



# Cultura Primária

## Cultivo de Linhagens Permanentes

### Disciplina de Engenharia Tecidual

Fernanda Nedel  
fernanda.nedel@gmail.com

Pelotas, 2011

# Objetivos

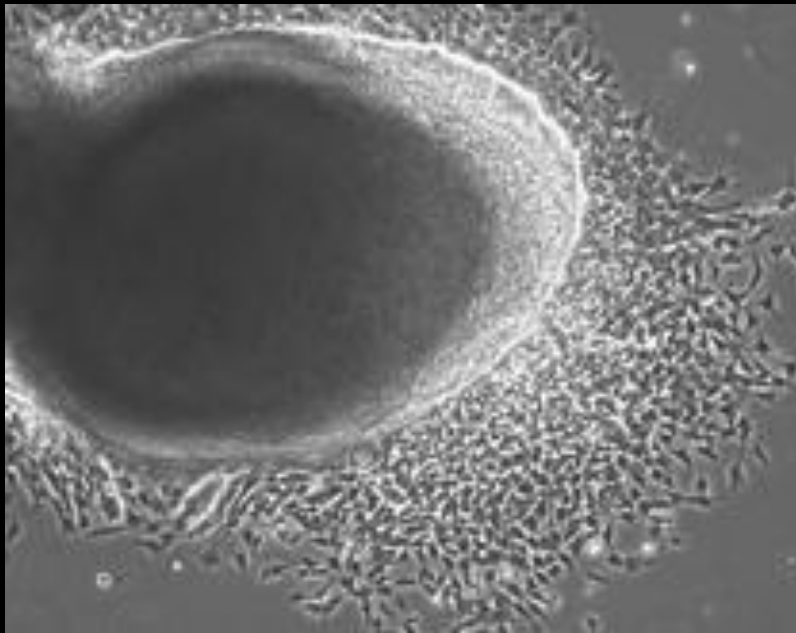
Cultivo Primário

Transformação e  
Imortalização Celular

# Cultivo Primário

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

Migração celular do tecido.



Neural Crest-derived Cell

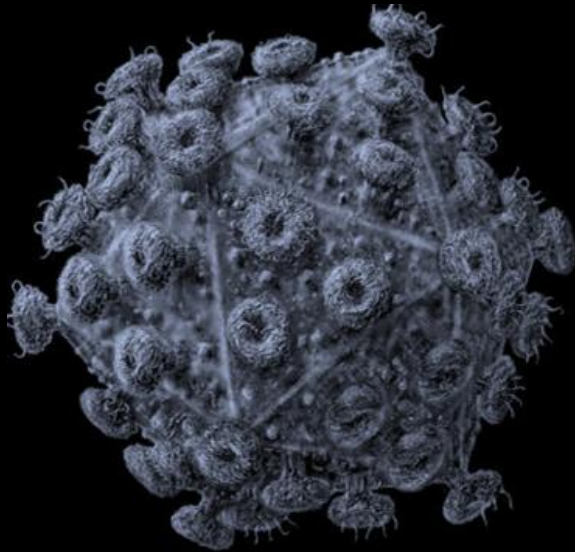
Wang (2010)

