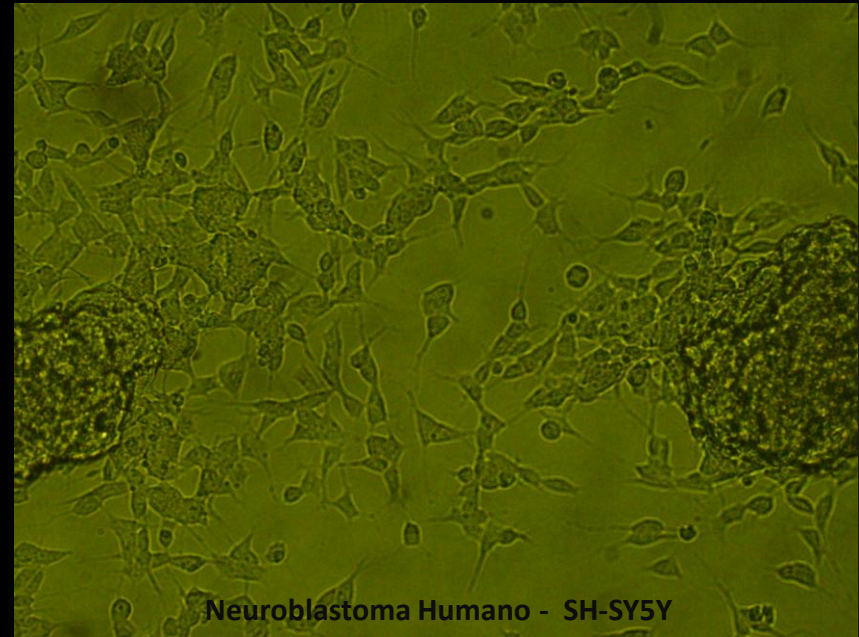


Adenocarcinoma Cervical - HeLa

Células em Suspensão



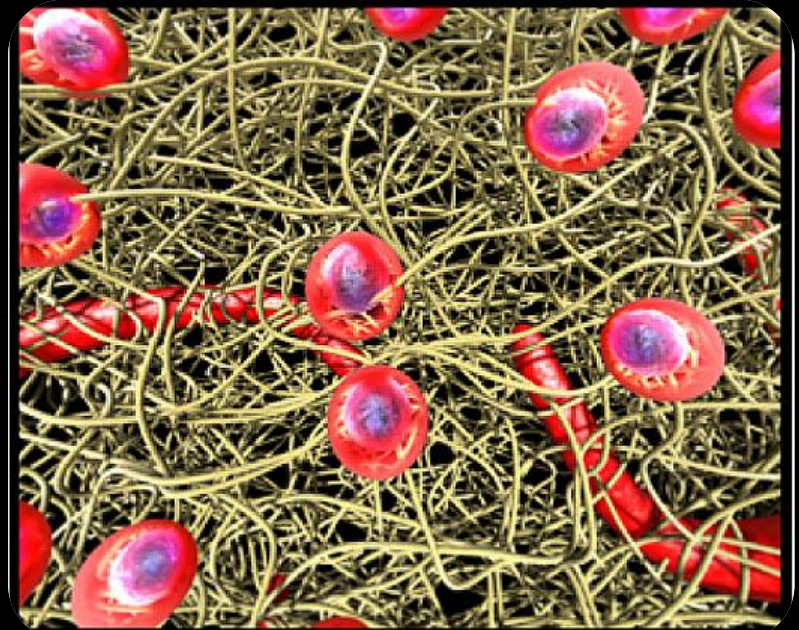
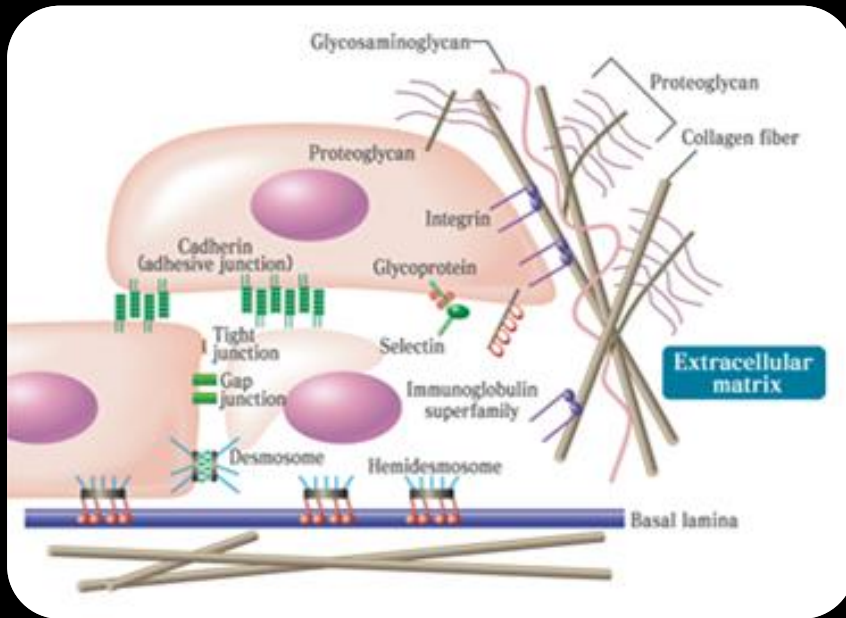
Células Aderidas



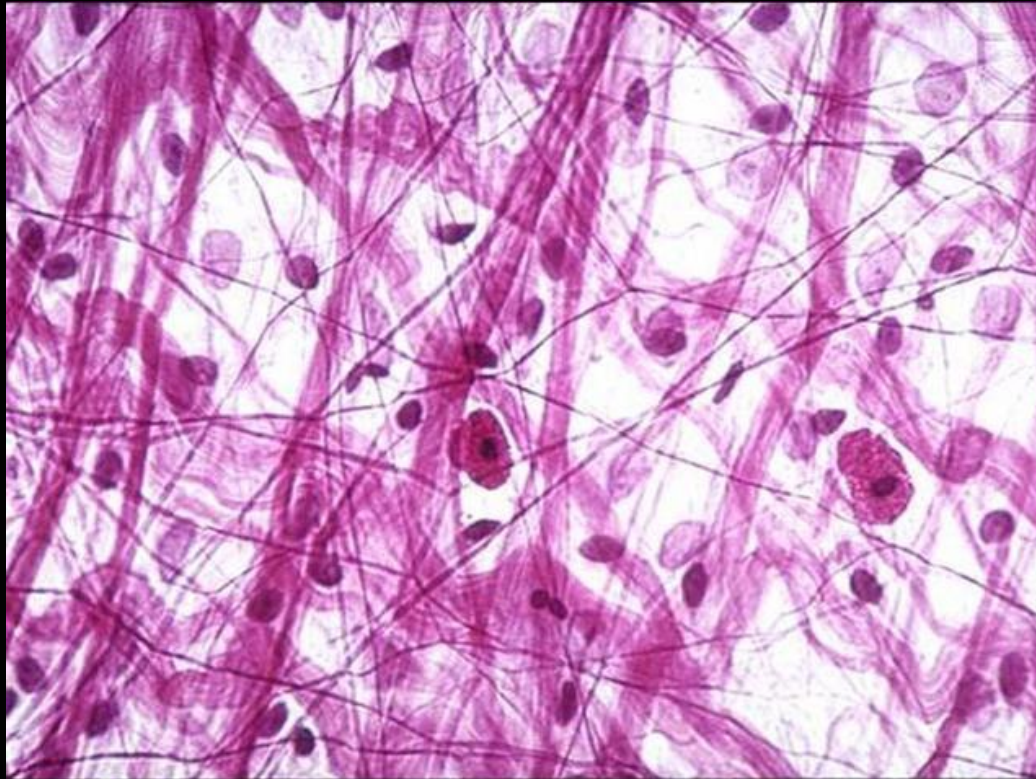
Sem aumento de área superficial
de suporte

A forma assumida pela célula geralmente reflete a sua origem.

Matriz extracelular/ Adesão celular



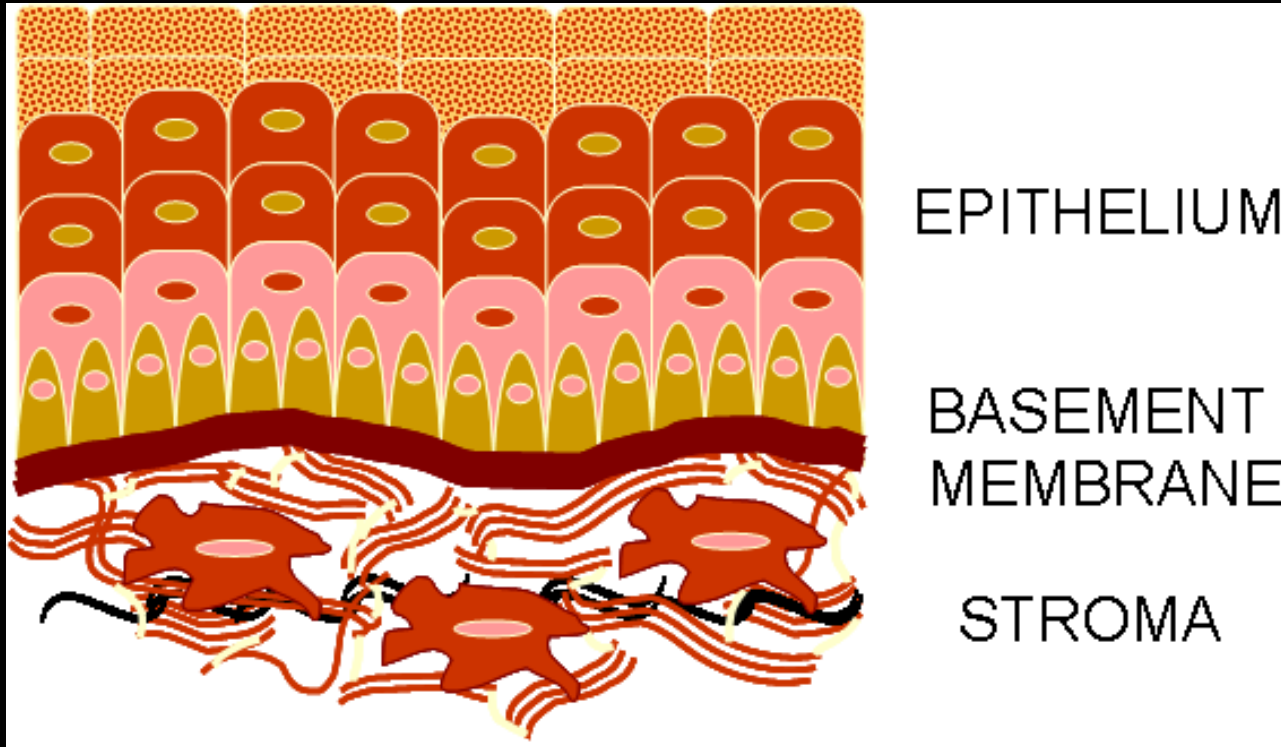
Tecido conjuntivo



Matriz extracelular abundante e células esparsamente distribuídas.

