

CULTURA CELULAR

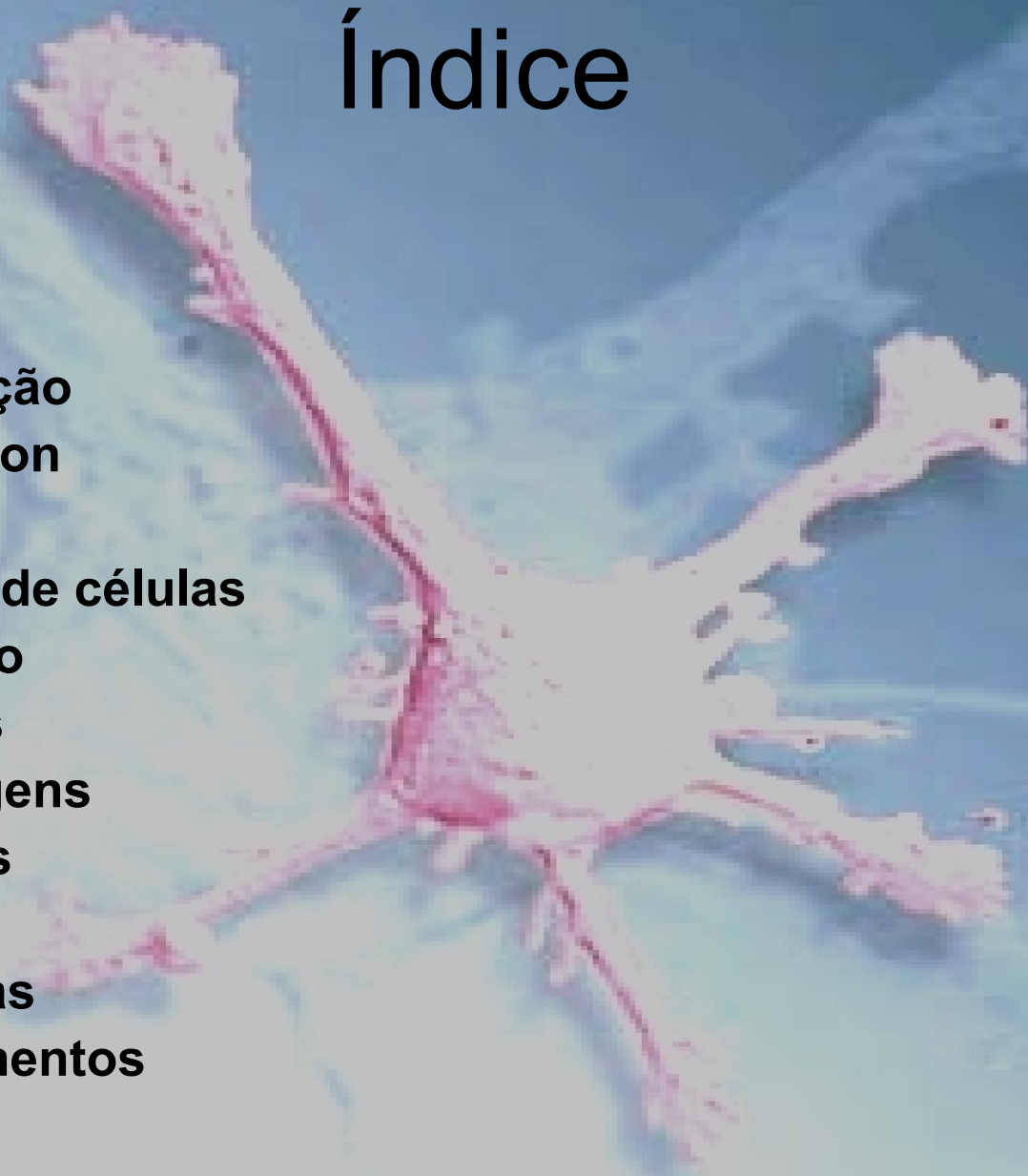
Biologia Celular e Molecular - 1º ano 2004/2005

Orientadora: Profª Doutora Delminda Neves

Diana Gonçalves; Filipa Fernandes; Hugo Oliveira; Ilidia Carmesim; Liliana Teixeira

Índice

- **O que é?**
- **História**
- **Classificação**
- **Heterocarion**
- **Hibridoma**
- **Linhagem de células**
- **Preparação**
- **Vantagens**
- **Desvantagens**
- **Limitações**
- **Exemplo**
- **Referências**
- **Agradecimentos**



O que é?

- **Conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas fora do organismo onde existem, mantendo as características próprias;**
 - **Podem fazer-se culturas a partir tecidos humanos, animais e vegetais;**
- **A cultura de tecidos implica a prévia desagregação (mecânica ou enzimática) do tecido original e em que as células são cultivadas numa camada aderente, num substrato sólido ou em suspensão em meio de cultura.**

Factos marcantes no desenvolvimento da cultura de tecidos e cultura de células

- **1885 ROUX** – células embrionárias de pinto podem ser mantidas vivas em solução salina (fora do corpo do animal).
- **1907 HARRISON** – controvérsia da neurobiologia, cada fibra nervosa é produto de uma única célula nervosa e não a fusão de muitas.
- **1910 ROUS** – induz um tumor usando um extracto filtrado de células de tumor de galinha, mostrando mais tarde conter um vírus de RNA (vírus de sarcoma de Rous).
- **1913 CARREL** – células podem crescer por períodos longos em cultura, desde que sejam “alimentadas” regularmente, sob condições assépticas.
- **1948 EARLE** – isola uma única célula da linhagem das células L e mostra que elas formam clones de células em cultura de tecidos.
- **1952 GEY** – linhagem contínua de células derivadas de um carcinoma cervical humano, que mais tarde se tornou bastante conhecida como linhagem de células HeLa.