*Cell Death and Disease*



# Problemas Relacionados a Culturas Primárias

- HIV, Hepatite, Tuberculose



- Semelhança com Primatas

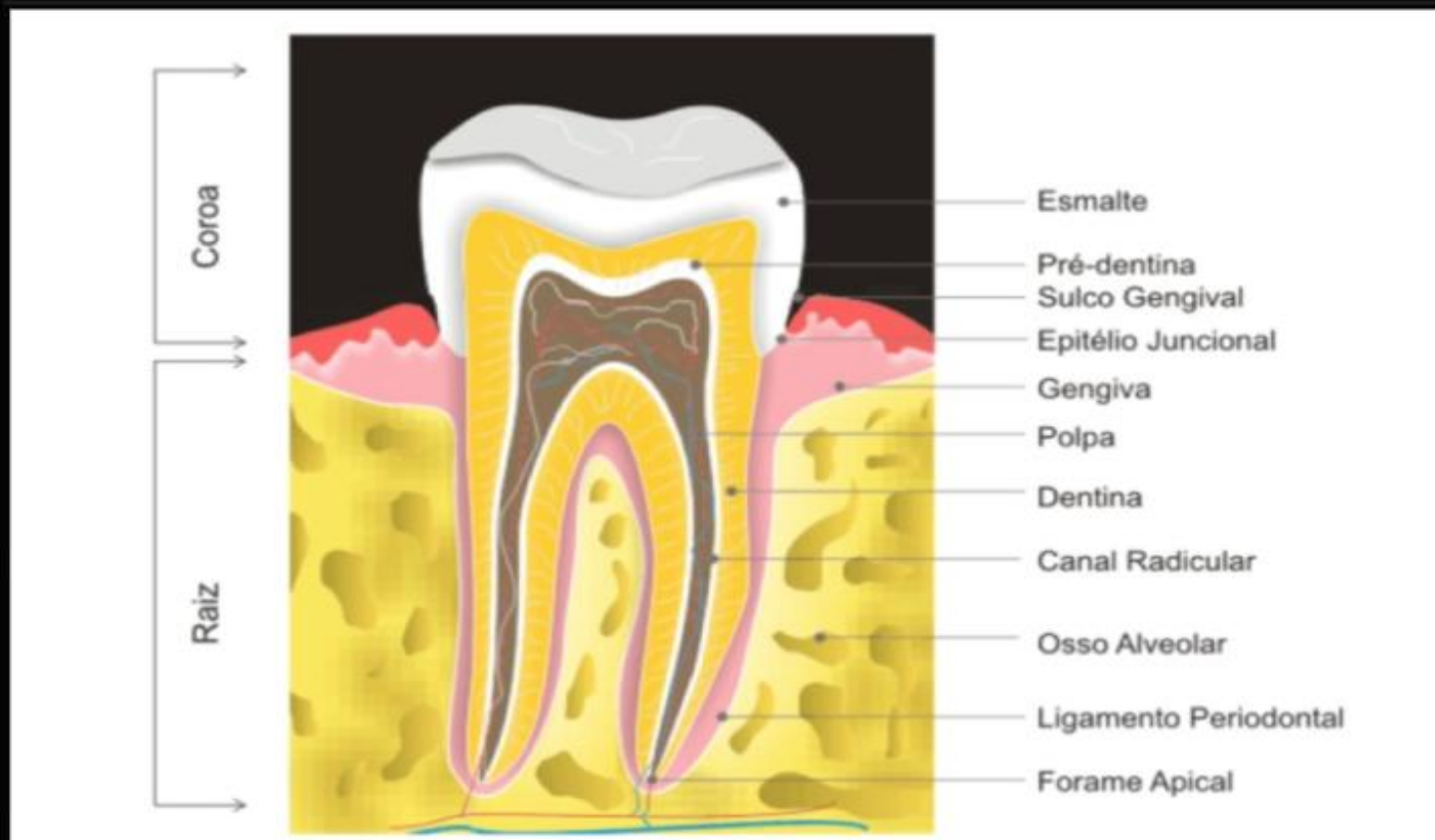


# Cultivo Celular

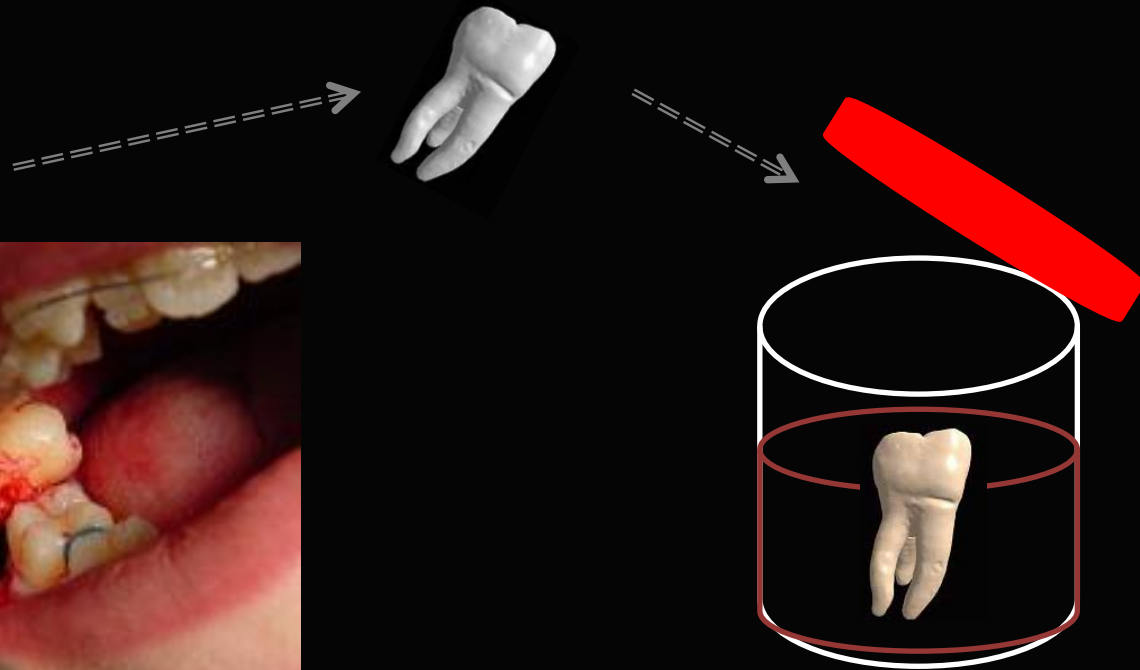
Estabelecimento de uma cultura:

- Cultura primária
- Linhagem celulares

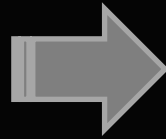
# Cultura Primária de Fibroblastos Pulpaes



# I. Aquisição das amostras



## II. Isolamento do tecido



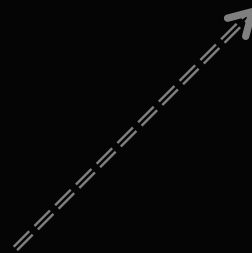
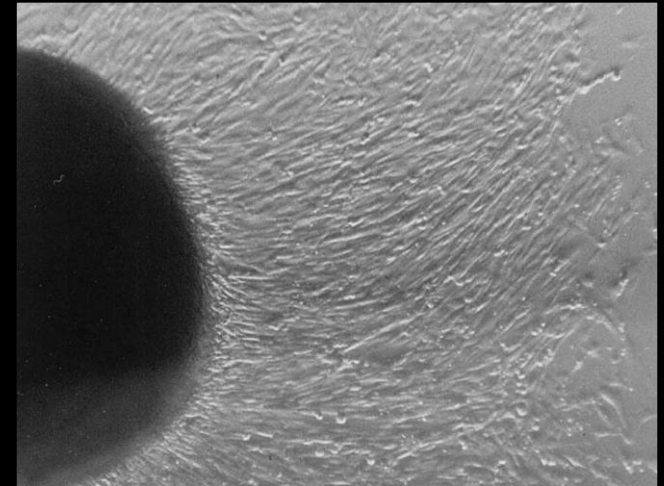
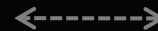


### III. Dissecação e/ou desagregação

- Explante
- Desagregação
- Dissociação Mecânica

# III. Dissecação e/ou desagregação

## ➤ Explante



# III. Dissecção e/ou desagregação

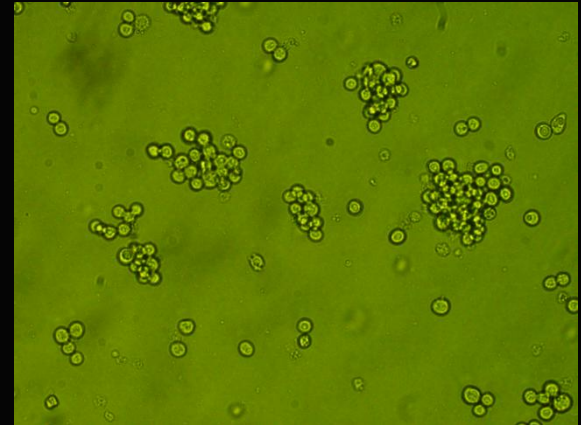
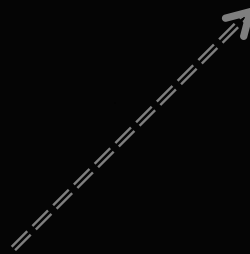
## ➤ Desagregação



Tripsina/EDTA  
Hialuronidase  
Pronase  
Dispase  
Colagenase

# III. Dissecação e/ou desagregação

## ➤ Dissociação Mecânica



# IV. Cultura após a colocação em um frasco de cultivo (trocas do meio)



1. Remoção do Meio

2. Lavagem com PBS  
3. Remoção do PBS



4. Colocação de Meio Novo



5. Estufa

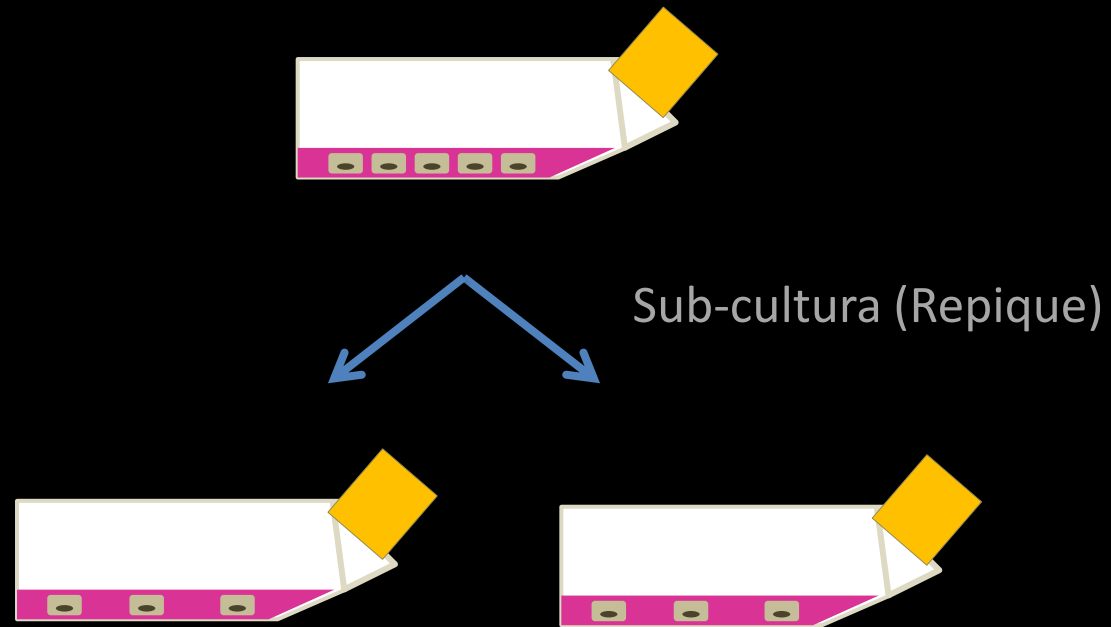
# Cultura Primária

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



# Sub-culturas

Pode ser cultivada por até 7 passagens até entrar em processo de senescência e a proliferação cessar definitivamente.