Rica em polímeros fibrosos, a matriz sofre o estresse mecânico e não a célula

Tecido Epitelial



Matriz extracelular esparsa (membrana basal).

Alta densidade celular.

Células sofrem o estresse mecânico.

Tecido Epitelial

Simple squamous

- Lines blood vessels and air sacs of lungs
- Permits exchange of nutrients, wastes, and gases



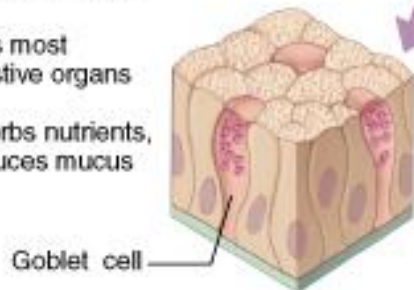
Simple cuboidal

- Lines kidney tubules and glands
- Secretes and reabsorbs water and small molecules



Simple columnar

- Lines most digestive organs
- Absorbs nutrients, produces mucus



Goblet cell

Stratified squamous

- Outer layer of skin, mouth, vagina
- Protects against abrasion, drying out, infection



Stratified cuboidal

- Lines ducts of sweat glands
- Secretes water and ions



Stratified columnar

- Lines epididymus, mammary glands, larynx
- Secretes mucus

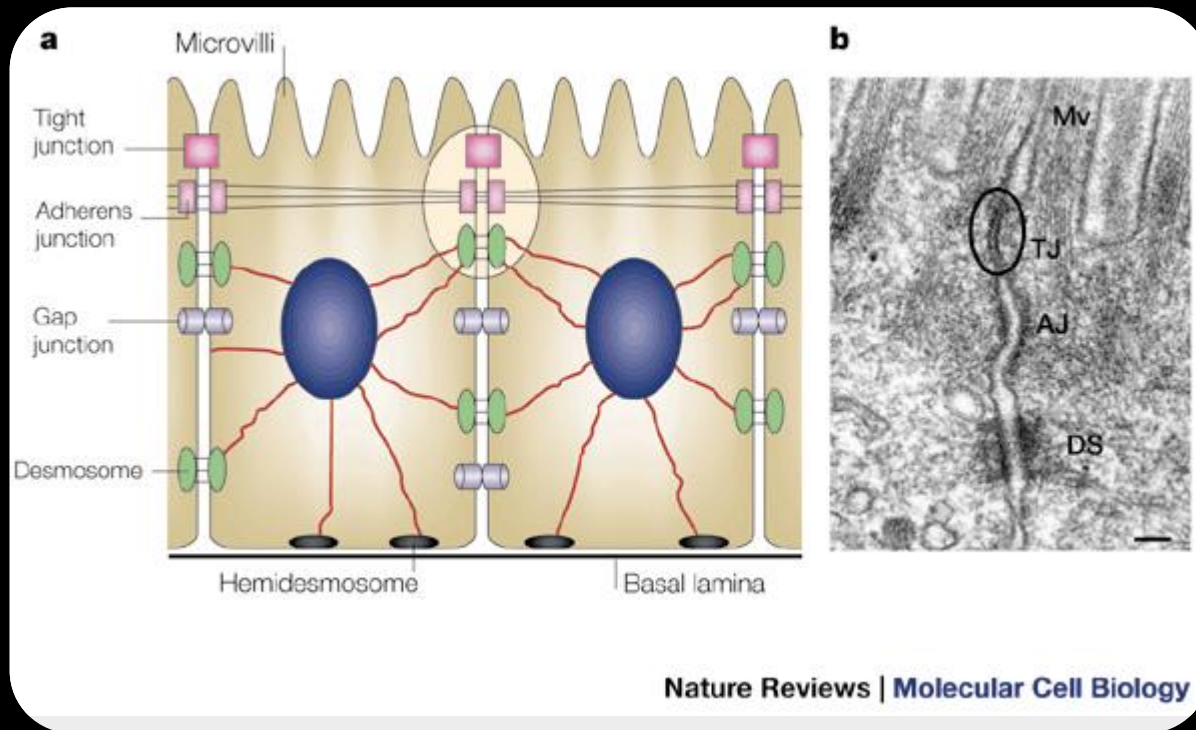


Basement membrane

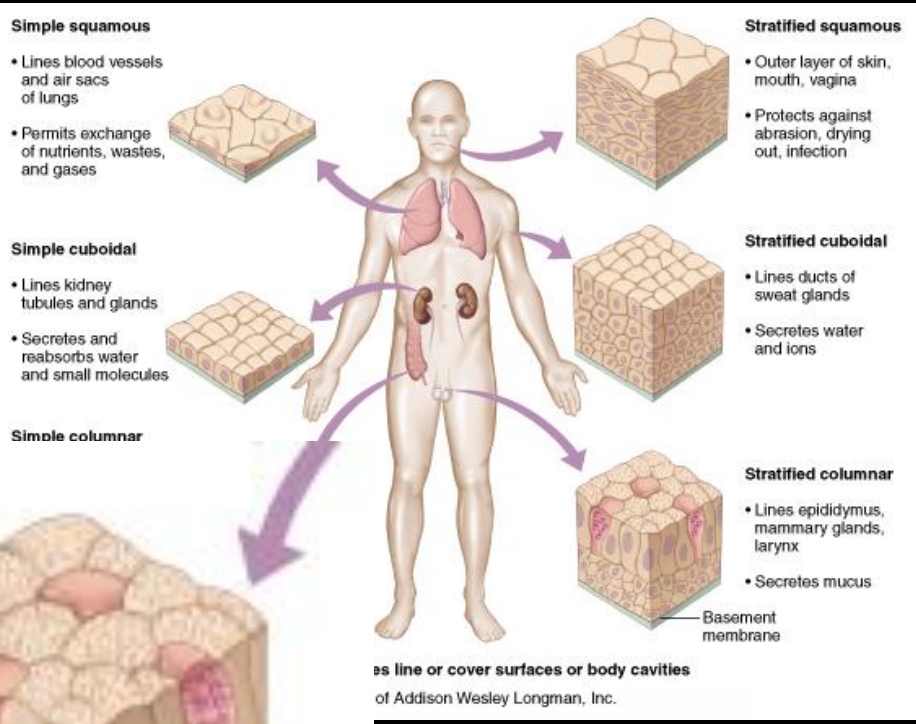
(a) Most epithelial tissues line or cover surfaces or body cavities

Junções Celulares

Ocorrem em pontos de contato célula-célula e célula-matriz (tecidos repletos de epitélio)



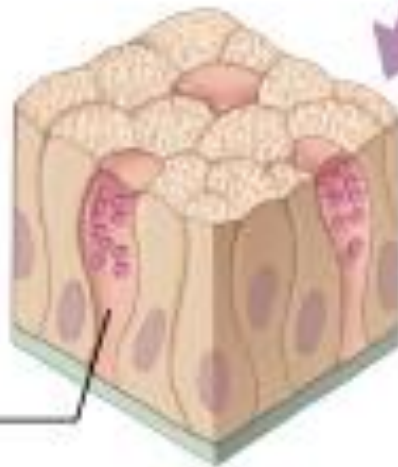
Junções Celulares



Simple columnar

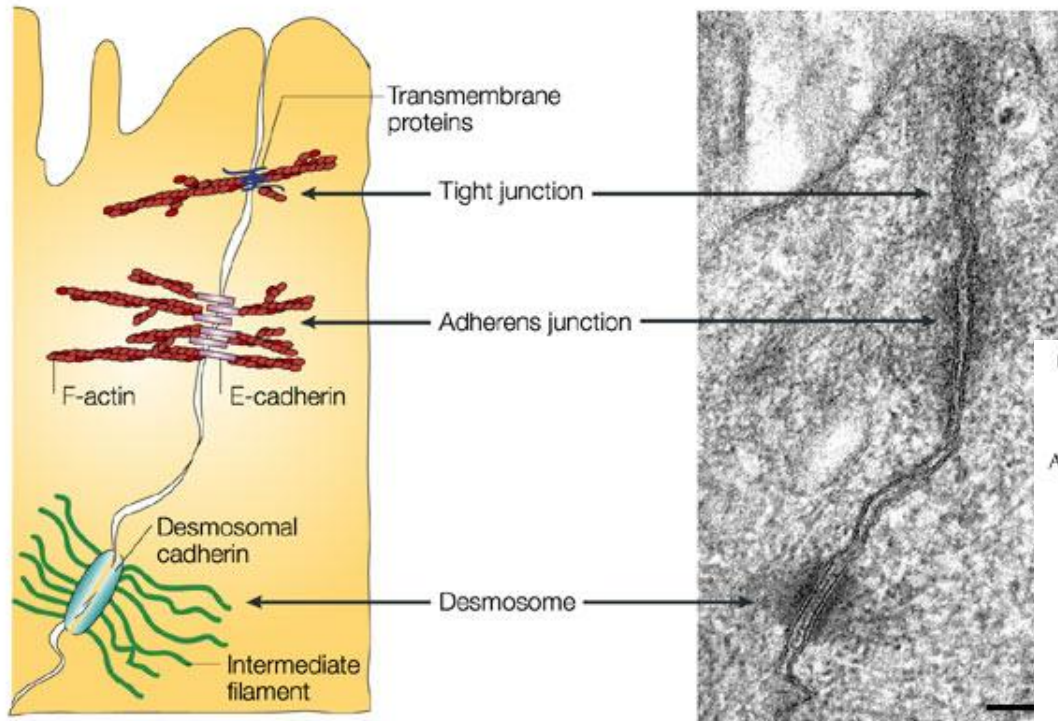
- Lines most digestive organs
- Absorbs nutrients, produces mucus

