



Cultivo celular

Daniel Tait Vareschini
Engenheiro Químico M.Sc.

Motivação

- O que são culturas celulares?



Motivação

Atividade Intracelular:

Transcrição de DNA, síntese proteica, metabolismo energético, ciclo celular, diferenciação, apoptose

Produtos celulares:

Proteômica, secreção, biotecnologia, biorreatores

Imunologia:

Epítopos na superfície celular, hibridomas, citocinas, inflamação

Fluxo Intracelular:

Processamento de RNA, receptores hormonais, fluxo de metabólitos, mobilização de cálcio, transdução de sinais, tráfico de membranas

Genômica:

Análises genéticas, transfecção, infecção, transformação, imortalização, senescência

Farmacologia:

Ação de fármacos, interação entre ligante-receptor, metabolismo do fármaco, resistência a drogas

Interação Célula-célula:

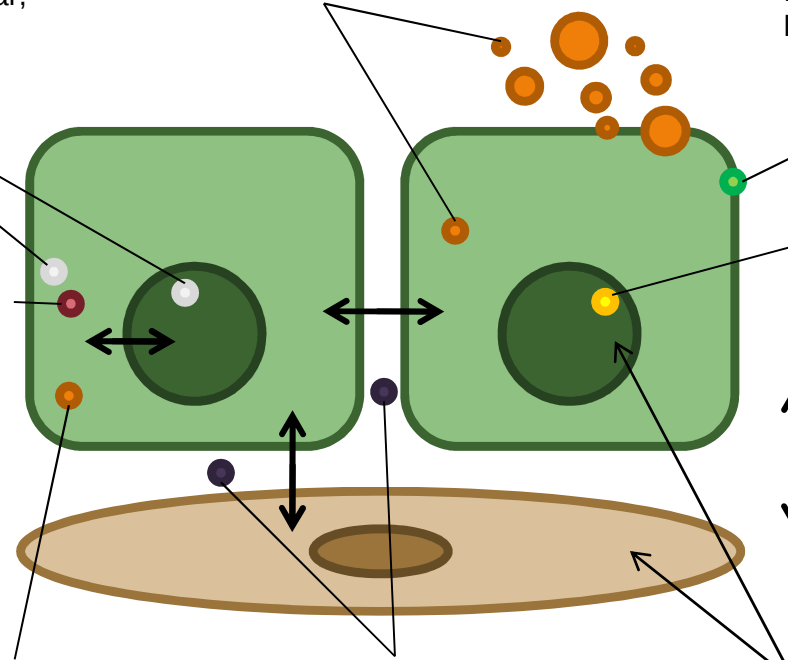
Morfogênese, controle parácrino, proliferação celular, cooperação metabólica, adesão, motilidade, interação com a matriz, invasividade

Engenharia Tecidual:

Construção de tecidos, matrizes, propagação, diferenciação

Toxicologia:

Infecção, citotoxicidade, mutagênese, carcinogênese, irritação, inflamação



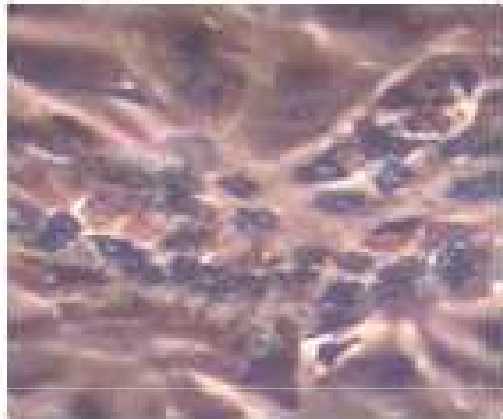
Histórico

Cultivo de células e tecidos

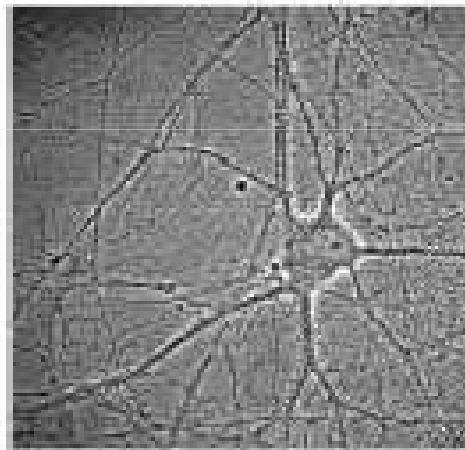
- Século 19: Sydney Ringer desenvolveu **solução salina** contendo cloreto de sódio, potássio, cálcio e magnésio para manter os batimentos cardíacos de um coração isolado fora do corpo;
- 1885: Wilhelm Roux manteve células embriões de galinha vivas em solução salina **aquecida** por vários dias;
- 1907: Ross Granville Harrison **isolou pequenos pedaços** da medula espinhal de anfíbios em coágulo linfático e os manteve por alguns dias;
- 1913: Alexis Carrel demonstra que células podem crescer por longos períodos em cultura, desde que **alimentadas regularmente**, sob **condições assépticas**.