Factos marcantes no desenvolvimento da cultura de tecidos e cultura de células

- 1954 LEVI-MONTALCINI – factor de crescimento do nervo (NGF) estimula o crescimento dos axónios em cultura de tecidos.
- 1956 PUCK – seleccionou mutantes com requerimentos de crescimento, alterados a partir de cultura de células HeLa.
- 1958 TEMIN e RUBIN – ensaio quantitativo para infecção de células de pinto em cultura, purificando o vírus do sarcoma de Rous.
- 1961 HAYFLICK e MOORHEAD – fibroblastos humanos morrem após um número finito de divisões em cultura.
- 1964 LITTLEFIELD – meio HAT para o crescimento selectivo de células somáticas híbridas. Juntamente com a técnica de fusão das células, tornando acessível a genética de células somáticas.
KATO e TAKEUCHI – planta completa de cenoura, em cultura de tecidos, a partir de uma única célula da raiz da cenoura.

Factos marcantes no desenvolvimento da cultura de tecidos e cultura de células

- **1965 HAM** – meio definido, sem soro, capaz de suportar o crescimento clonal de certas células de mamíferos.
HARRIS E WATKINS – primeiros heterocarions de células de mamíferos, pela fusão de células humanas e de camundongo, induzida por vírus.
- **1968 AUGUSTI-TOCCO e SATO** – adaptam um tumor de célula nervosa de camundongo (neuroblastoma) à cultura de tecidos e isolam clones que são electricamente excitáveis e que estendem os prolongamentos nervosos.
- **1975 KOHLER e MILSTEIN** – 1ª linhagem de células de hibridoma secretoras de anticorpos monoclonais.
- **1976 SATO** – 1ª série de trabalhos mostrando que diferentes linhagens de células necessitavam de diferentes misturas de hormonas e de factores de crescimento para crescerem em meio sem soro.

Factos marcantes no desenvolvimento da cultura de tecidos e cultura de células

- **1977 WIGLER e AXEL** – método eficiente para introduzir genes de cópia única de mamíferos em células cultivadas, adaptando um método anterior desenvolvido por Graham e Van der EB.
- **1986 MARTIN e EVANS** – isolam e cultivam células embrionárias totipotenciais do rato estaminais.
- **1998 TOMSON e GEARHART** – isolam células embrionárias humano.