Goblet cell

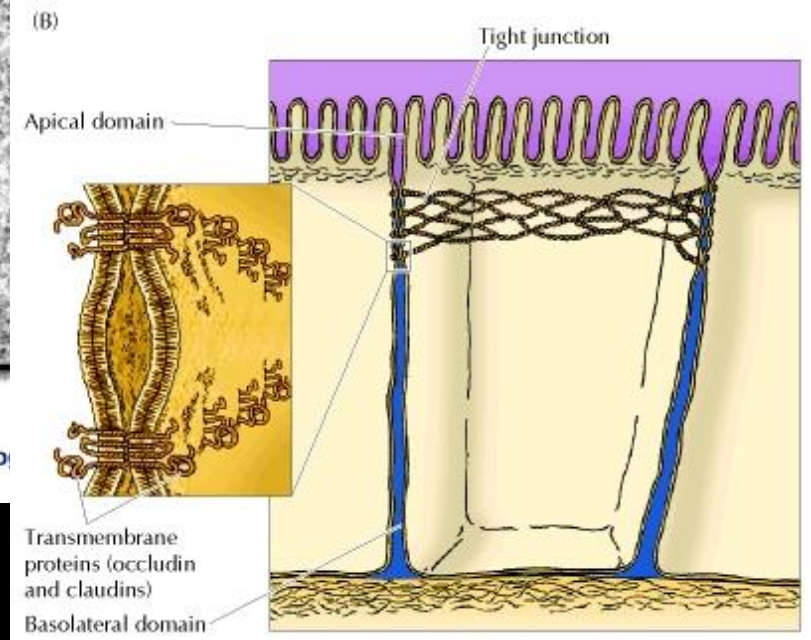


Junções Celulares

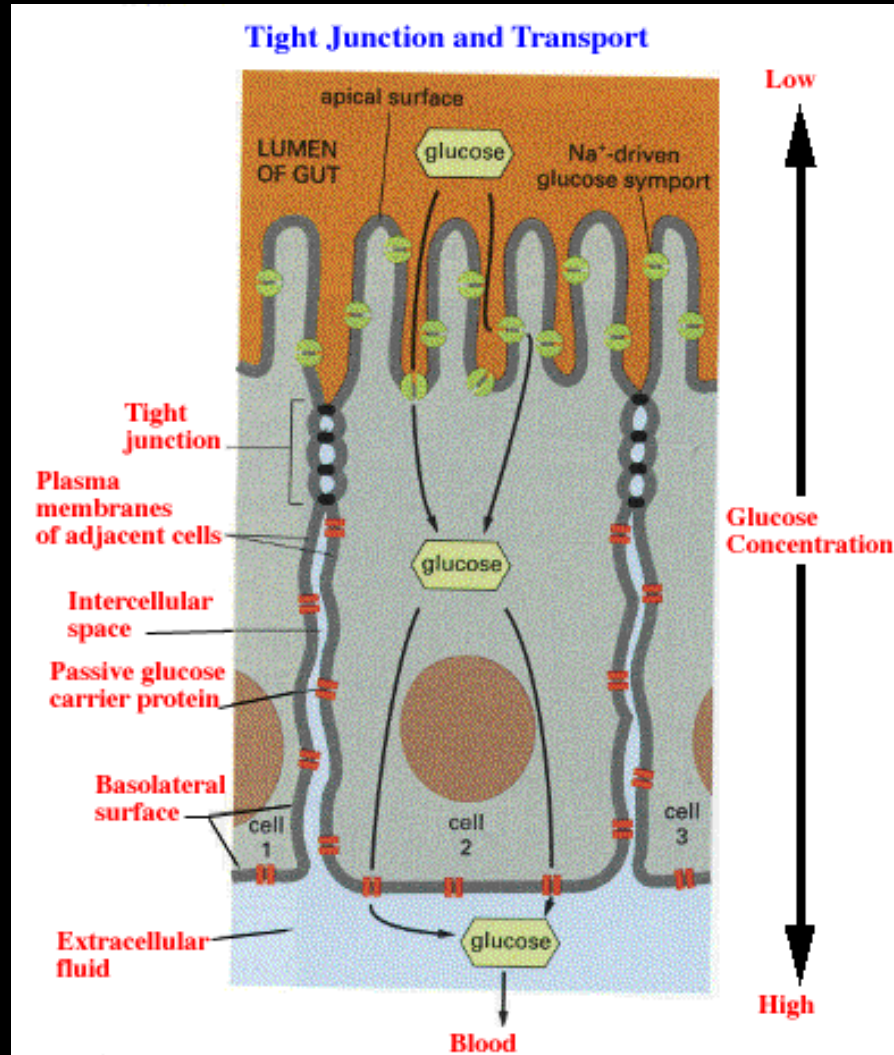
Junção bloqueadora (junções compactas - vertebrados): Impedem que pequenas moléculas vazem de um lado para outro.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

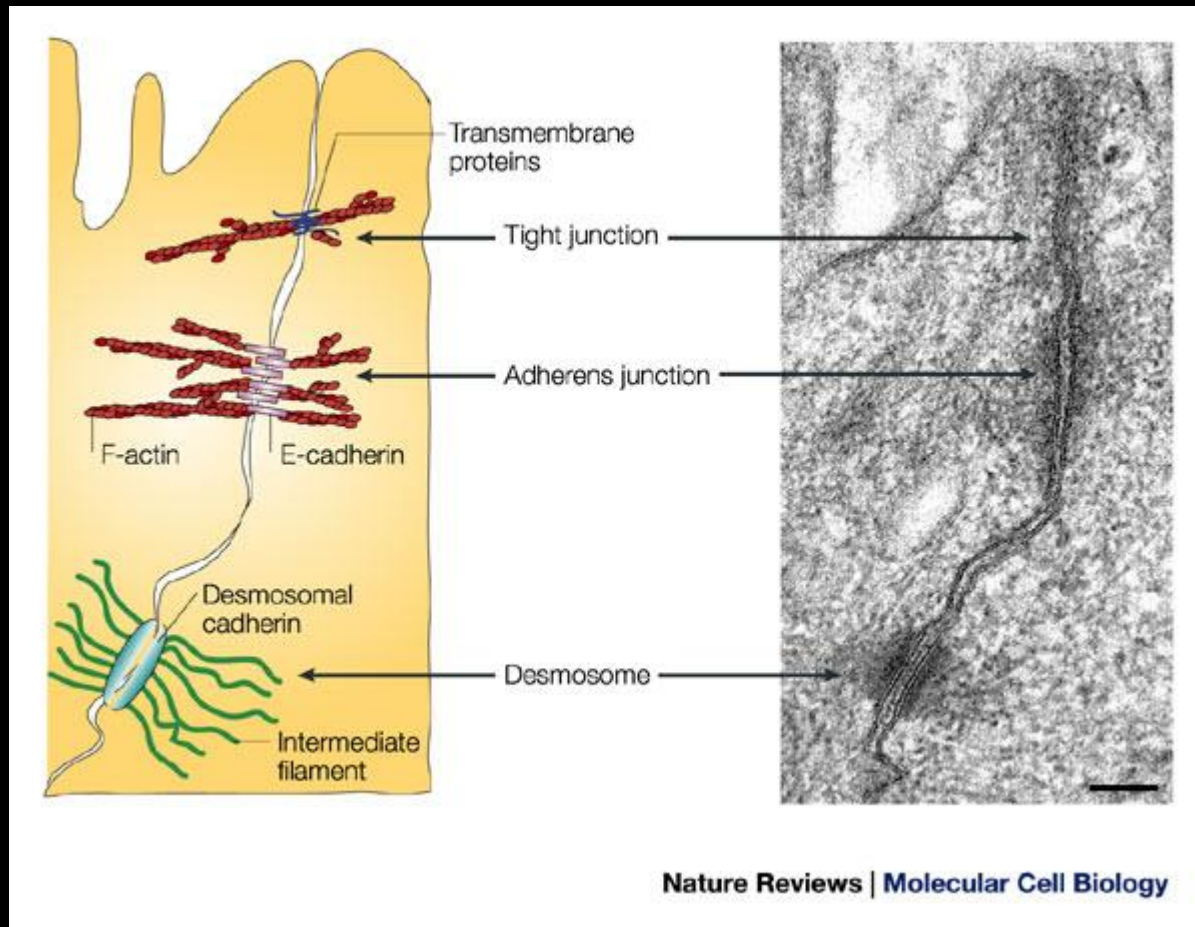


Junções bloqueadoras

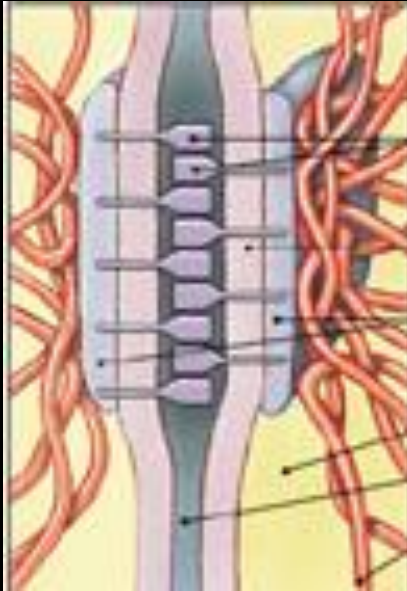


Junções de Ancoramento

Junção de Ancoramento: Conectam o citoesqueleto de uma célula ao citoesqueleto da célula vizinha ou à matriz extracelular.