Culturas Primárias

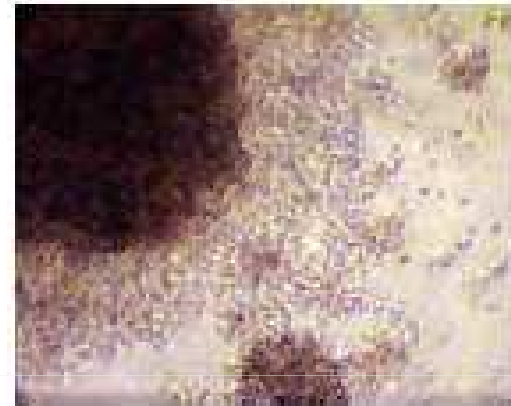
- Obtidas diretamente do tecido animal, podendo ser de origem tumoral ou não.
- Culturas de tecidos normais
 - Diplóides;
 - Dependentes de suporte;
 - Vida finita em cultura;



Células ciliadas do
epitélio nasal



Neurónios de rato
(hipocampo)



Linfócitos humanos

Linhagem celular

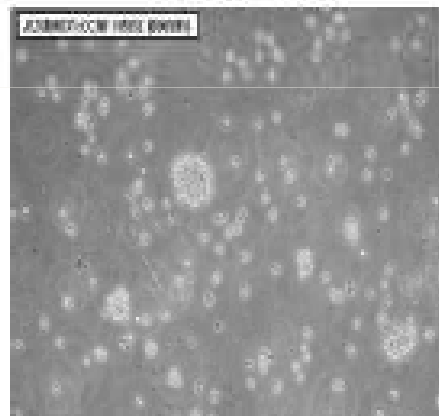
- Único tipo celular expandido
- Linhagens de vida limitada
 - Diploides;
 - Manutenção de características.
- Linhagens contínuas
 - Crescimento constante;
 - Disponibilidade ilimitada;
 - Poucas características originais.

COS-7



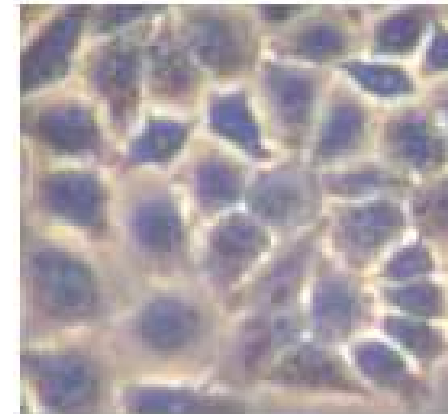
Células do
epitélio renal de
símios
transformadas
pelo vírus SV-40

HSB-2



Leucemia linfoblástica
aguda T

HeLa



Células epiteliais
de carcinoma
cervical humano

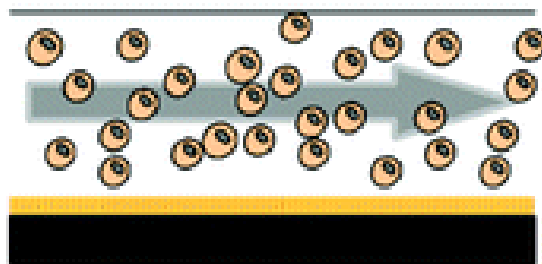
Formas de cultivo

Aderentes

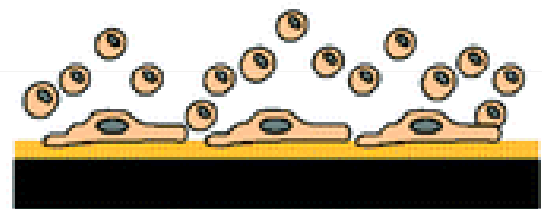


Cultura 2D

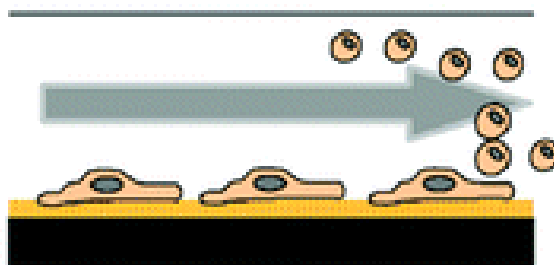
B

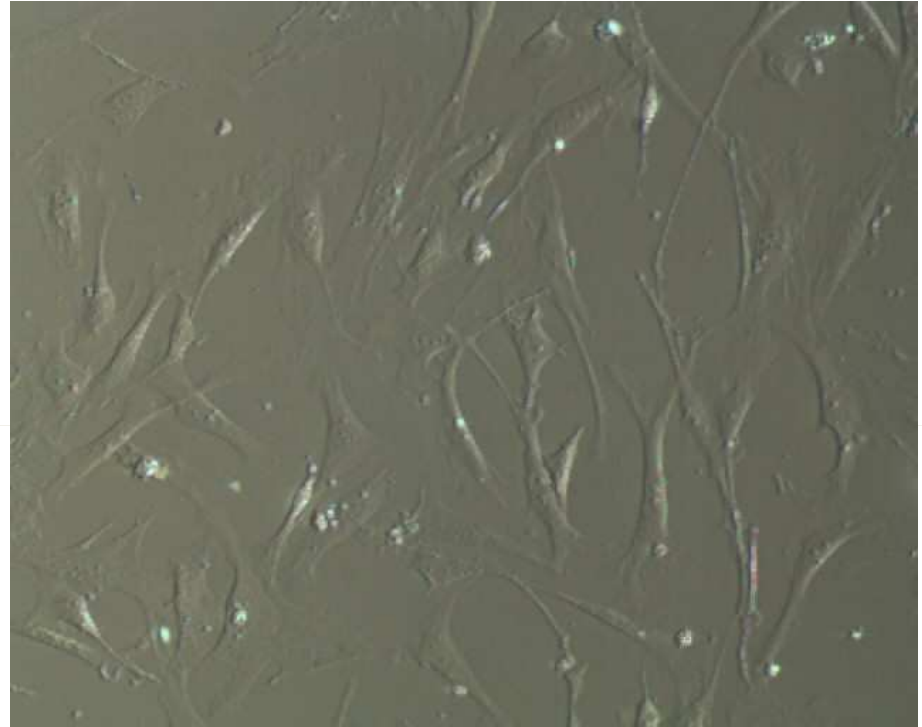
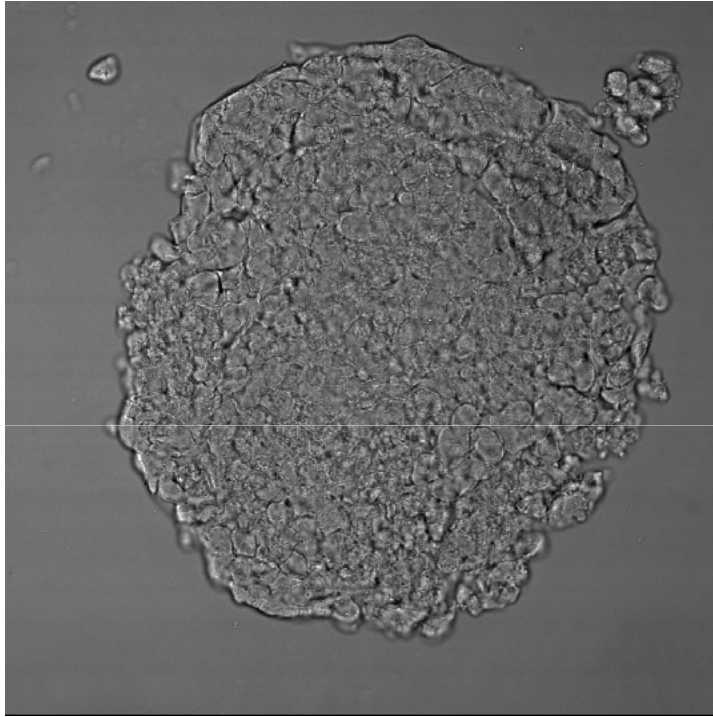