Linhagens Celular Finitas e Contínuas

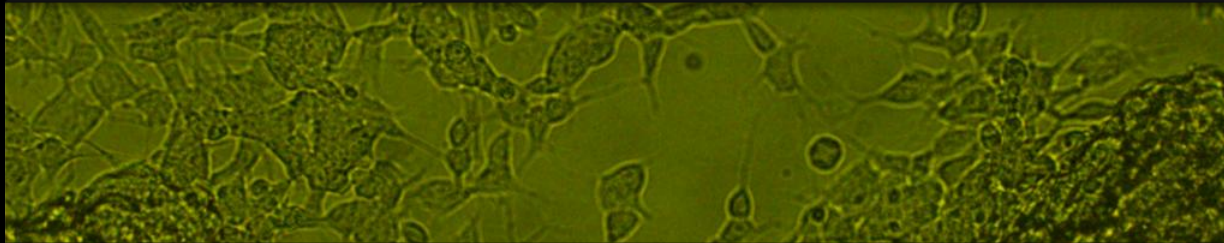
1° passagem



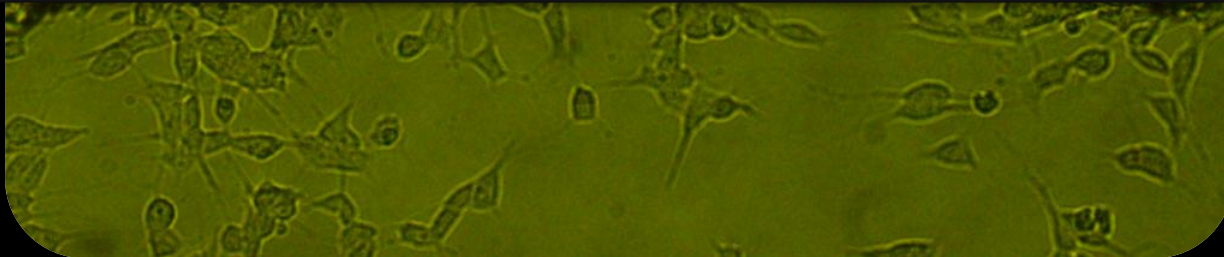
## Linhagens Celular Contínua e Finita



Linhagens Celulares Finitas: entram em senescência.



Linhagens Celulares Contínuas : escaparam do controle da senescência.



# Linhagens Celulares Finitas

**20 – 80 passagens**

**Diplóides**

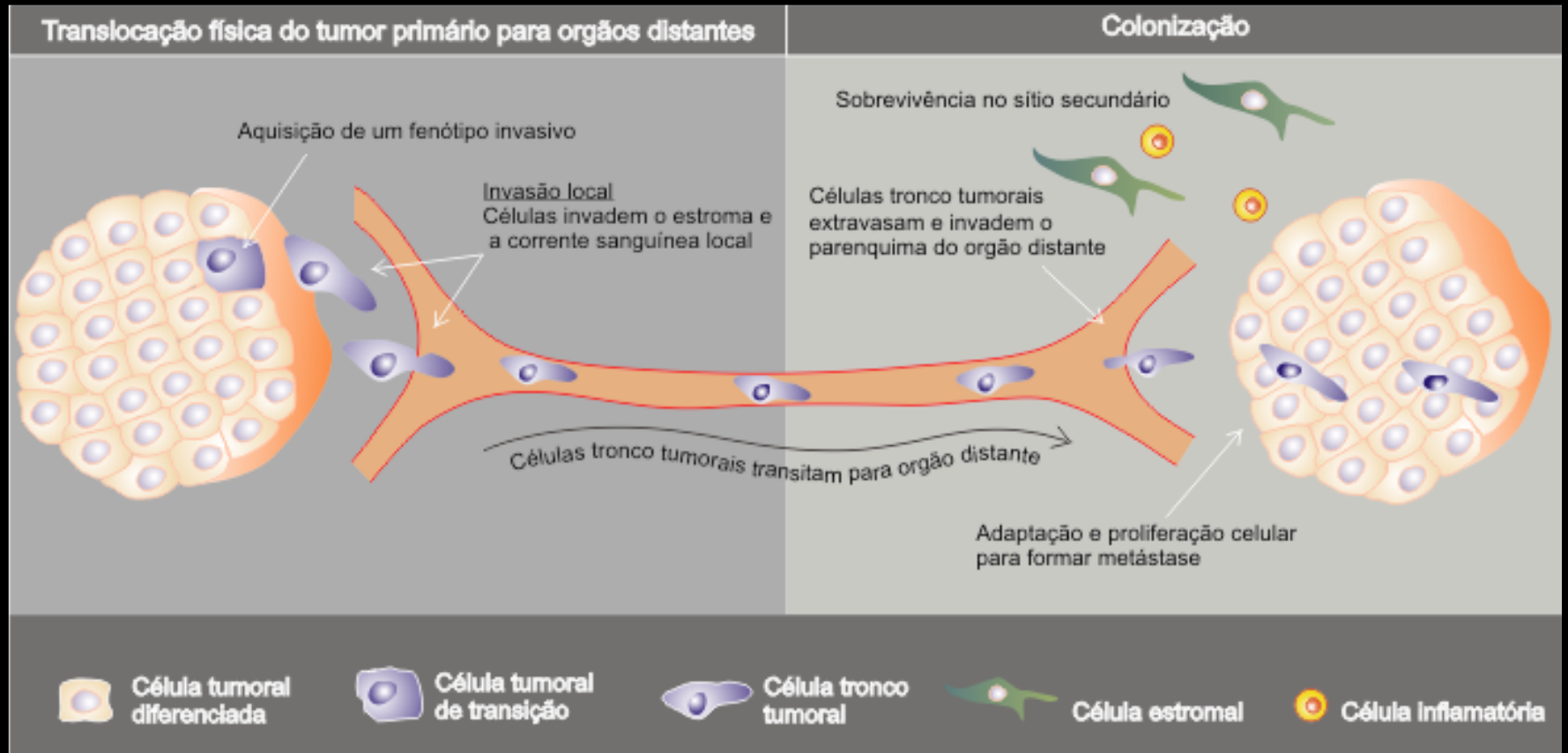
**Dependência de Ancoragem**

**Possuem Inibição por Contato**

**Monocamada**

**Crescimento Celular Baixo (24 – 96h)**

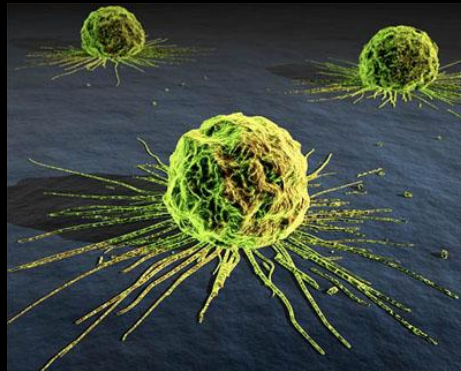
# Linhagens Celulares Contínua



# Transformação

Mudanças fenotípicas permanentes (DNA e expressão gênica).