Junção de Ancoramento



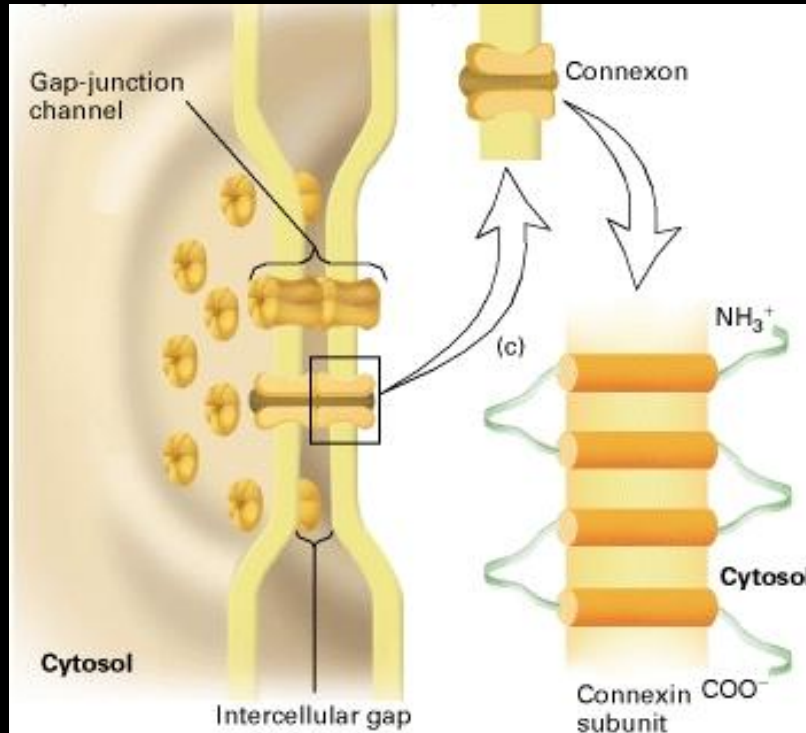
Proteínas de ancoramento intracelular (placa):
conectam o complexo a filamentos de actina e
filamentos intermediários

Proteínas de adesão transmembrana :
liga-se a proteína de ancoramento intracelular e
domínio extracelular da proteína de
adesão transmembrana da outra célula.

Formas Funcionais:

- **Junções aderentes (actina) e desmossomos (intermediário): célula-célula;**
proteínas de adesão transmembrana família da caderinas.
- **Adesões focais (actina) e os hemidesmossomos (intermediário): célula-matriz;**
proteína de adesão transmembrana família das integrinas

Junções Comunicantes (Tipo Fenda)



Proteínas formadora de canais - Conexinas.

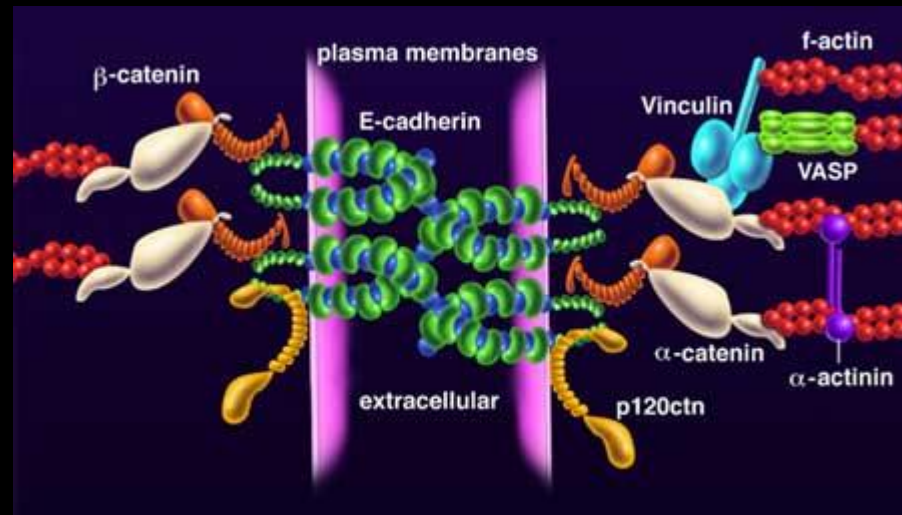
No homem 14 tipos diferentes.

1.5 nm (aminoácidos, íons, vitaminas, açúcares, mediadores intracelular).

Manutenção de uma distância fixa entre as células.

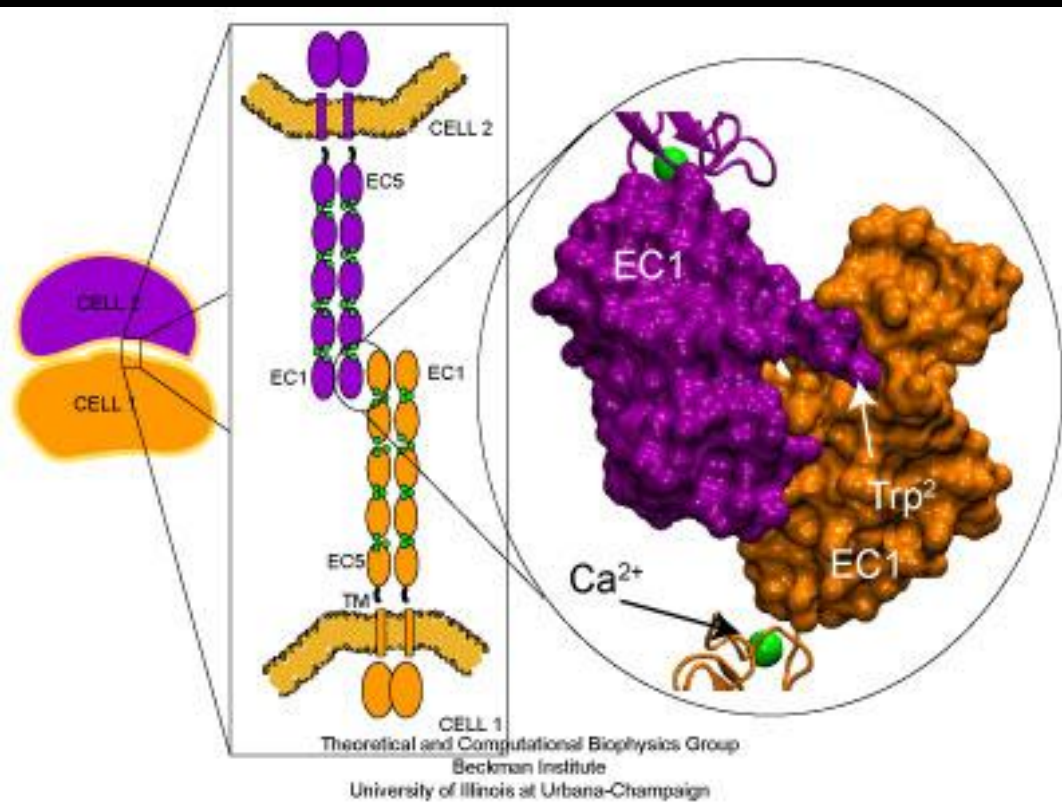
Moléculas de Adesão Celular (CAMs)

- Proteínas transmembranas.
- Moléculas de adesão célula-célula ou célula-matriz.
- Dependentes ou independentes de Ca^{2+} .
- Caderinas, superfamília das imunoglobulinas e selectinas.



Moléculas de Adesão Celular - (CAMs)

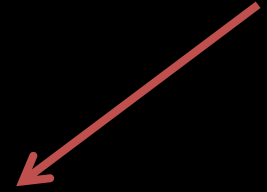
1. Caderinas



Cadeia polipeptídica dobrada em cinco a seis repetições.
Íons posicionados entre cada par de repetição de caderina, formando uma estrutura rígida.

Moléculas de Adesão Celular - (CAMs)

1. Caderinas



Ligação homofílica – caderinas do mesmo tipo em ambas as células.

Ligação Heterofílica – caderinas diferentes.

Ligação dependente de ligante – ligadas por meio de outra molécula

Moléculas de Adesão Celular - (CAMs)

1. Caderinas

Caderina -E

Células epiteliais

Caderina-N

Nervo, músculo e nas células do cristalino

Caderina-P

Células da placenta e da derme

Caderina-VE

Células endoteliais

80 membros da superfamília das caderinas (mamíferos)