Static
incubation

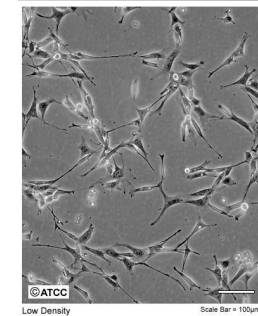
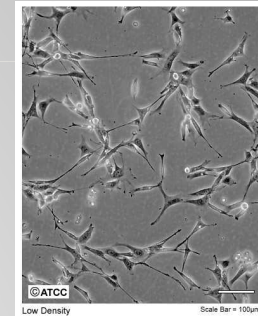
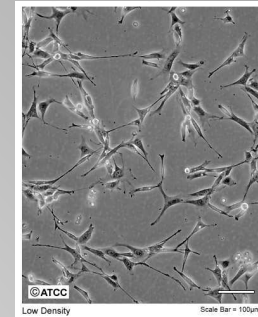
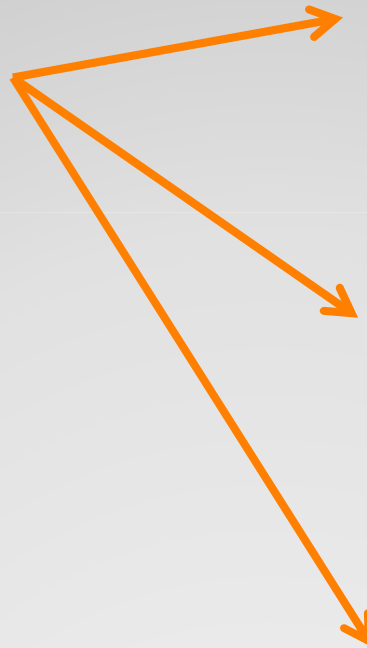
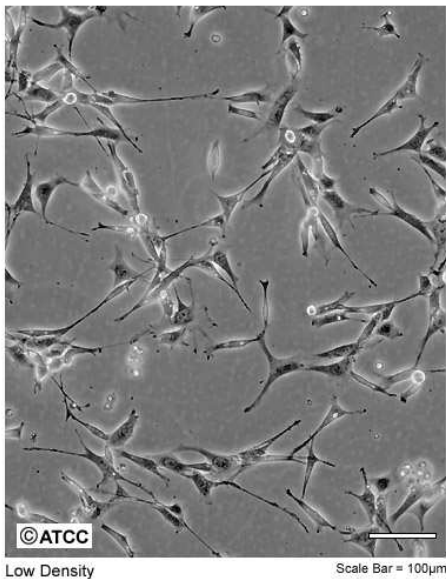


Start media
perfusion





Dissociações e passagens



Suspensão



Prototipos (50mL à 1 litro)