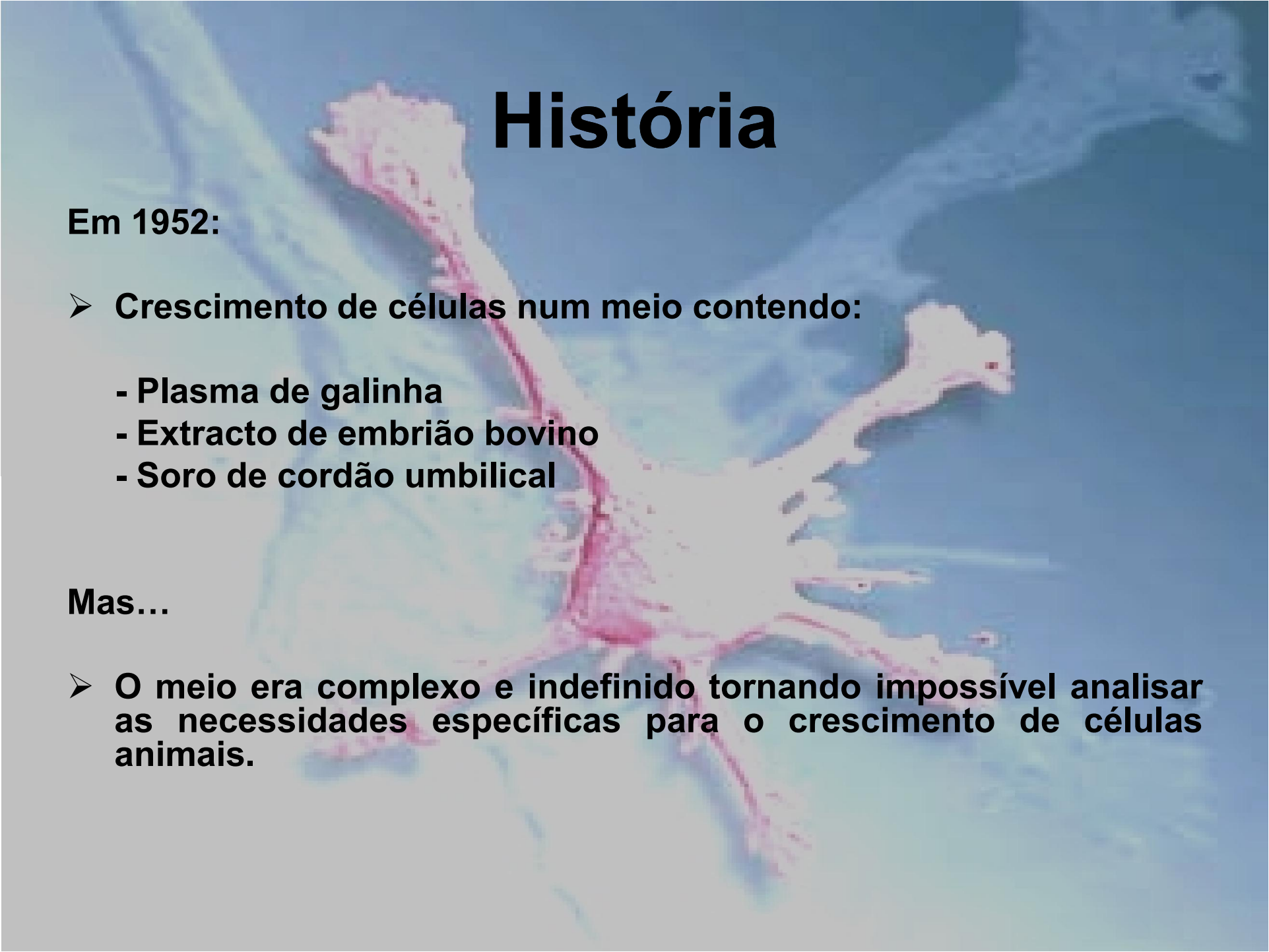
História

- Primeiras culturas foram feitas a partir de fragmentos de tecidos colocados em coágulos de plasma.
- Grande avanço (1940):
 - |
 - |
 - crescimento de linhagens celulares a partir de células isoladas que aderiam à superfície de placas de cultura

Mas...

- As células eram cultivadas em meios indefinidos: combinação de soro e extractos embrionários.

História



Em 1952:

➤ **Crescimento de células num meio contendo:**

- Plasma de galinha
- Extracto de embrião bovino
- Soro de cordão umbilical

Mas...

- **O meio era complexo e indefinido tornando impossível analisar as necessidades específicas para o crescimento de células animais.**

História

HARRY EAGLE

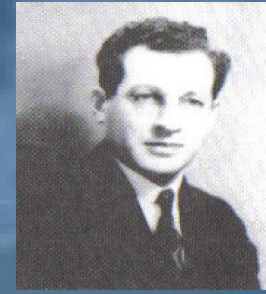


Fig.1- Harry Eagle

- Realizou uma análise sistemática dos nutrientes necessários ao crescimento de células animais em cultura;
- Estudou o crescimento de duas linhagens de células:
 - células HeLa
 - células L
- O meio em que cultivou estas células continha:
 - Mistura de sais
 - Carbohidratos
 - Aminoácidos
 - Vitaminas suplementadas com soro de proteínas

História

VARIANDO ESTES COMPOSTOS...

- Eagle determinou os necessários para o crescimento celular:
 - Sais
 - Glicose
 - 13 a.a.
 - Vitaminas
 - Juntamente com soro de proteínas
- Actualmente ainda é usado o meio desenvolvido por Eagle como meio básico para cultura de células animais.
- O seu uso permitiu aos cientistas cultivar uma ampla variedade de células sob condições experimentais definidas.

Classificação

Cultura celular

Método cada vez mais utilizado que consiste em cultivar células isoladas fora do organismo onde existe.

Há dois tipos de cultura celular:

- Cultura primária: cultura preparada directamente de tecidos de um organismo, com ou sem passo inicial de fraccionamento das células.
- Cultura secundária: as células cultivadas foram retiradas de uma cultura primária, elas podem ser repetidamente subcultivadas desta forma, por semanas ou meses.

Heterocarion

- É possível fundir uma célula com outra para formar uma célula combinada, com dois núcleos separados;

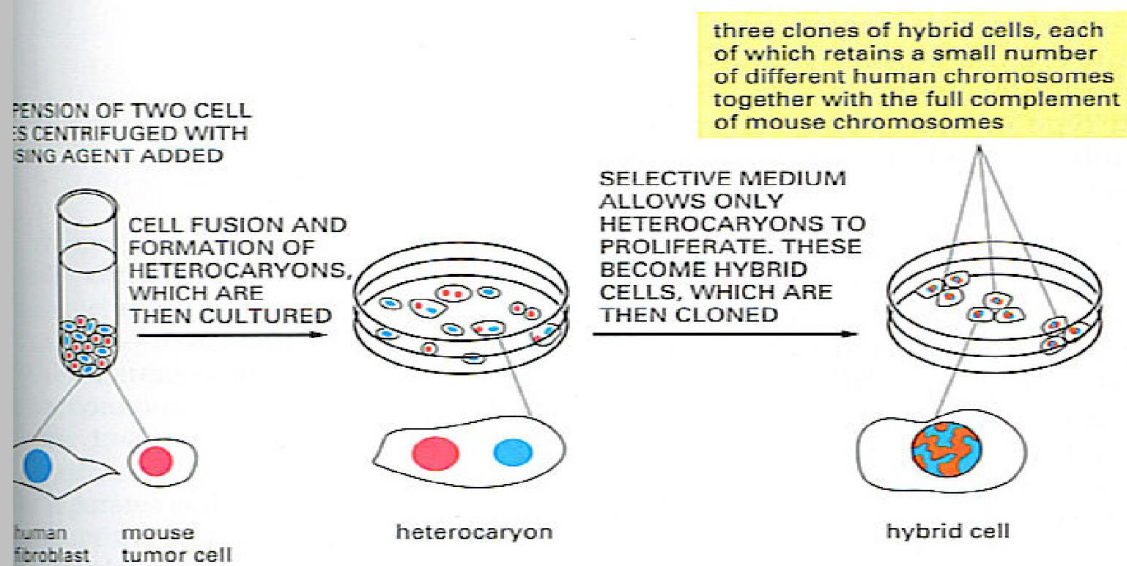


Figure 8-5 The production of hybrid cells. Human cells and mouse cells are fused to produce heterocaryons (each with two or more nuclei), which eventually form hybrid cells (each with one fused nucleus). These particular hybrid cells are useful for mapping human genes on specific human chromosomes because most of the human chromosomes are quickly lost in a random manner, leaving clones that retain only one or a few. The hybrid cells produced by fusing other types of cells often retain most of their chromosomes.