Induzidas (Infecções por vírus ou transfecção) ou Espontâneas (Irradiação ou químicos carcinogênicos)



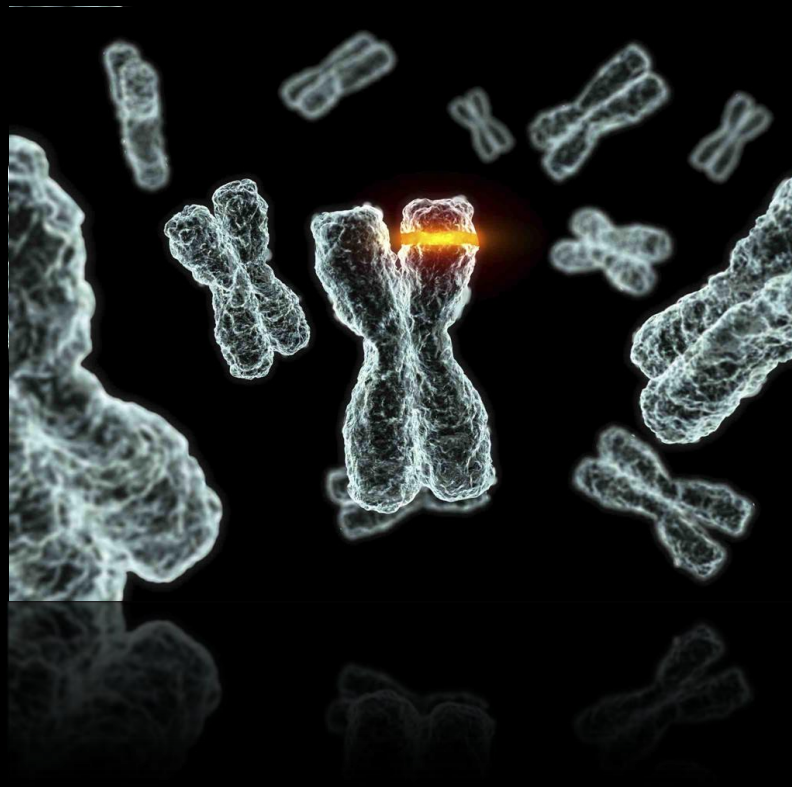
Células Tumorais

## Fenótipos:

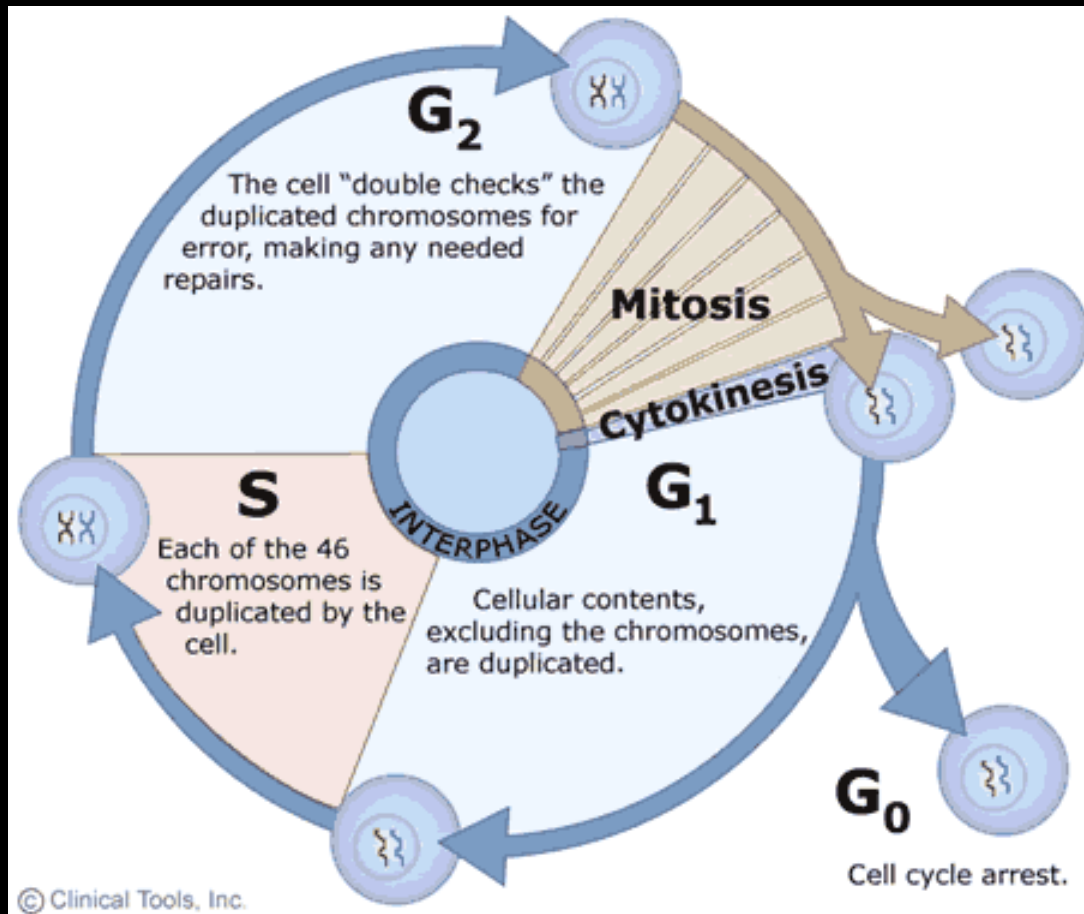
- **Imortalização** (aquisição de uma linhagem de célula contínua);
- **Aberração no controle do crescimento celular** (inibição por contato, limitação da proliferação celular por densidade celular, dependência da ancoragem);
- **Malignidade** (crescimento invasivo quando *in vivo*).

## Instabilidade Genética

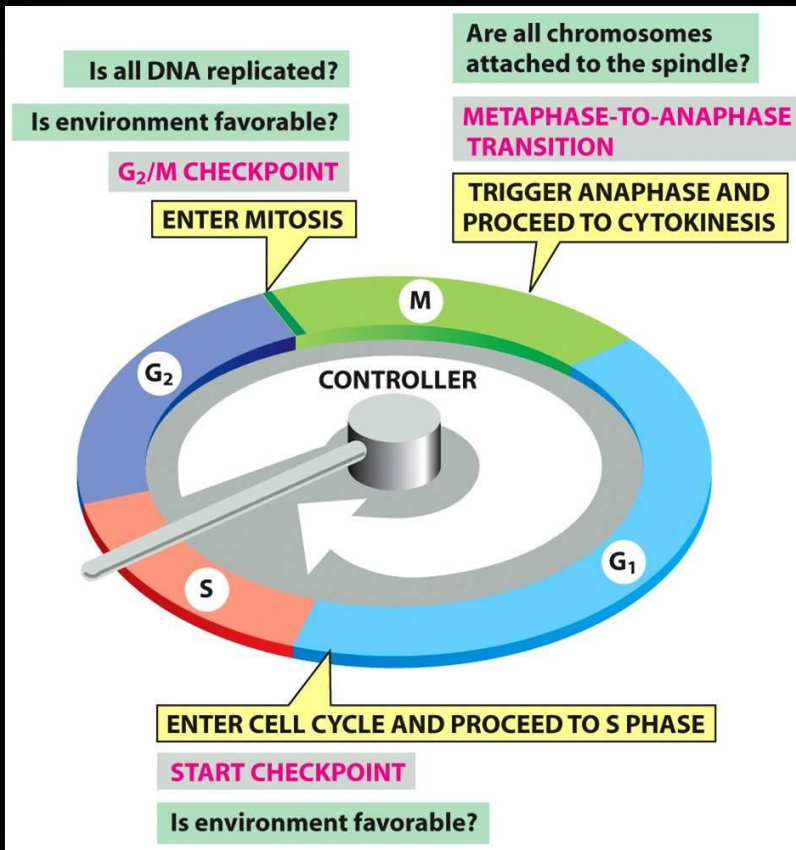
- **Reparo de danos no DNA; Correção na replicação**
- **Manutenção da integridade dos cromossomos – anomalias no cariótipo**