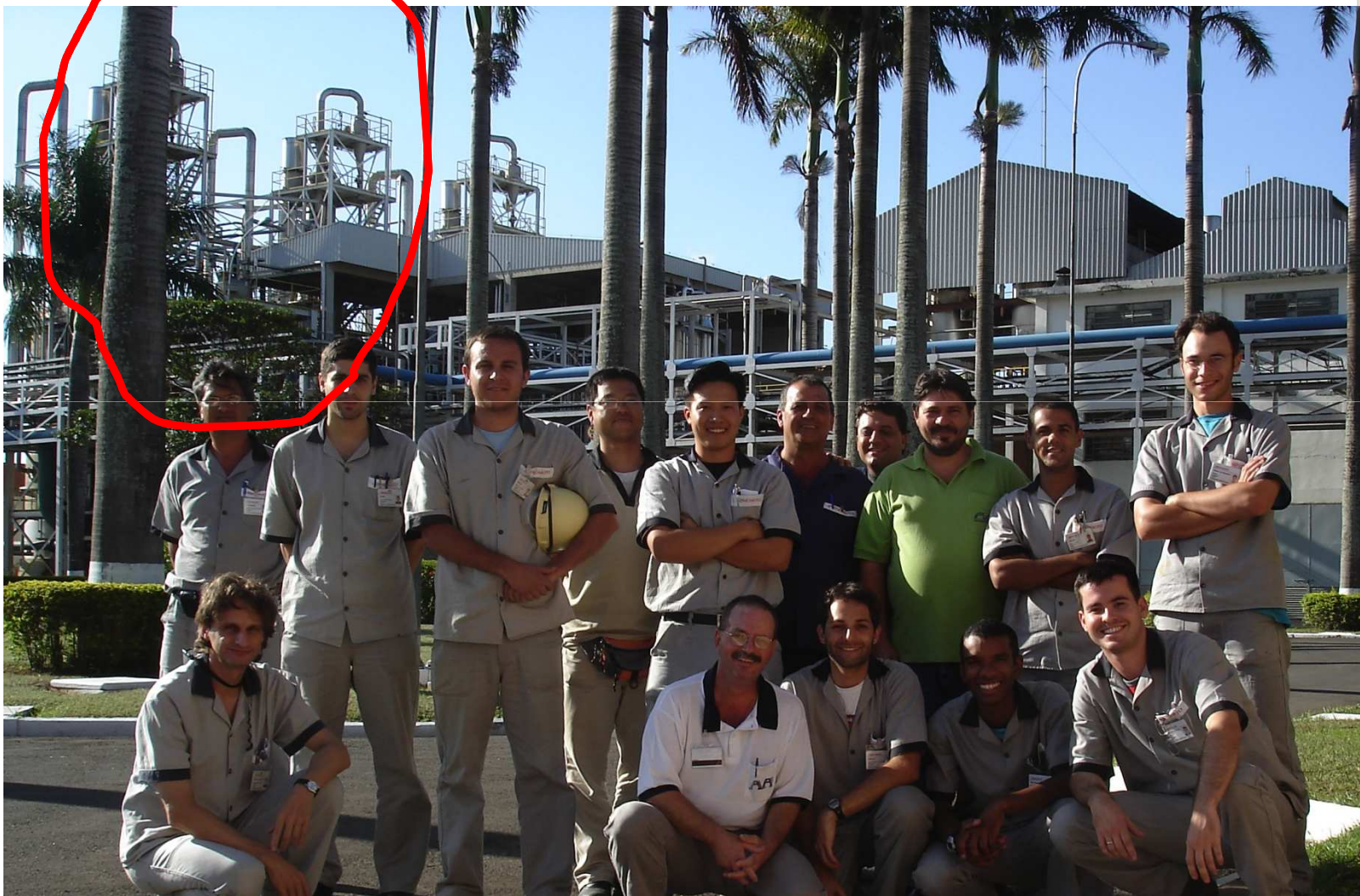


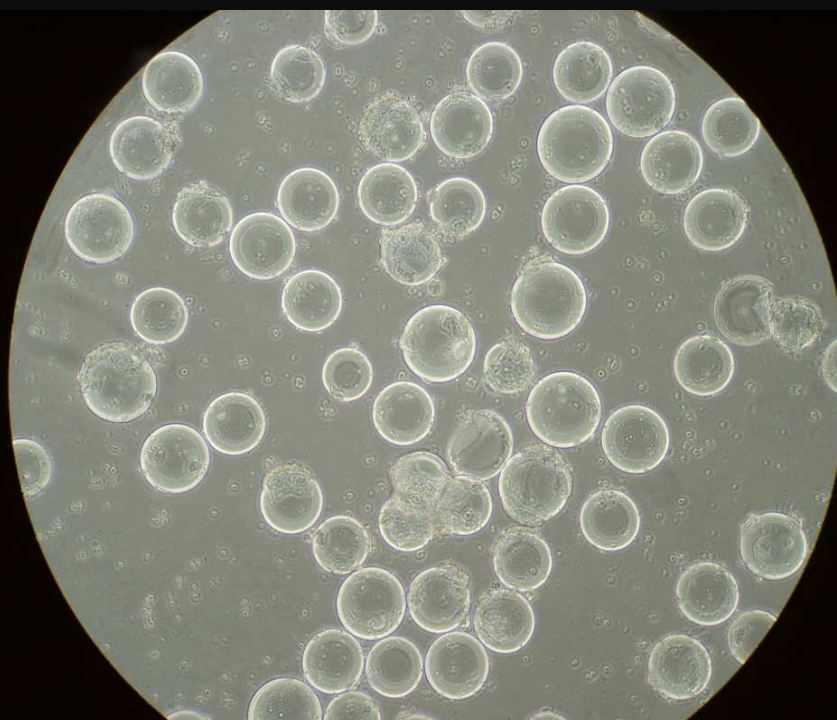
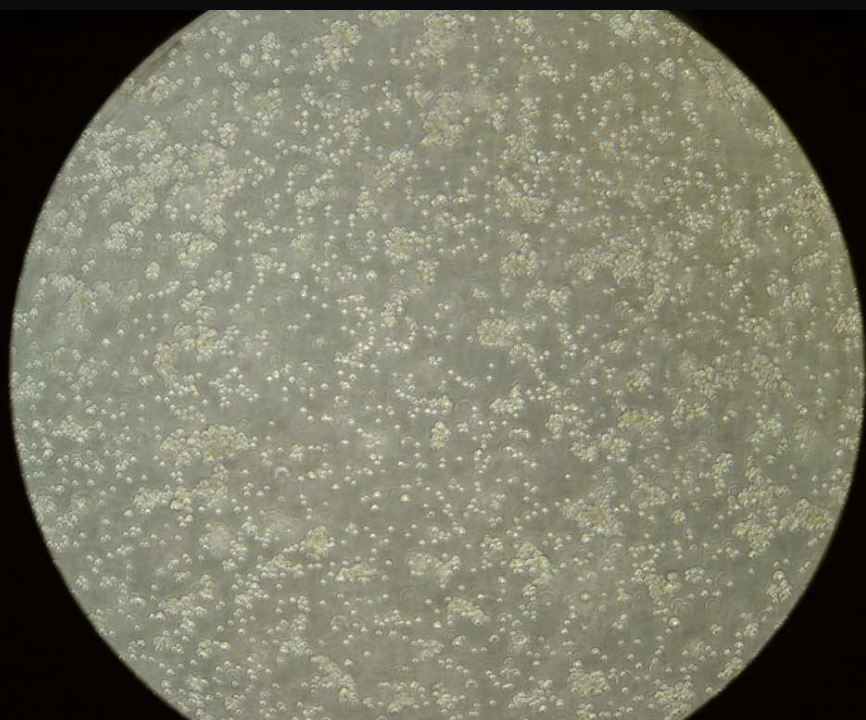
Reatores de bancada (1 a 20 litros)