2. Superfamília das imunoglobulinas

Um ou mais domínios semelhantes a Ig

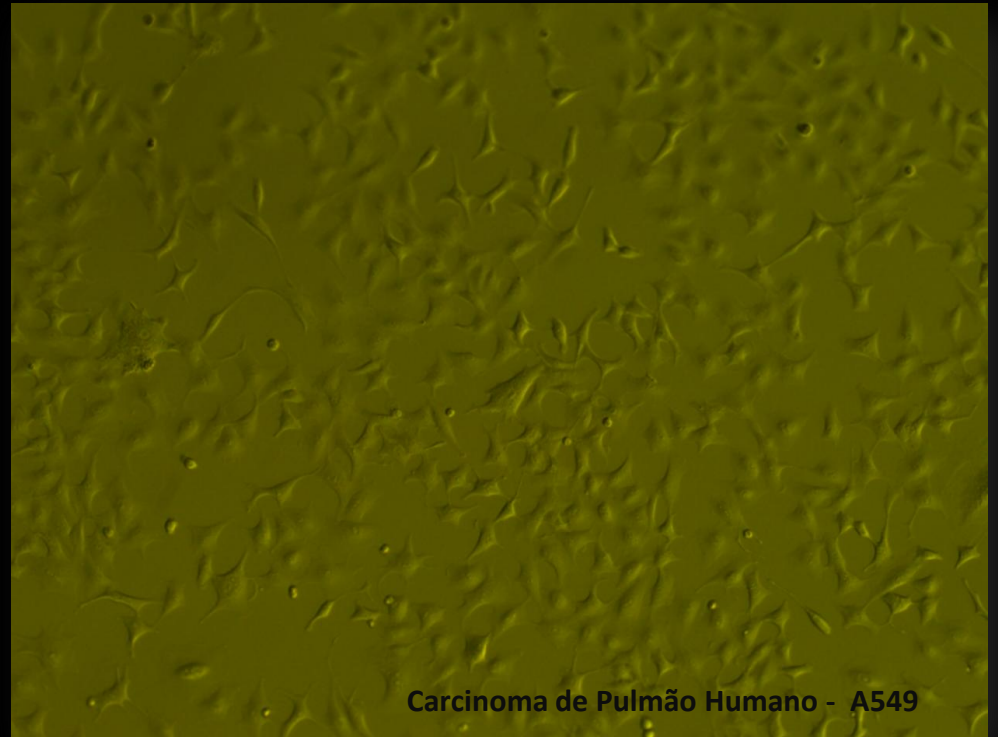
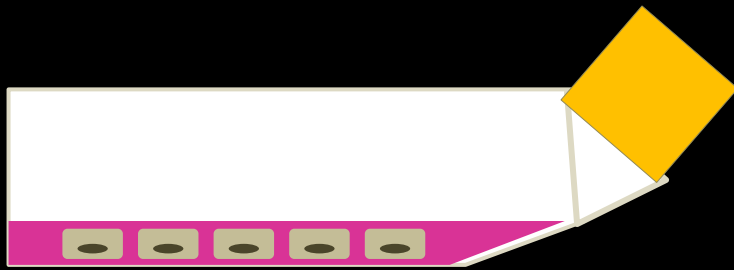
Moléculas de adesão de célula neuronal (N-CAM)

mais prevalente nos vertebrados,

ligação homofílica,

alguns ligação heterofílico.

Células em Monocamadas Adesão Celular – Proliferação



Carcinoma de Pulmão Humano - A549

Etapas da Adesão/Proliferação

1. Adsorção de fatores de adesão: proteínas de matriz extracelular;
2. Contato das células com a superfície;
3. Adesão celular;
4. Espreadimento celular.



Carcinoma de Próstata Humano
LNCaP

Frascos (garrafas) de Cultura



Garrafas de Vidro – Propriedades ópticas e carga de superfície.

Garrafas Plásticas - (Poliestireno) Possuem boas propriedades ópticas, uma superfície plana, uniformidade quanto as propriedades e reprodutibilidade.

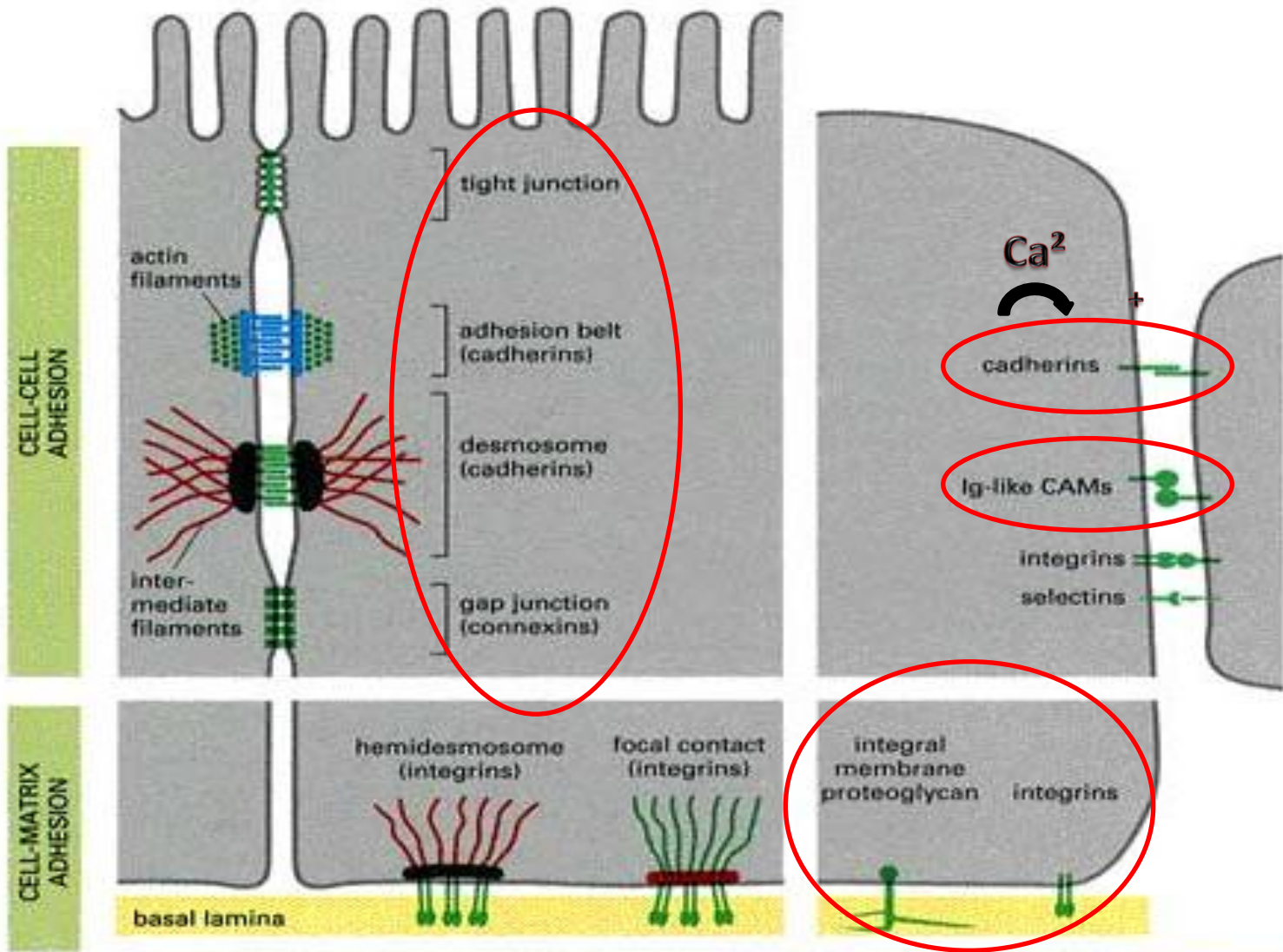
Hidrofóbicas → Tratadas com químicos e irradiação γ

Fibroblastos: adesão
ao substrato

Fibroblasto de Pulmão Humano – IMR-90

Células Epiteliais: adesão ao
substrato e adesão
células-células (placas)