# Ciclo Celular



Estado de  
Inativação  
Especializado



## Pontos de Checagem

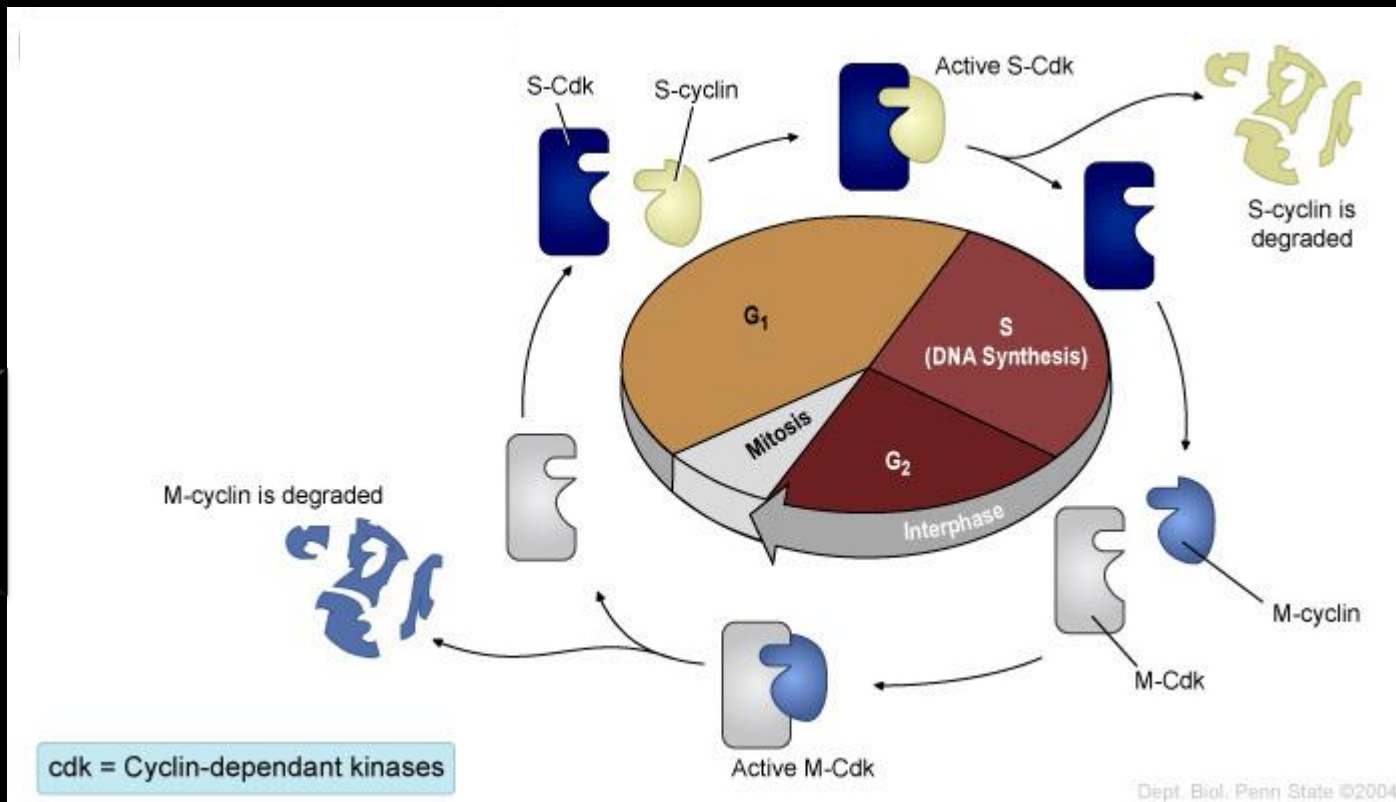
Tendem a agir por meio de sinais intracelulares negativos (interrupção do ciclo celular), em vez da remoção de sinais positivos.

Ex: Fixação do cromossomo ao fuso mitótico



# Ciclo Celular – cinases dependentes de ciclinas

## Proteíno-quinases

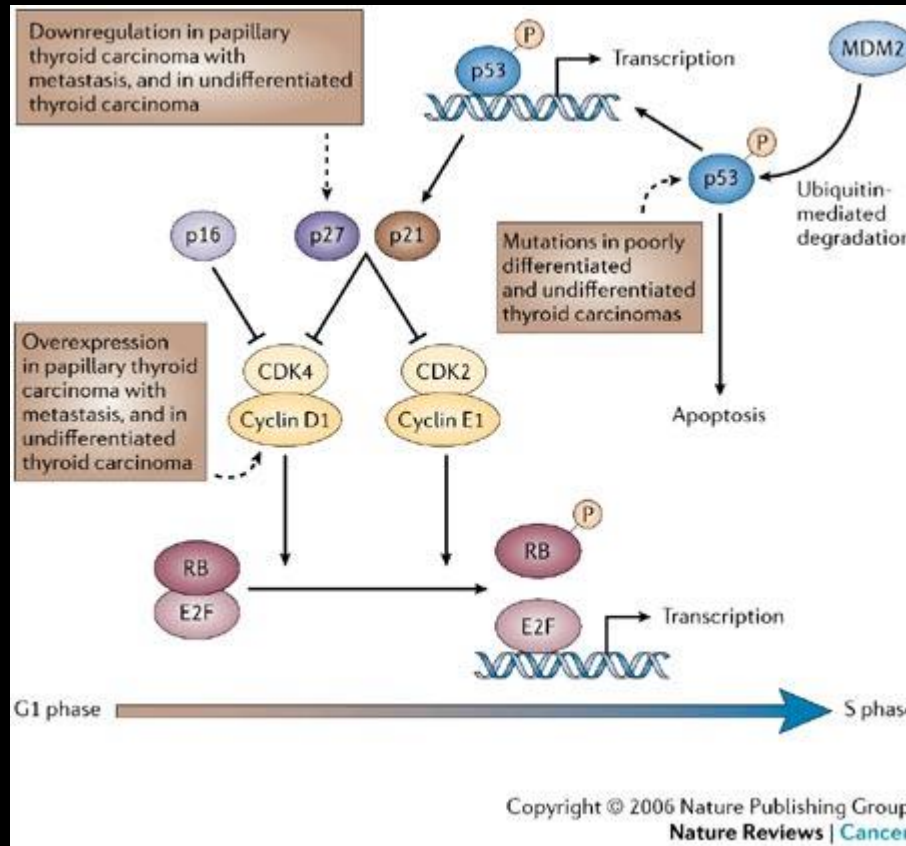


**G<sub>1</sub>/S-ciclina:** liga-se a CDKs no final de G<sub>1</sub> e permite que a célula faça a replicação do DNA;

**S-ciclina:** liga-se a CDKs durante a fase S, necessário para o início da replicação do DNA;

**M-ciclina** promove os eventos de mitose.

E2F Regulada pela  
proteína  
retinoblastoma (Rb)  
Inibido do ciclo  
celular



A atividade da  
G1-Cdk  
(ciclina D-Cdk4)  
inicia a fosforilação  
da RB.  
Liberação da E2F.

E2F  
Liga-se a região  
promotora  
de genes

G1/S-ciclina (ciclina E): liga-se a CDKs no final de G1 e permite que a célula faça a replicação do DNA;  
S-ciclina (ciclina A): liga-se a CDKs durante a fase S, necessário para o início da replicação do DNA;

# Ciclo Celular – ponto de checagem no DNA danificado

**Dois pontos de checagem: final G<sub>1</sub> (impede a entrada na fase S) e final G<sub>2</sub> (impede entrada na fase de mitose)**

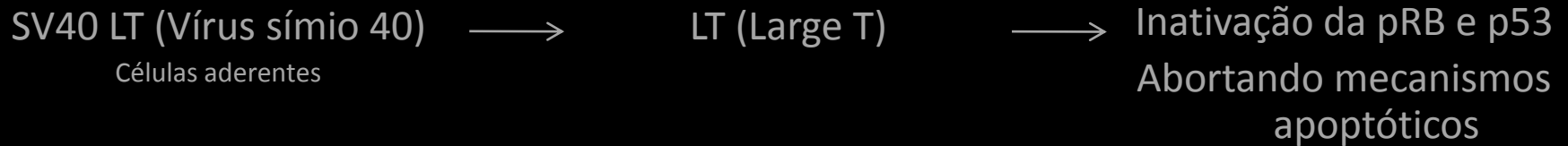
**p53**

**“guardião do genoma”**

**p53 estimula a transcrição do gene que codifica para a proteína CKI (p21) liga-se ao complexo G1/S-Cdk e S-Cdk inibindo a sua atividade – bloqueando a entrada na fase S**