Semi-industriais

50 à 500 litros





Características básicas de células

- Crescimento Lento;
- Fragilidade (ausência de parede celular);
- Necessidades Nutricionais complexas;
- Subprodutos tóxicos;
- Passíveis de contaminação.

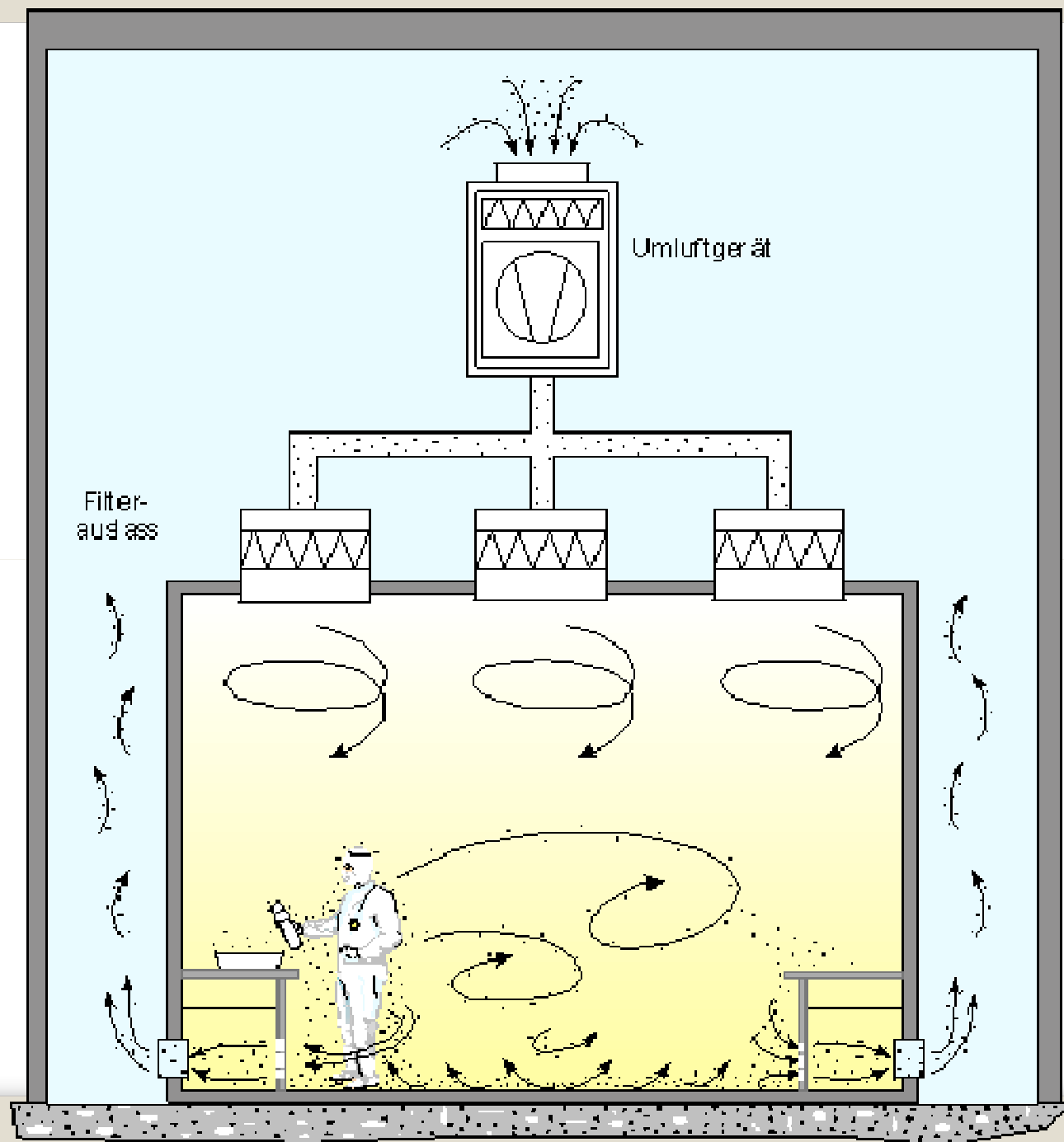
Requisitos necessários para a manutenção da cultura de células