Fig. 2 - Heterocario

Hibridoma

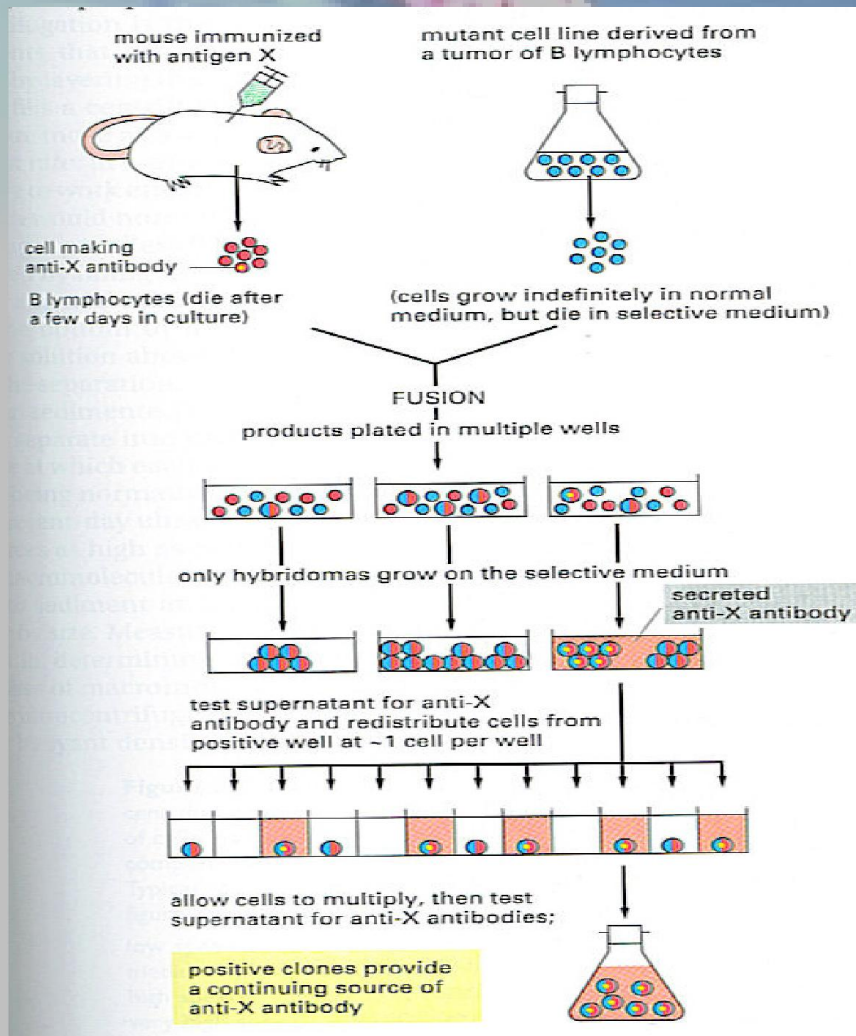


Figure 8-6 Preparation of hybridomas that secrete monoclonal antibodies against a particular antigen. Here the antigen of interest is designated as "antigen X." The selective growth medium used after the cell fusion step contains an inhibitor (aminopterin) that blocks the normal biosynthetic pathways by which nucleotides are made. The cells must therefore use a *bypass* pathway to synthesize their nucleic acids. This pathway is defective in the mutant cell line derived from the tumor, but it is intact in the cells obtained from the immunized mouse. Because neither cell type used for the initial fusion can grow on its own, only the hybrid cells survive.

Fig. 3 – Hibridoma

Linhagem de células

- As células podem proliferar indefinidamente e poderão ser propagadas como uma linhagem de células;

podem ser preparadas a partir de
células cancerígenas

Linhagem de células

- Tanto as linhagens de células transformadas quanto as de células não-transformadas são extremamente úteis na pesquisa celular, como fonte de grandes quantidades de células de um tipo uniforme;
- As linhagens de células transformadas podem frequentemente causar tumores, se injectadas num animal susceptível;

Porém...

- Células de um mesmo tecido podem diferir entre si.

Linhagem de células

Assim...

- A uniformidade genética de uma linhagem de células pode ser melhorada pela clonagem celular, em que uma única célula é isolada e prolifera-se para formar posteriormente uma colónia;
- Podem ser armazenadas em azoto (N) líquido a -196°C , por um período muito longo e continuarem viáveis, quando descongeladas.