Adenocarcinoma de Colorretal Humano – HT-29



Reagentes

1. Trypsina/EDTA

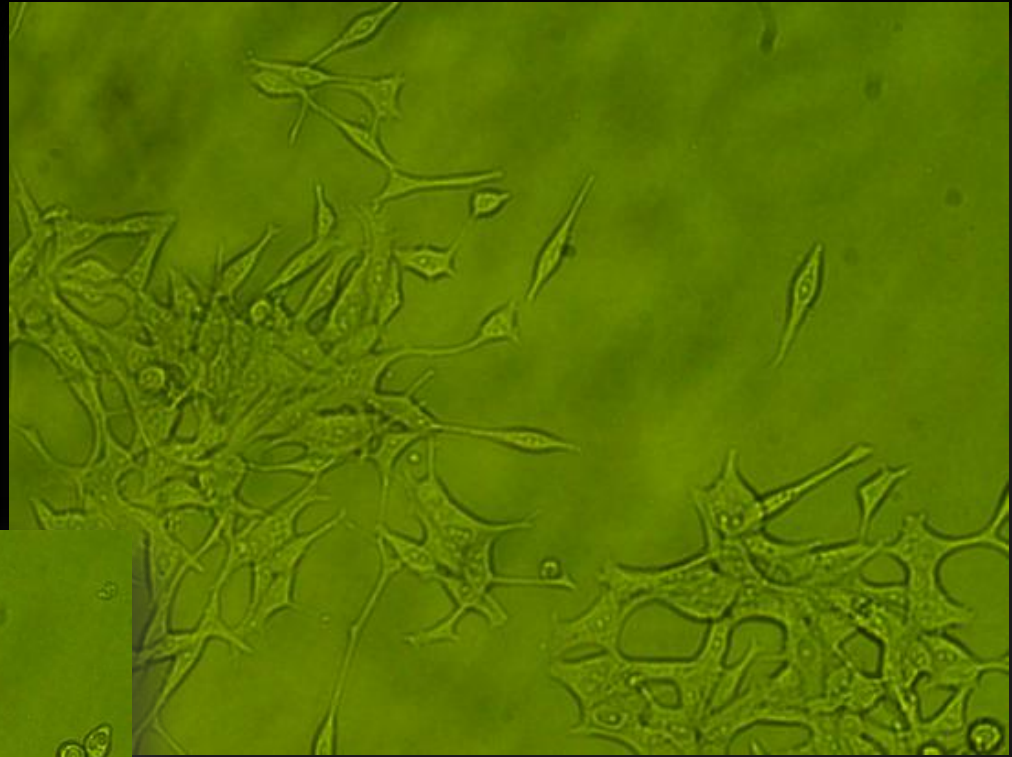


Células aderentes – Trypsina/EDTA
Células não aderentes - Centrifugação

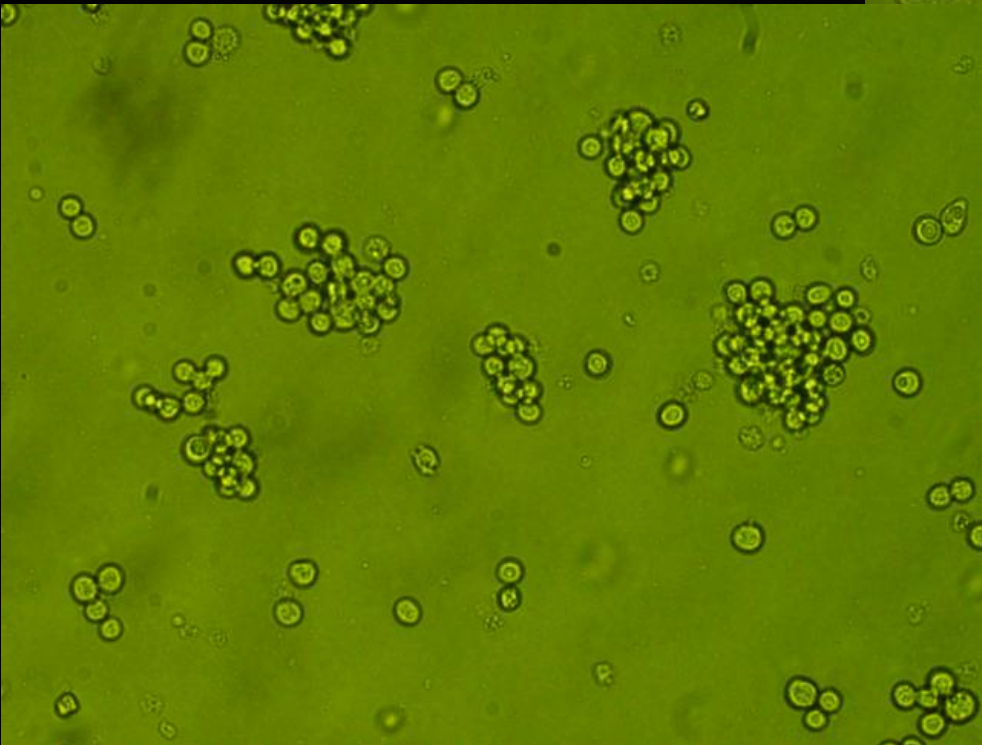
EDTA – atua como quelante

Reagentes

Tripsina



Sem Tripsina



Matriz Extracelular

MEC \longleftrightarrow Fenótipo Celular

Linhagens Celulares: MEC

Culturas Primárias e Células Especializadas: MEC exógeno

Matriz Extracelular Exógena

Facilitar a adesão, crescimento e diferenciação

Condicionamento

segunda cultura no frasco e meio de outra cultura

Colágeno

altamente purificado; preço elevado

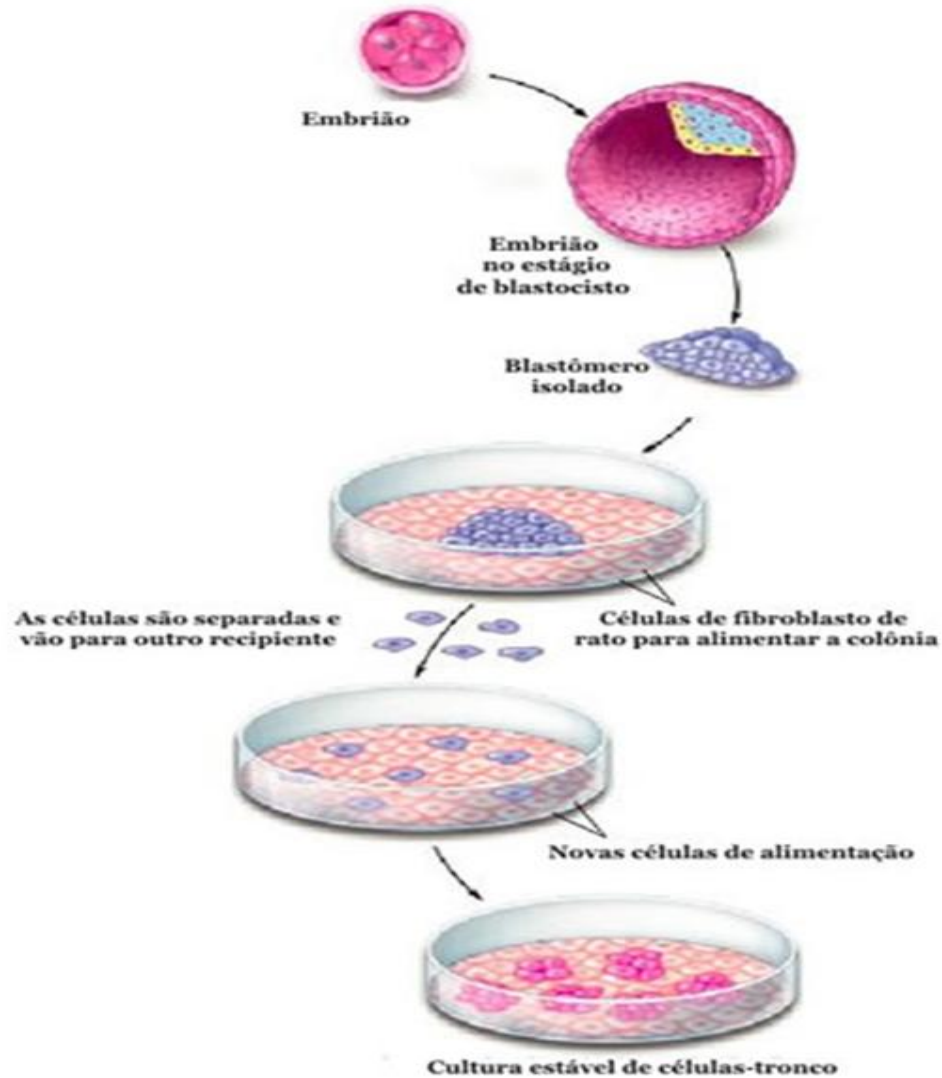
Laminina

altamente purificada;

Géis

mistura de colágenos, predominância do Tipo I

Feeder Layer



Su

•

liação

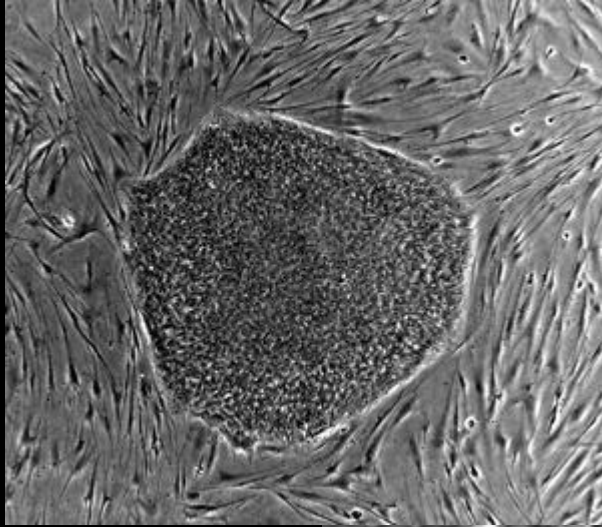
creção

s.

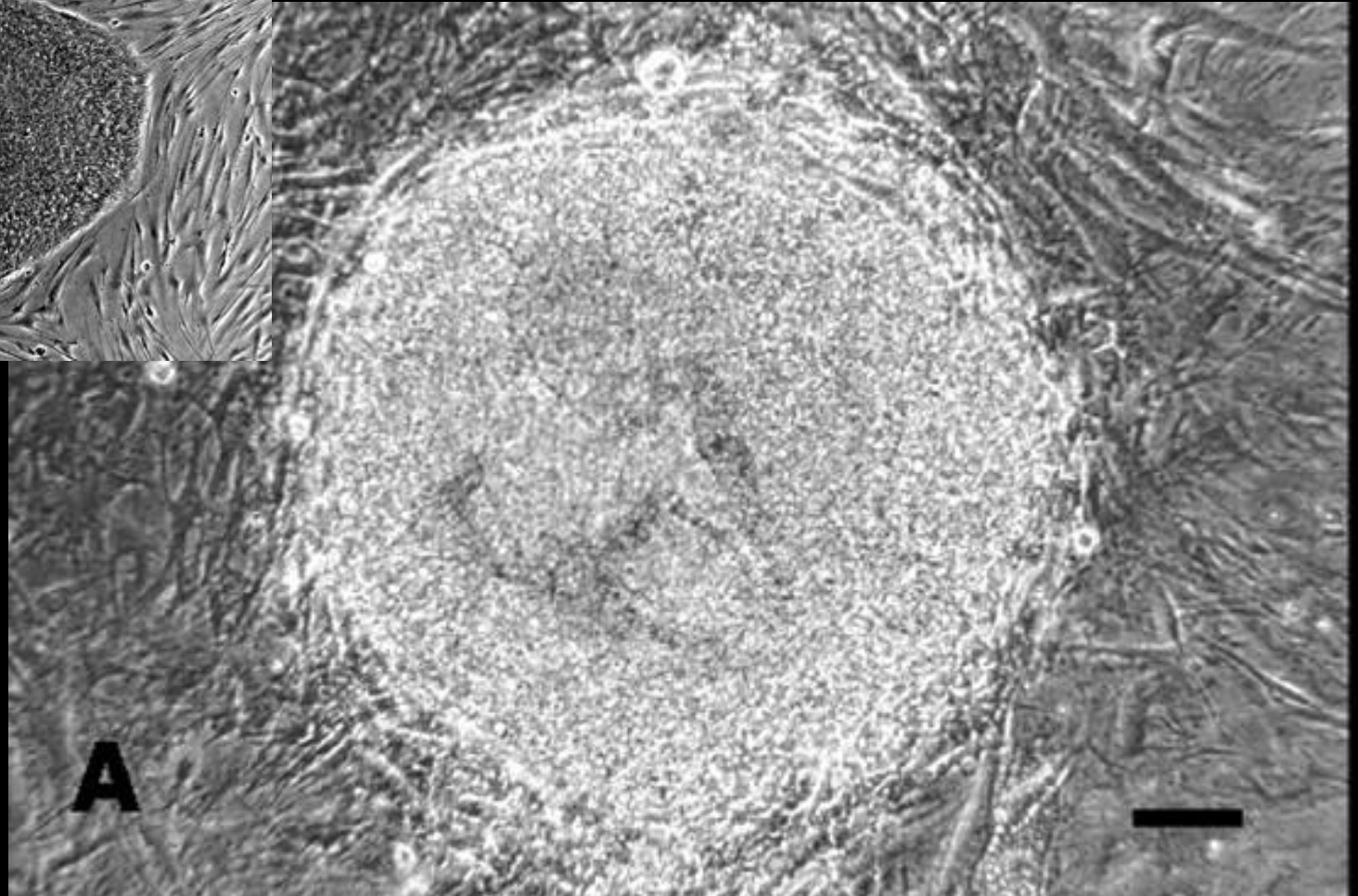
tos

no)