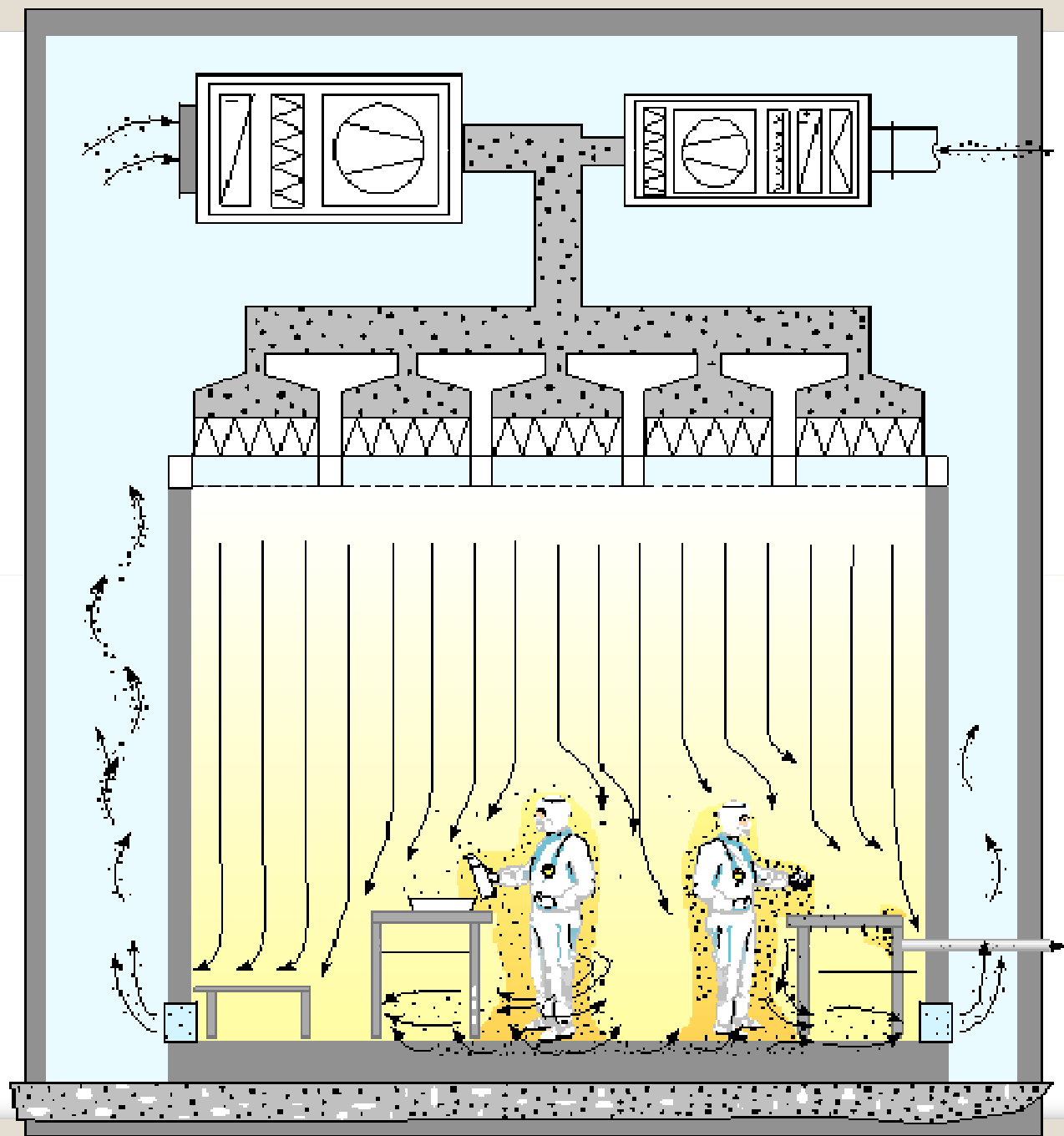
Zonas de controle

- Zona de recepção de material;
- Zona de trabalho (sala de cultura);
- Zona de lavagens e tratamento do material;

Salas de cultura







Classificação ISO

- ISO classe 8 (100.000 ou D)
- ISO classe 7 (10.000 ou C)
- ISO classe 5 (100 ou A)

Equipamentos

- Câmaras de fluxo laminar;
- Incubadoras;
- Centrífugas ;
- Microscópio.



Preservação de linhagens

- Risco de contaminação;
- Perda de características;
- Alterações genéticas;
- Perda devido a vida finita;
- Contaminação cruzada;
- Alto custo pessoal e reagentes.

Criopreservação

- Nitrogênio líquido;



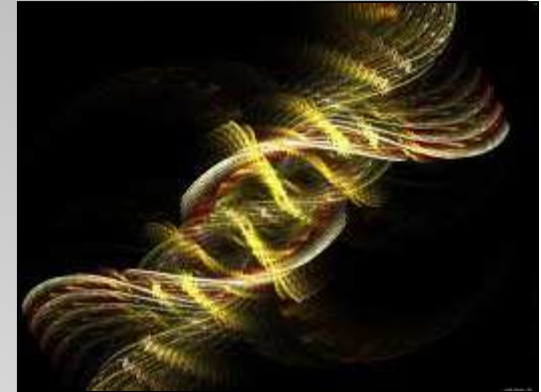
- Níveis de energia cinética tão baixos a -196°C que não permitem os movimentos moleculares.

Pré-requisitos

- Alta viabilidade $\geq 90\%$;
- De preferência em fase exponencial;
- Agentes crioprotetores
 - Soro;
 - DMSO;
 - Glicerol.

Preservação

- Perigos
 - Danos ao material genético;
 - Injúrias causadas pelo congelamento e descongelamento sucessivos
 - Estrutura de membranas;
 - Contração citoplasmática;
 - Agregação de citoesqueleto;
 - Alterações na cadeia respiratória.