Exemplos de cultura de células

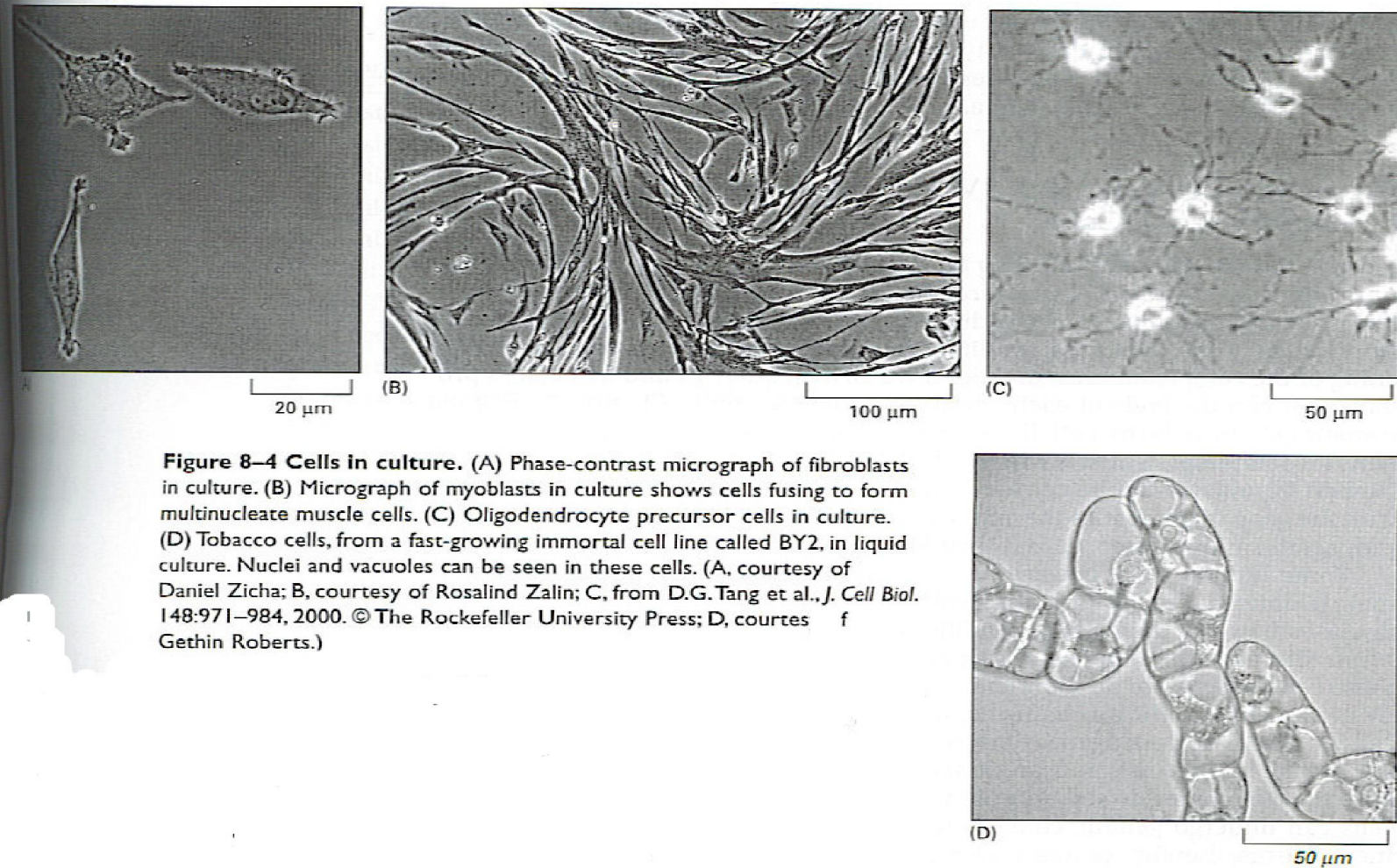


Fig. 4 – Células em cultura

Preparação

A- Isolamento

De forma a preservar mais informações sobre cada tipo individual de células, os biólogos desenvolveram meios de dissociar as células dos tecidos e separar os vários tipos;



Fig. 5 - Centrifugadora

Isolamento

- O primeiro passo consiste em romper a matriz extracelular e as junções intercelulares que mantêm as células juntas;
- As células de tecidos fetal ou neonatal são as melhores produções de células dissociáveis viáveis;

Através de tratamento:

- dissociação mecânica
- enzimas proteolíticas - (tripsina e collagenase)
- agentes - (ácido etilenodiaminotetracético, EDTA)

Isolamento

- Células grandes são separadas das células pequenas e células densas de células não densas por centrifugação fraccionada;