# Transformação e Imortalização



Vírus do Epstein-Barr (EBV)  
Papilomavírus humano (HPV)

# Senescência da Replicação Celular

**Perda da capacidade de replicação/metabolismo celular**

**Transfecção ou infecção retroviral – antes de entrar em senescência**

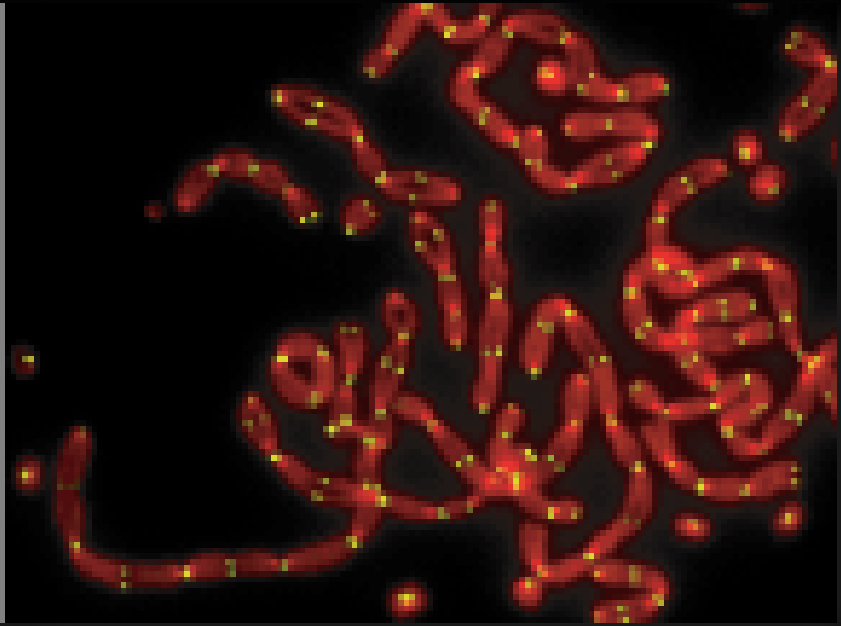
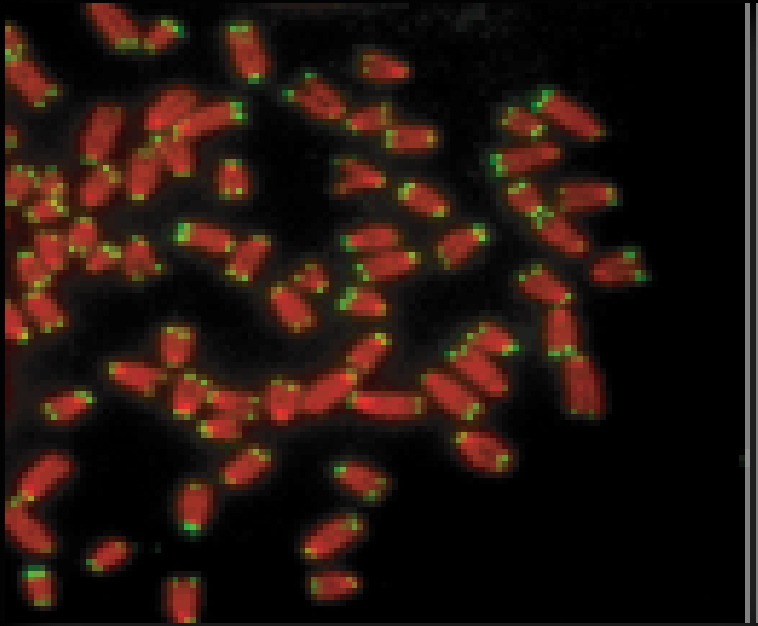
**Aumenta a sobrevivência celular por 20-30 dias**

**Crise**

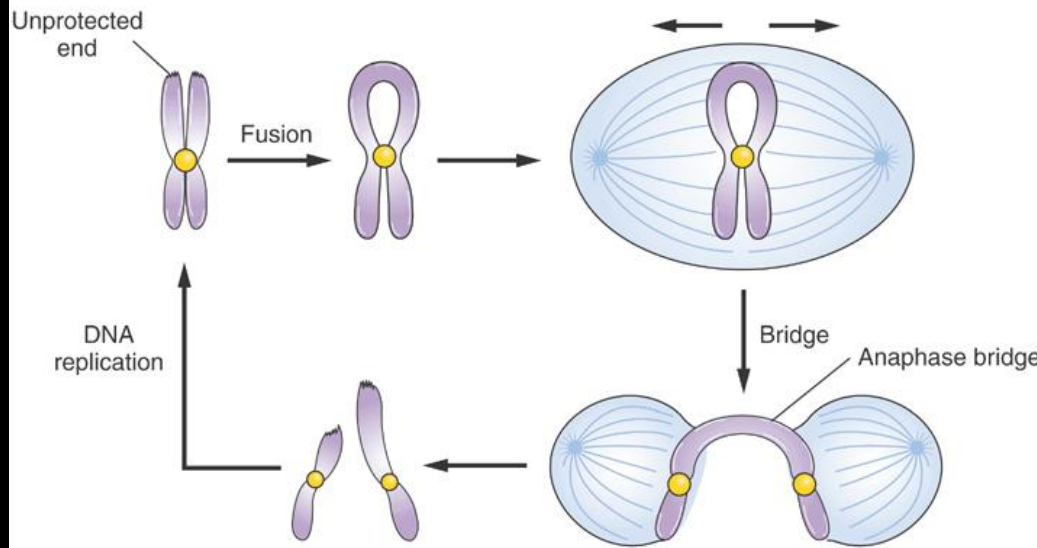
# Crise

Acarreta em apoptose





### Breakage – Fusion – Bridge Cycle



Ciclos de quebra-fusão-ponte

Aberrações Cromossômicas

Telômeros: permitem que a extremidade cromossômica seja eficientemente replicada e protege os finais dos cromossomos

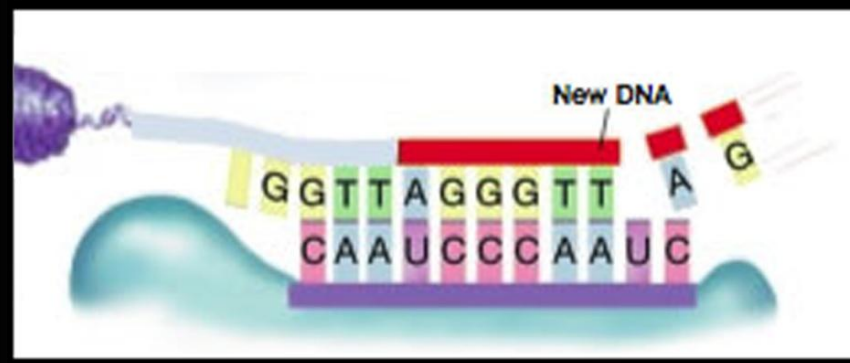
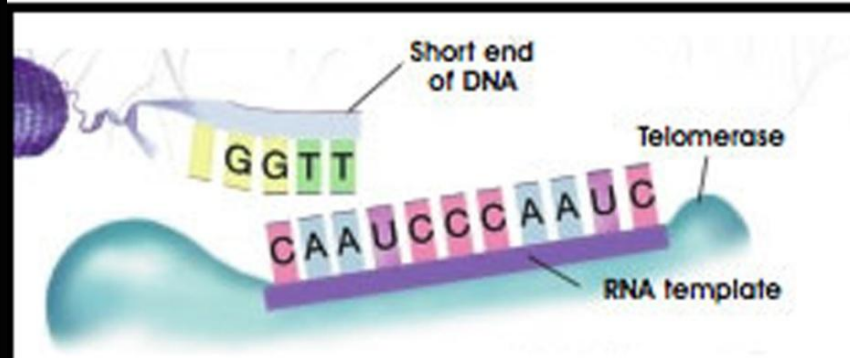
# Telomerase