Precauções

- Congelamento lento;
- Descongelação rápida;
- Compartimentos numerados;
- Identificação;
- Tanque em local ventilado;
- Treinamento para manipulação de N₂.

Bancos de células

- Banco Mestre;
- Banco de trabalho.

Meios de cultivo

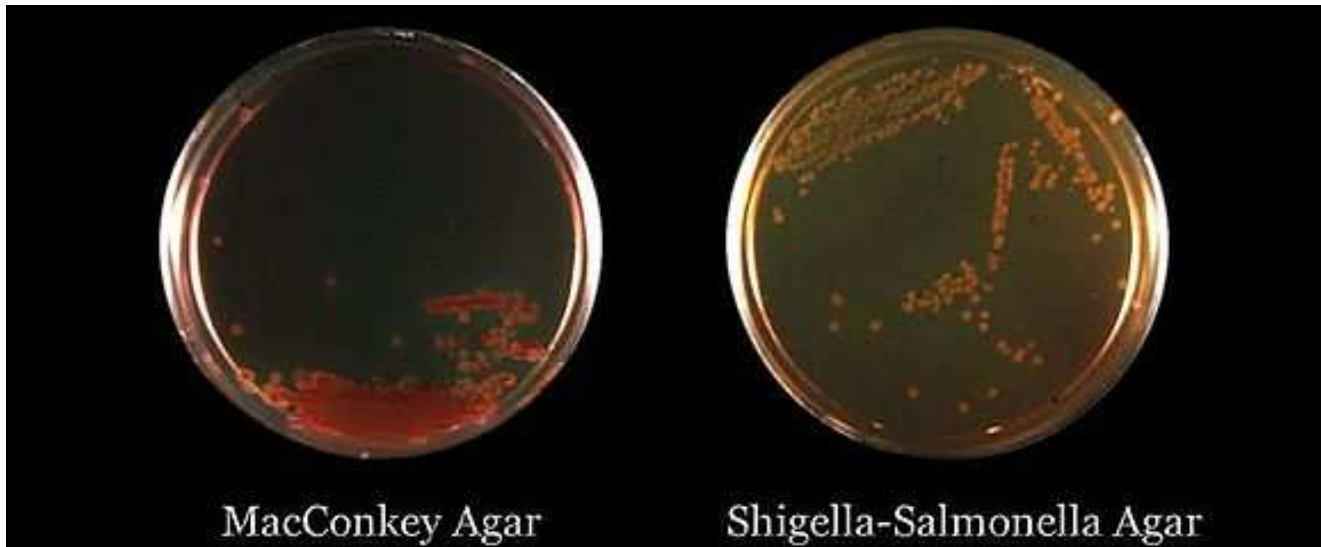
- Viabilizar o crescimento dos diversos tipos de microorganismos e células.



Meios de cultivo

- Fonte de carbono;
- Fontes de energia;
- Fonte de elementos essenciais para crescimento.

Microorganismos - Agar



MacConkey Agar

Shigella-Salmonella Agar

De uma maneira geral quanto maior a **complexidade** da célula em questão maior o seu requerimento nutricional.

Meios de cultivo

- água
- sais inorgânicos;
- açúcares;
- aminoácidos;
- vitaminas;
- Lipídios;
- ácidos orgânicos;
- proteínas;
- hormônios;
- fontes de carbono;
- fontes de nitrogênio;
- micronutrientes (íons orgânicos e minerais);

Maiores requerimentos

- Nutrição;
- Adesão celular;
- Proteção biológica (antioxidantes e antitoxinas);
- proteção mecânica para células.

Histórico

- Eagle (1955)
 - Necessidades nutricionais de fibroblastos murinos e células HeLa (Science)
 - Definiu assim um meio chamado de meio mínimo essencial de EAGLE (MEM)

Histórico

A partir dos anos 1980, células animais passaram a ser utilizadas industrialmente na produção de biofármacos.

- produtividade;
- reprodutibilidade de experimentos;
- custos de fabricação;
- especificidade de requerimentos nutricionais.

Meios mais comuns

- BME – Basal de Eagle
- EMEM – Mínimo de Eagle
- DMEM – Dulbecco – 4x aminoácidos , vitaminas
- GMEM – Glasgow – 2x aminoácidos , vitaminas + glicose e bicarboato
- RPMI – Roswell Park Memorial
- Leibovitz – fibroblastos
- Alfa MEM – varios propósitos
- Ham's F10 – embriões de galinha
- Ham's F12 – complexo de suplementos
- Ham's F14 – estudo de neurônios sensoriais
- IMDM – Iscove
- MCDB – fibroblastos humanos
- KO-DMEM