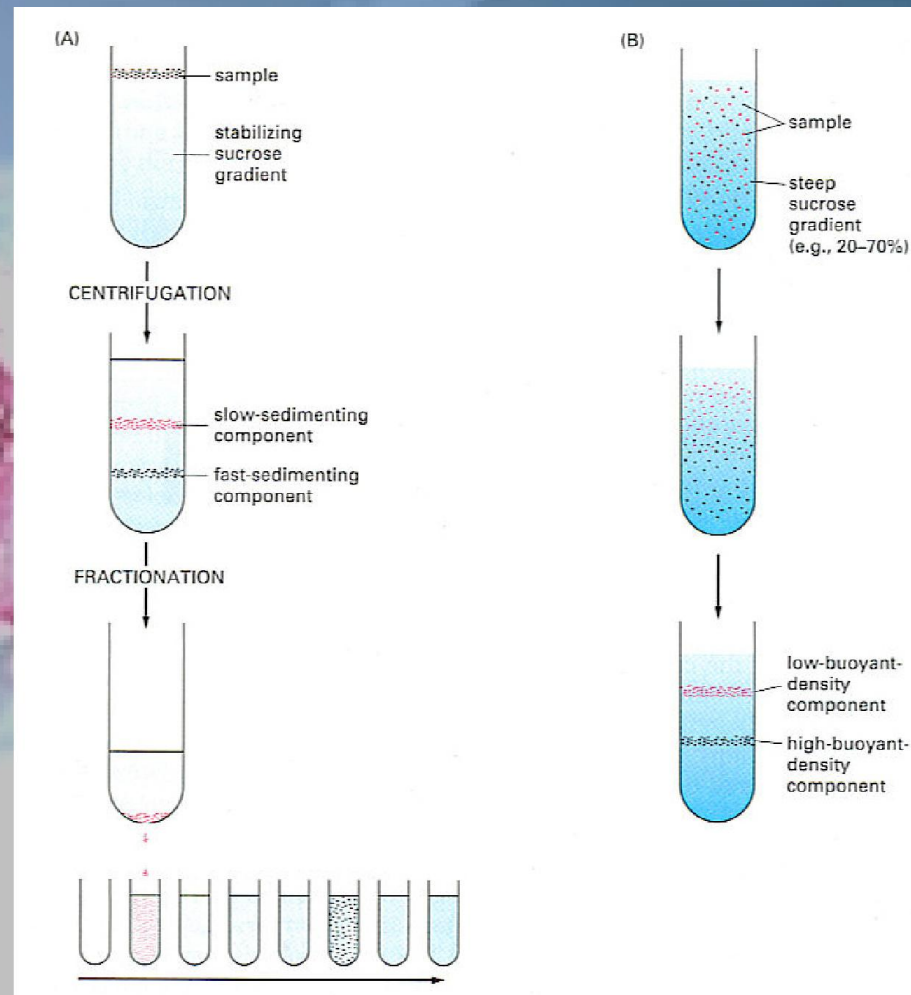


Fig.6 - Centrifugação fraccionada

Isolamento

➤ Anticorpos que se ligam especificamente à superfície de apenas um tipo de célula num tecido podem ser acopladas a várias matrizes como:

-- colagénio;

-- ésteres de polissacarídeos ou plástico ;

para formar uma superfície de afinidade, à qual somente as células reconhecidas pelo anticorpo, se aderem.

Isolamento

- **Marcação específica das células com anticorpos acoplados a um corante fluorescente, em seguida, a separação destas células marcadas das não marcadas num separador de células activado por fluorescência;**

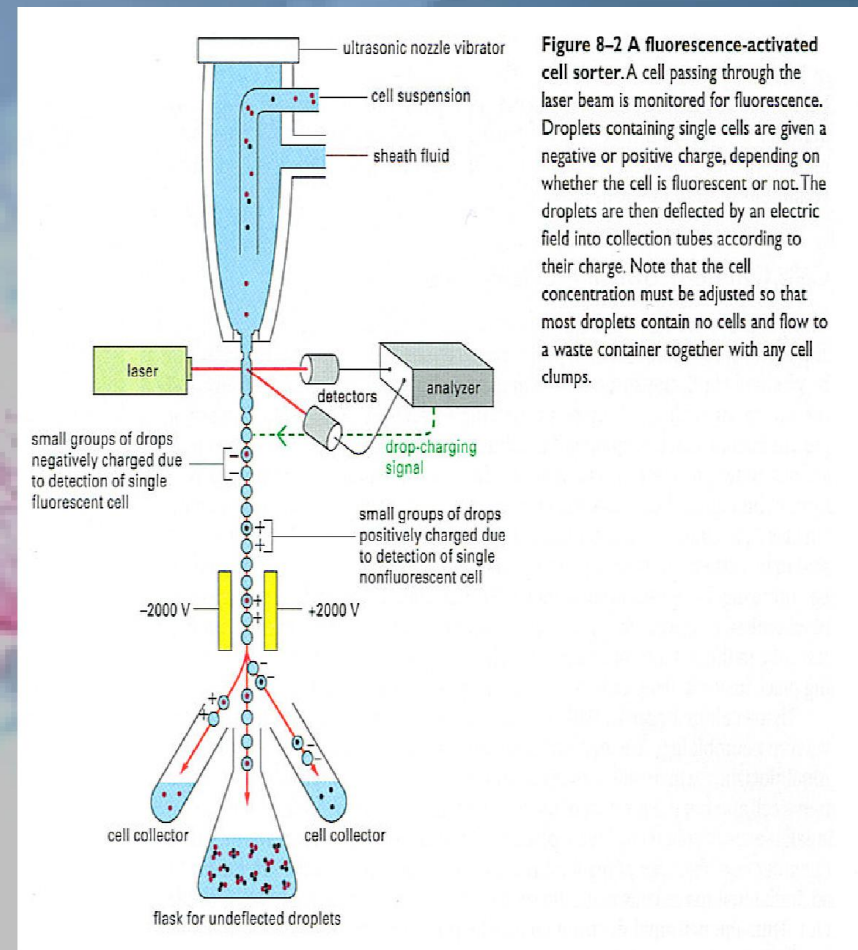


Fig. 7 – Citometria de fluxo

Preparação

B- Cultivo em placas de cultura

- Geralmente as culturas são feitas a partir de suspensão de células dissociadas de tecidos.