Before - short telomere



hTR (componente de RNA)

hTERT (human telomerase reverse transcriptase)



After - long telomere





# Transformação e Imortalização - Telomerase

## Indução da telomerase para a imortalização

Tranfecção com o gene da telomerase  
*hTERT*

# Transformação e Imortalização - Telomerase

- Subunidade catalítica (outras subunidades RNA *hTR* suficientes.
  - Células evitam a crise
- - Células saem do processo do processo de crise

# Senescência – meio extracelular

**Perda da capacidade de replicação/metabolismo celular  
Consulta do meio externo**

**Estresse Fisiológico impõem uma limitação  
na replicação**

# Senescência – meio extracelular

Remoção do Soro antes de completa 80-90% da fase  $G_1$ ,  
irão falhar em prosseguir o ciclo celular -  $G_0$

# Cancer Research

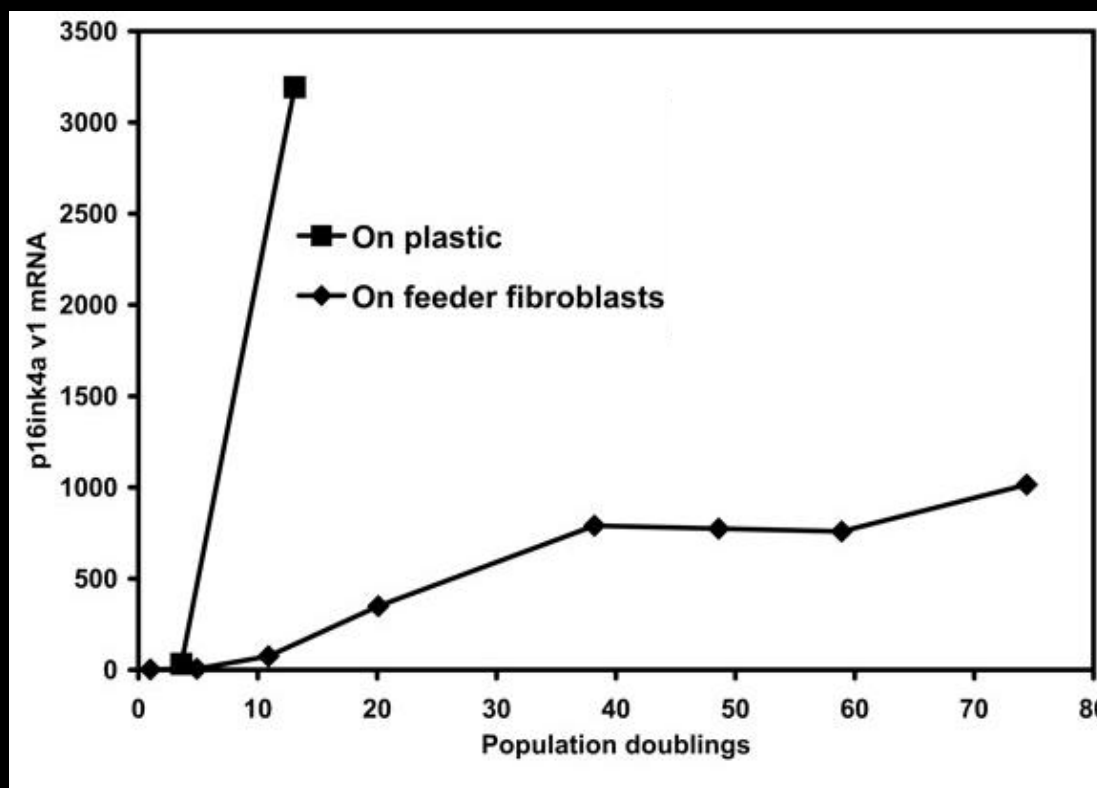
## Keratinocyte Growth Conditions Modulate Telomerase Expression, Senescence, and Immortalization by Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncogenes

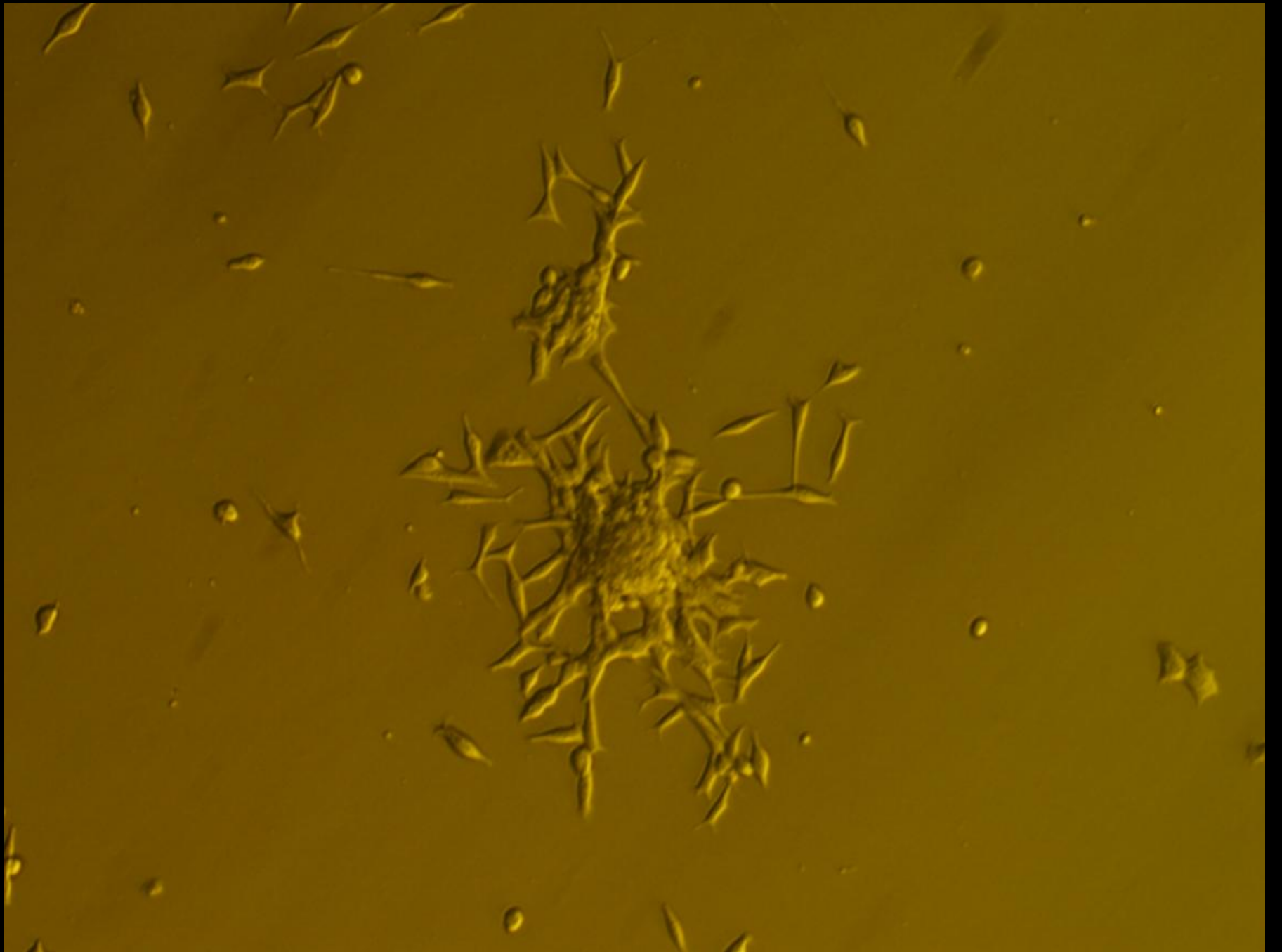
Baojin Fu, Jesse Quintero and Carl C. Baker

*Cancer Res* 2003;63:7815-7824. Published online November 21, 2003.