)



Feeder Layer



Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts

Thomson (1998)

Science

2. PBS

3. Meios de Cultura



Grande número de aminoácidos

Vitaminas

Minerais (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^-)

Glicose

Antibióticos

Suplementos Orgânicos (proteínas, peptídeos, piruvato)

Hormônios e Fatores de Crescimento

Vermelho de fenol

Ex: RPMI 1640, MEM (Minimal Essential Medium (Eagle) , DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

4. Soro



Soro

Fatores de Crescimento

Fatores de Adesão e Atividade Anti-tripsina

Mineral

Lipídeos

Hormônios

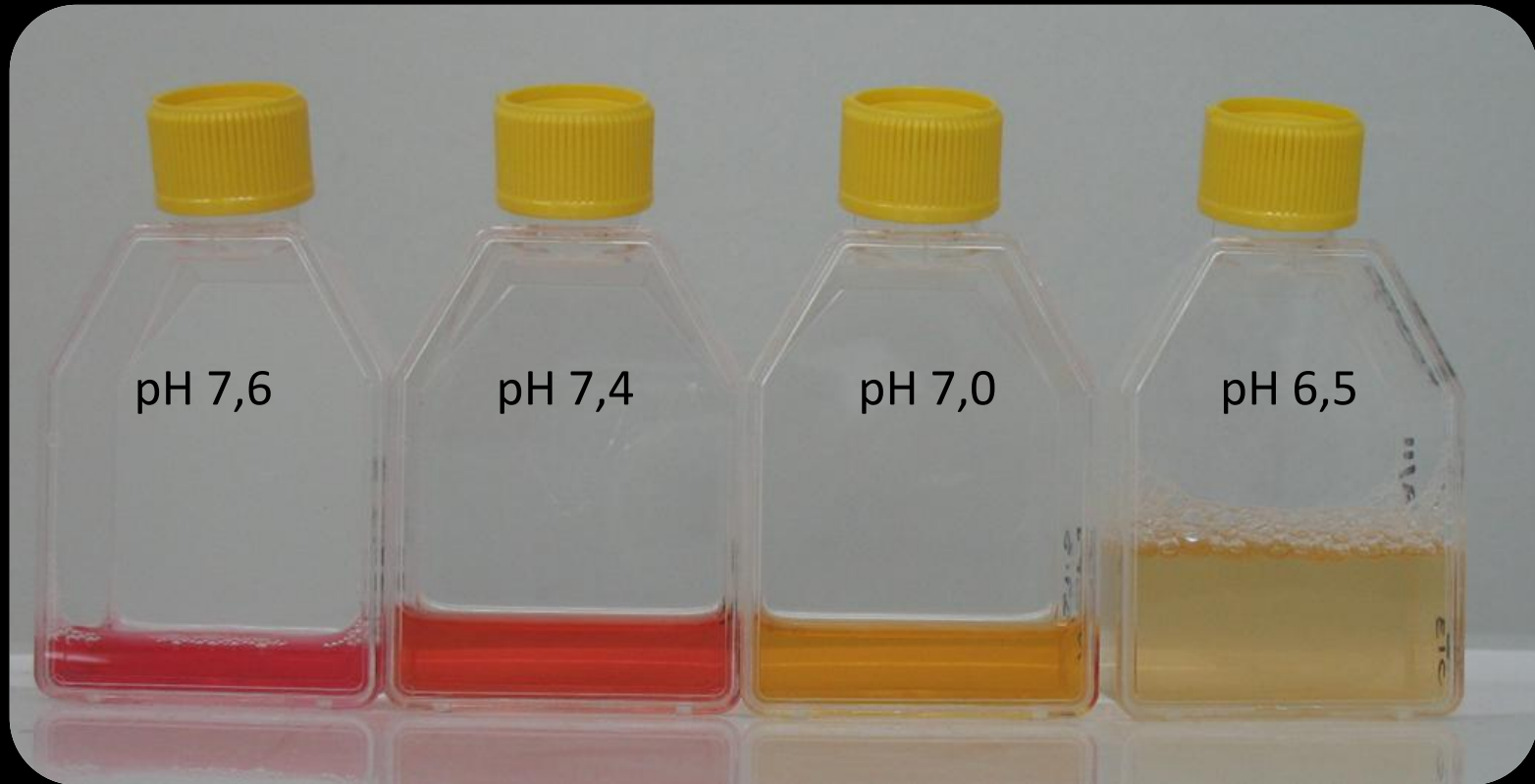
Proteínas

Nutrientes e metabólitos (aminoácidos, glicose...)

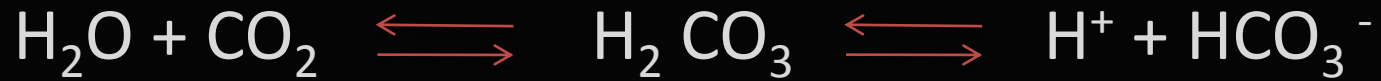
Ex: Fetal Bovine Serum, Horse Serum, Goat Serum

1. pH

Vermelho de fenol – Pode interferir na fluorescência e absorbância



2. CO_2 e Bicarbonato



CO_2 - redução do pH

Bicarbonato de Sódio – Aumento do pH

CO_2 Liberado por Células X CO_2 Liberado pela Incubadora

5% de CO_2

3. Temperatura

- Dependente da temperatura corporal do animal do qual as células foram obtidas.
 - De variações anatômicas (ex: pele e testículo).
 - Incorporação de uma temperatura de segurança.

Temperatura utilizada: 37°C

4. Osmolalidade

Plasma humano: 290 mosmol/kg

Cultivo Celular: 260 mosmol/kg e 320 mosmol/kg

Diferença de Osmolalidade entre os Meios de Cultivos e evaporação.

Humidade relativa do ar 95% (mais próximo da saturação)

5. Forma e Composição de Suportes para Adesão Celular

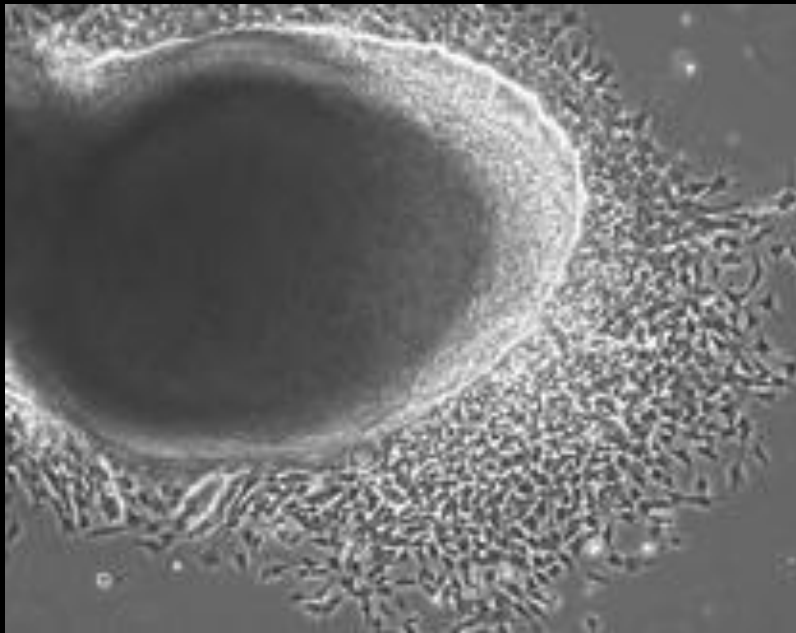


1. Cultivo Primário de Explantes

É o estágio da cultura após o isolamento das células e antes da primeira sub-cultura.

Migração celular do tecido.

(Freshney 2005)



Neural Crest-derived Cell

Wang (2010)

Cell Death and Disease



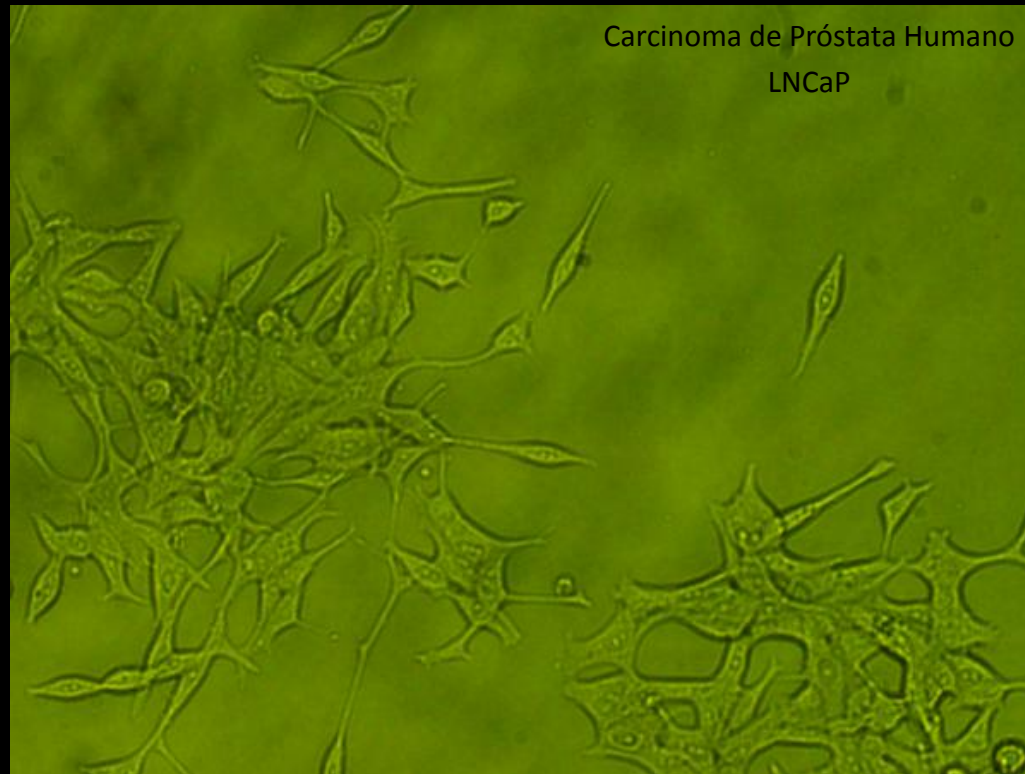
Adult Human Retina

Mayer (2005)