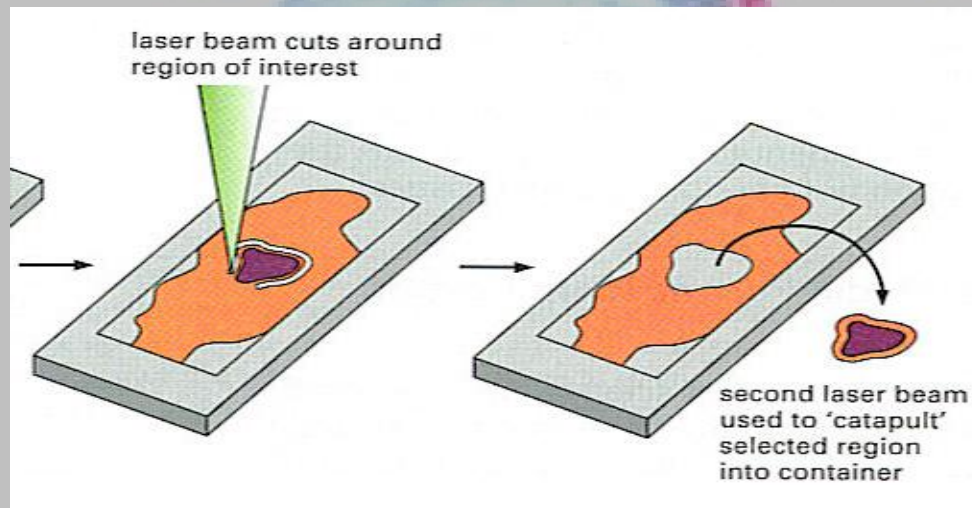


Figure 8-3 Microdissection techniques allow selected cells to be isolated from tissue slices. This method uses a laser beam to excise a region of interest and eject it into a container, and it permits the isolation of even a single cell from a tissue sample.

Fig.8 - Microdissecção

Placa de cultura

- Ao contrário das bactérias, a maior parte das células de tecidos não estão adaptadas para viverem em suspensão e necessitam de uma superfície sólida para crescerem e dividirem-se, que é agora usualmente a superfície plástica de uma placa de cultura de tecidos;
- Certas culturas celulares incluem:

Factores de crescimento

+

Transferrina

estimulam a proliferação celular

transporta ferro para a célula

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

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

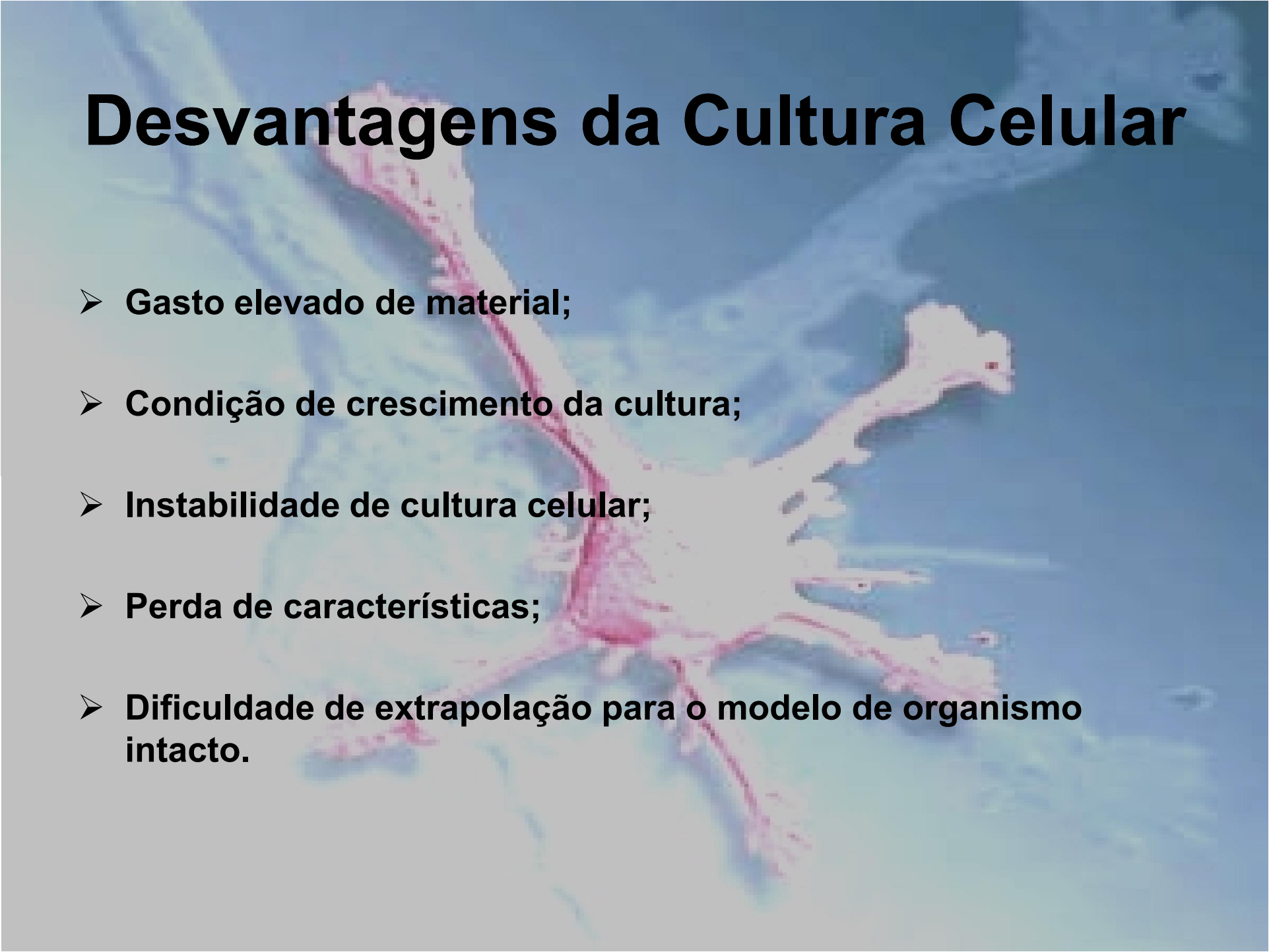
Fig.9 – Tabela de componentes de um meio típico

➤ Algumas células não crescem nem se diferenciam se a placa não estiver coberta com componentes específicos da matriz extracelular

Vantagens da Cultura Celular

- Possibilidade de estudar fenómenos, inacessíveis em tecidos intactos;
- Controlo das condições ambientais (pH, temperatura, concentração de O_2 e CO_2 , etc);
- Obtenção de células com boa homogeneidade e bem caracterizadas;
- Economia de reagentes, tempo, etc.
- Conhecimento de comportamento e função de uma população isolada de células;

Desvantagens da Cultura Celular

A microscopic image of a cell culture, showing a network of cells with prominent, branching, and elongated structures, possibly representing a specific cell type or a particular stage of growth. The cells are stained, likely with a pink or red dye, and are set against a light blue background.