### Queratinócitos neonatais

P16<sup>INK4A</sup> - bloqueia a fosforilação pRb - pRb hipofosforilada pára a proliferação





# Congelamento

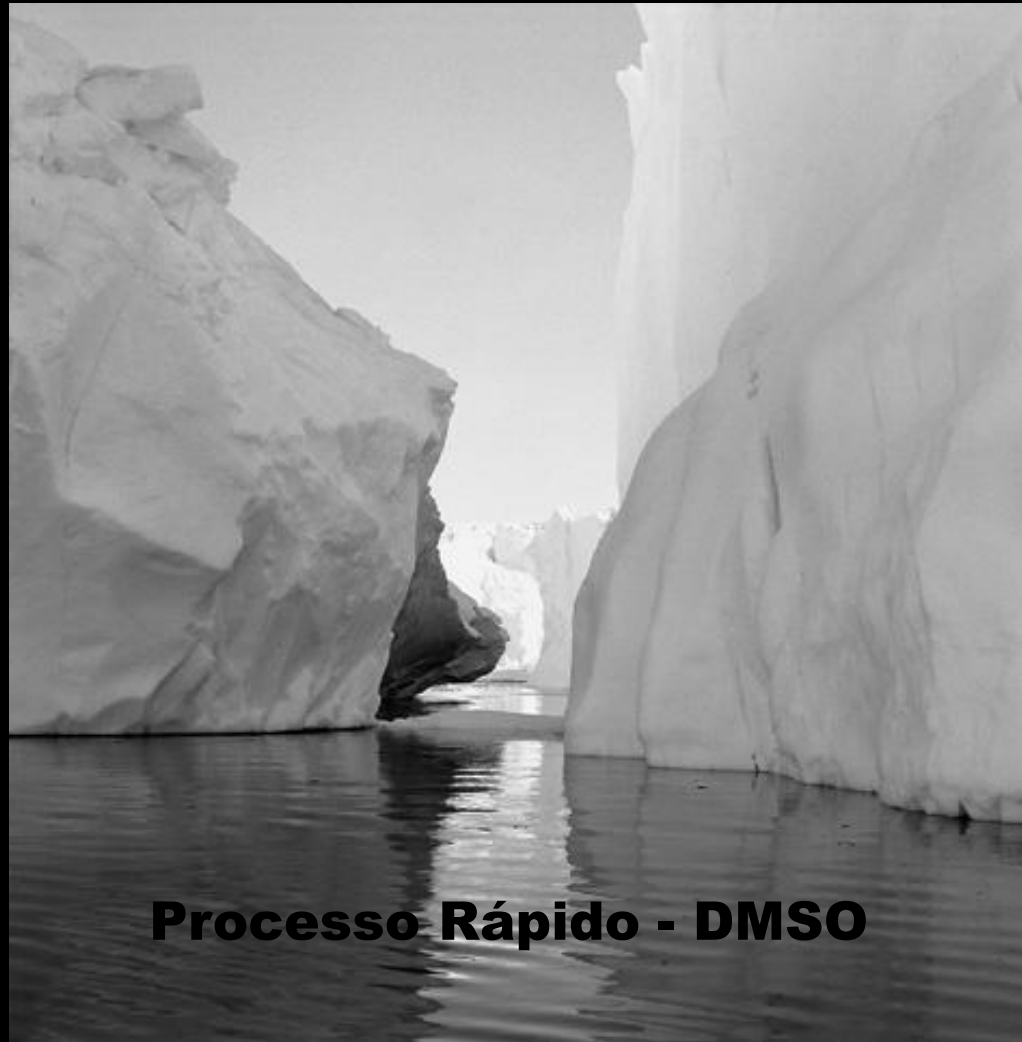
- Em linhagens finitas (5° passagem)
- 90% de viabilidade
- Sem contaminação
- Fase ativa de crescimento

Criopreservadores: DMSO,  
glicerol, polivinilpirrolidona (PVP)

1°C/min



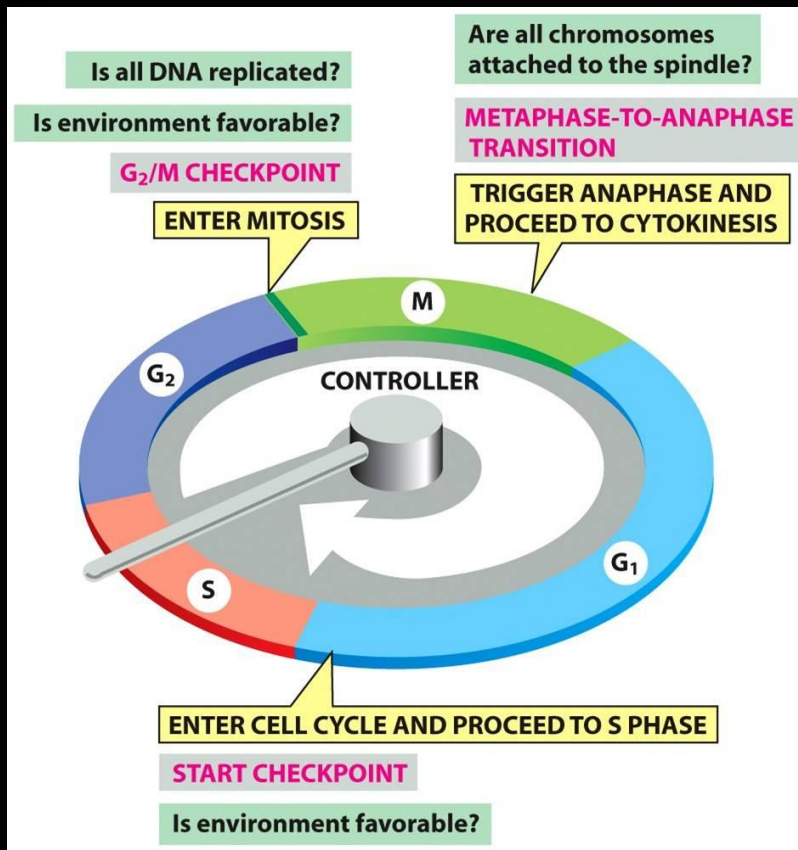
# Descongelamento



**Processo Rápido - DMSO**



# Senescência da Replicação Celular



## pRb (proteína do retinoblastoma)

hipofosforilada início e meio de G<sub>1</sub> - inibidora do crescimento

Ciclins associadas a Cinases responsáveis pela fosforilação – induzidas por sinais extracelulares

“Guardiã do Ponto de Restrição”

## Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells

(8-oxoguanine/protein oxidation/oxygen tension/ $\alpha$ -phenyl-*t*-butyl nitron/replicative life span)

QIN CHEN, ANN FISCHER, JOSHUA D. REAGAN, LIANG-JUN YAN, AND BRUCE N. AMES\*

401 Barker Hall, Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of California, Berkeley, CA 94720

Contributed by Bruce N. Ames, January 23, 1995

### Fibroblastos de Pulmão Humano

Duplicaram 50% mais em culturas com 3% de oxigênio.

As tensões mais baixas de oxigênio refletem melhor as tensões que *in vivo*