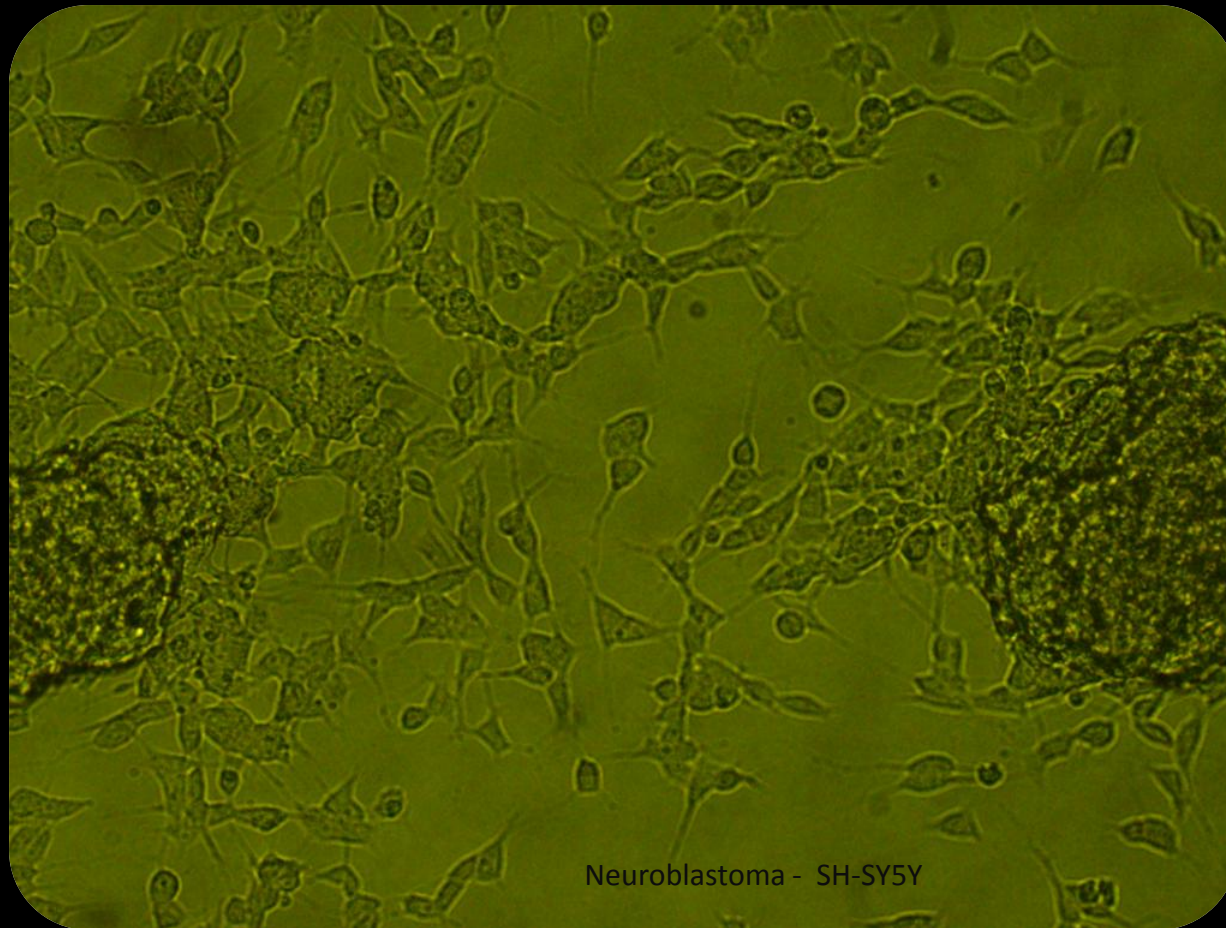
British Journal of Ophthalmology

2. Cultivo Celular

Refere-se a uma cultura derivada de células dispersas oriundas de um tecido ou linhagens celulares.

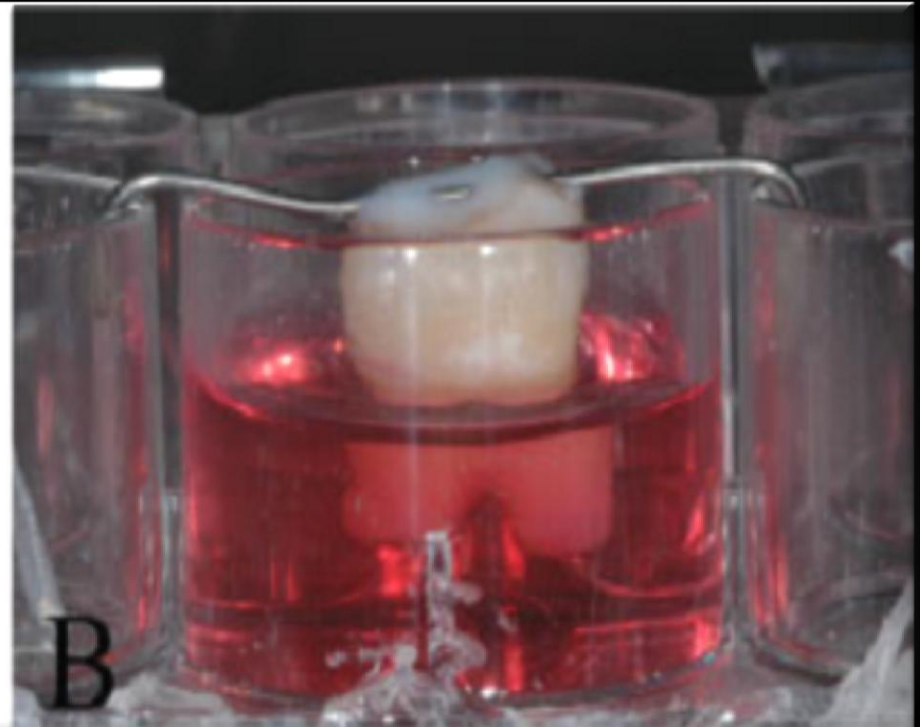


Linhagens Finitas e Contínuas



3. Cultivo de Órgão

Refere-se a uma cultura tridimensional de tecidos não desagregados que retém parcialmente ou completamente a histologia de um tecido *in vivo*.



Categoria	Cultivo de órgão	Explante	Cultura de Células
Fonte	Órgãos embrionários e fragmentos de tecidos (adulto)	Fragmentos de tecidos	Tecido desagregado, culturas primárias e linhagens celulares
Empenho	Alto	Moderado	Baixo
Histologia	Informativo	Difícil	Não é plausível de aplicação
Propagação	Não é possível	Possível	Procedimento padrão
Reprodutibilidade e homogeneidade	Muita variação entre as amostras	Muita variação entre as amostras	Baixa variação entre as amostras
Quantificação	Difícil	Difícil	Fácil, muitas técnicas disponíveis

4. *Histotypic Culture* (Cultivo Histotípico)

As células são re-agregadas ou crescem para re-criar uma estrutura tridimensional com uma densidade celular semelhante ao do tecido.



5. *Organotypic Culture* (Cultivo Organotópico)

Refere-se a co-cultura, com ou sem matriz, de diferentes tipos celulares.



Possibilidades de Estudo

Farmacologia

Ação de drogas, interação receptor-ligante, metabolismo de drogas, resistência a drogas.

Produtos Celulares

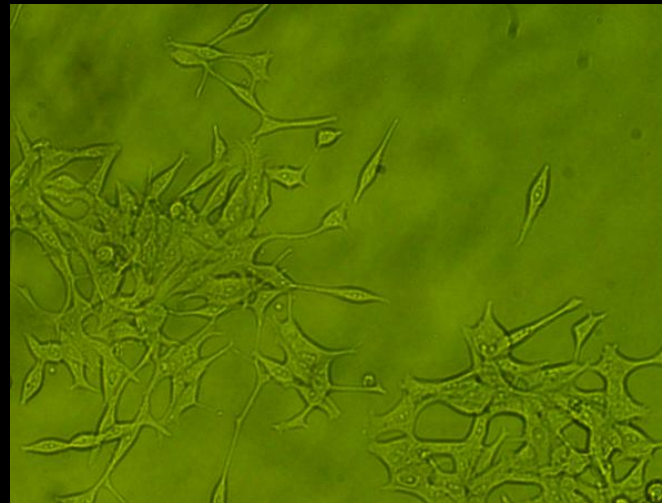
Proteômica, produtos biotecnológicos, secreções.

Fluxo Intracelular

Processamento de RNA, metabolismo do cálcio, fluxo de metabólitos, transdução de sinais, receptores hormonais, transporte de membrana.

Atividade Intracelular

transcrição de DNA, síntese de proteína, apoptose, diferenciação, ciclo celular.



Interação célula-célula

Morfologia, controle parácrino, cinética de proliferação celular, cooperação metabólica, adesão e mortalidade celular

Imunologia

Epítomos da superfície celular, hibridomas, citocinas e sinalização, inflamação.

Toxicologia

citotoxicidade, metagênese, carcinogênese, irradiação, infecção, inflamação.

Genômica

Análise genética, transfecção, transformação, imortalização.

Engenharia Tecidual

Matriz Extracelular Exógeno

Matrigel

Sarcoma de Engelbreth–Holm–Swarm – Camundongo

Células epiteliais

Componentes básicos da membrana – laminina,
fibronectina e proteoglicanas