- **Gasto elevado de material;**
- **Condição de crescimento da cultura;**
- **Instabilidade de cultura celular;**
- **Perda de características;**
- **Dificuldade de extrapolação para o modelo de organismo intacto.**

Limitações

- **Necessidade de operadores experientes (com conhecimentos da técnica em condições assépticas, etc);**
- **Perda de características fenotípicas;**
- **Necessidade do uso de marcadores devido à perda de características fenotípicas;**
- **Instabilidade das células (sobretudo em linhas celulares imortais).**

Aplicações gerais da cultura celular

- **Produção de vacinas anti-virais;**
- **Compreensão de fenómenos de neoplasia;**
- **Estudo da Imunologia;**
- **Ensaio de fármacos e cosméticos *in vitro*;**

Exemplo

- **As células para análise cromossômica devem ter crescimento e divisão rápida em cultura.**
- **As células mais acessíveis são os leucócitos, especificamente linfócitos T.**
- **O procedimento seguinte, mostra como preparar, a curto prazo, uma cultura destas células adequadas para análise:**

Exemplo

- 1) Obtém-se uma amostra de sangue periférico e acrescenta-se heparina para evitar coagulação;
- 2) A amostra é de seguida centrifugada a uma velocidade que permita aos leucócitos sedimentarem-se como uma camada distinta;
- 3) Os leucócitos são colhidos, colocados em meio de cultura tecidual e estimulados a dividirem-se pelo acréscimo de um agente mitogênico (estimulante da mitose), a fito-hemaglutinina.

Exemplo

- 4) A cultura é incubada cerca de 72 horas, até que as células estejam a multiplicar-se rapidamente;
- 5) Acrescenta-se, então, uma solução diluída de colchicina, para impedir a conclusão da divisão celular, inibindo a formação de fusos e retardando a separação dos centrómeros. Em consequência, as células paradas na metáfase acumulam-se na cultura;
- 6) Em seguida, adiciona-se uma solução hipotónica para causar tumefacção nas células, alisando-as e libertando os cromossomas, mas mantendo os centrómeros intactos;
- 7) Os cromossomas são fixados, espalhados em lâminas e corados por uma de várias técnicas e prontos para análises.

Laboratório do Serviço de Biologia Celular e Molecular da FMUP

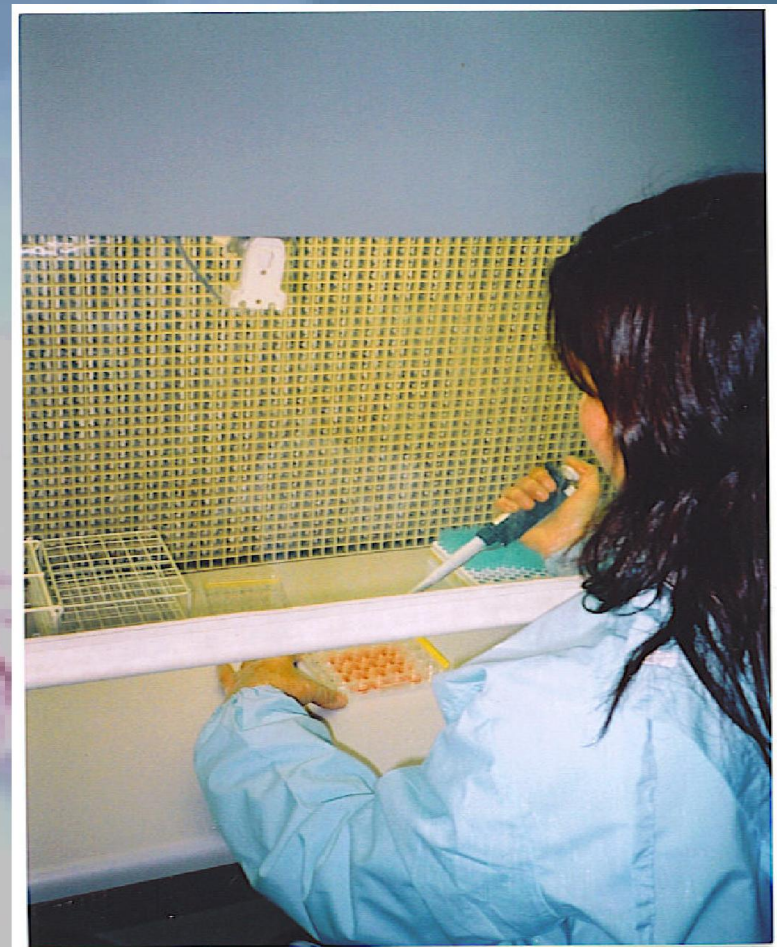


Fig.10 e 11 – Câmara de fluxo laminar