Componentes

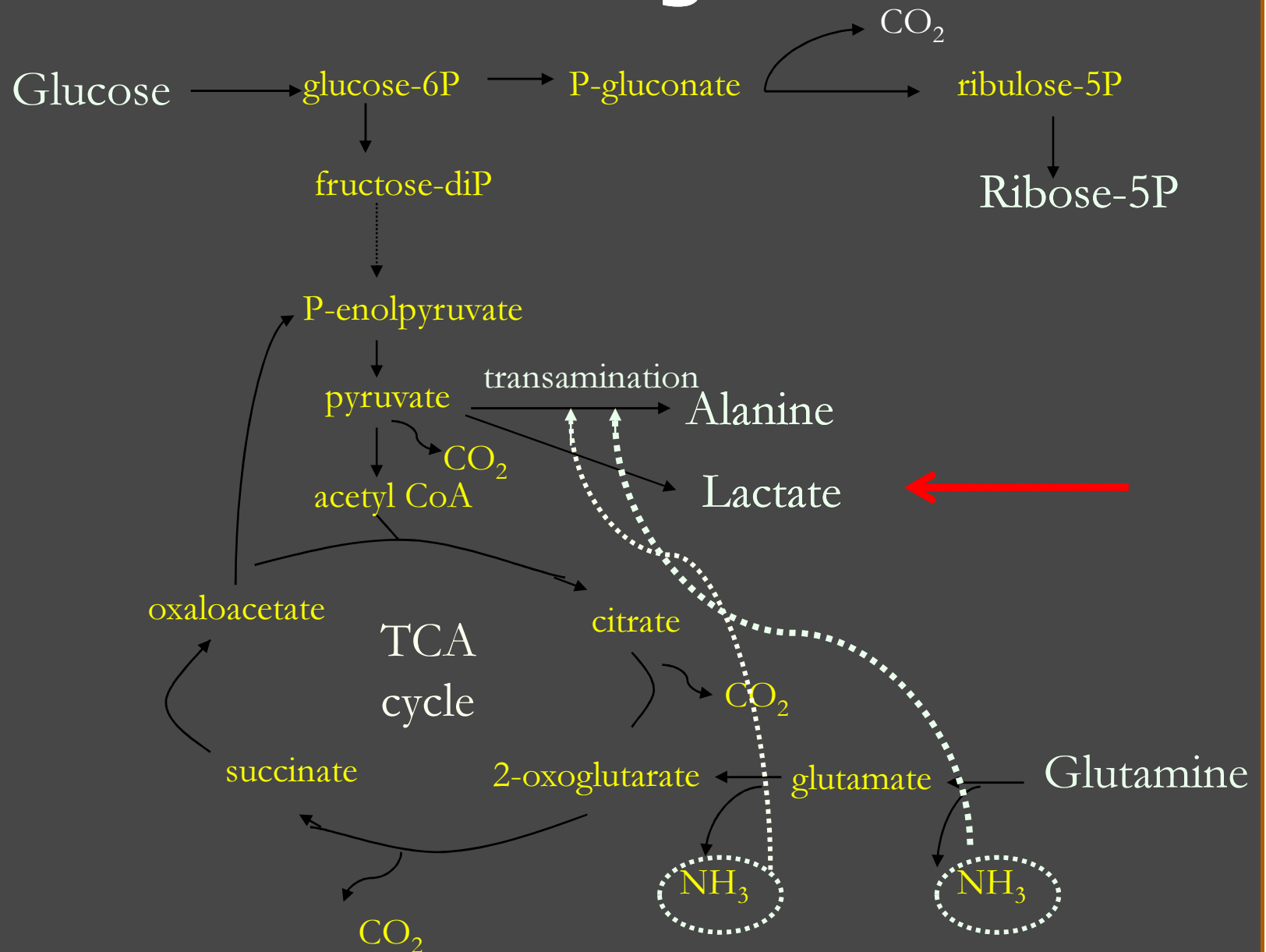
- **Glicose**

- Fonte de carbono e energia
- 5-25mM
- Alta velocidade de consumo

- **Glutamina**

- Fonte de carbono, nitrogênio e energia
- 1-5mM
- Alta velocidade de consumo

Metabolismo energético



Controle metabólico

- Amônia 2 a 4mM
 - afeta vias de transporte de K^+ , requerendo maior energia da célula para manutenção do gradiente iônico
- Lactato > 20mM
 - Aumento da acidez e osmolalidade
- Alanina;

Suplementação

- Aditivos complexos e indefinidos;
- Soro fetal bovino.



Soro fetal bovino

O soro é um suplemento COMPLEXO rico em proteínas, que estimula o transporte de glicose, fosfato e aminoácidos e aumenta a permeabilidade das membranas.

Problemas do SFB

- contaminações por parasitas, bactérias, fungos, micoplasmas, vírus e príons;
- Variabilidade lote a lote.

Cuidados no preparo de Meio

Esterilização

- Componentes termosensíveis;
- Esterilização por filtração;
- Filtros 0,22 μm .



Contaminações de cultivos

- Segurança
 - Pessoal;
 - Produto;
 - Ambiental.



Características principais

- Mudança repentina de pH;
- Turbidez do meio ;
- Deterioração da cultura: queda de viabilidade, alterações no metabolismo

Principais contaminantes

- Bactérias;
- Leveduras e fungos filamentosos;
- Protozoários;
- Virus;
- Micoplasma.

Micoplasmas

- Menores procariontes existentes capazes de se propagar livremente
- Tem cerca de $0,3\mu\text{m}$ de diâmetro e forma de *coccus*

Mycoplasmas

- *Principais problemas*
 - *Redução da velocidade de proliferação*
 - *Aberrações cromossômicas*
 - *Alteração do metabolismo*
 - *Aglutinação de células em suspensão*
 - *Resposta modificada a estímulos externos*
 - *Alteração da eficiência de transfecção*

Como eliminar

- Rastreabilidade
- Controle de qualidade
- Revisão de técnicas e procedimentos

Controles de Parâmetros fisico-químicos

Oxigenação

- Oxigênio no ar 21%;
- Células realizam principalmente glicólise;
- Geração de radicais livres;
- Morte provocada por contato.

Temperatura

- Ideal 37° C;
- Valores baixos menos danosos;
- Evitar variações bruscas;

Osmolaridade

- Manutenção da pressão osmótica
 - 260 to 320 mOsm/kg (cél. animais)
 - 340 to 390 mOsm/kg (células insetos)

pH

- 7.2 - 7.4 (células animais)
- 6.2 - 6.8 (células insetos)

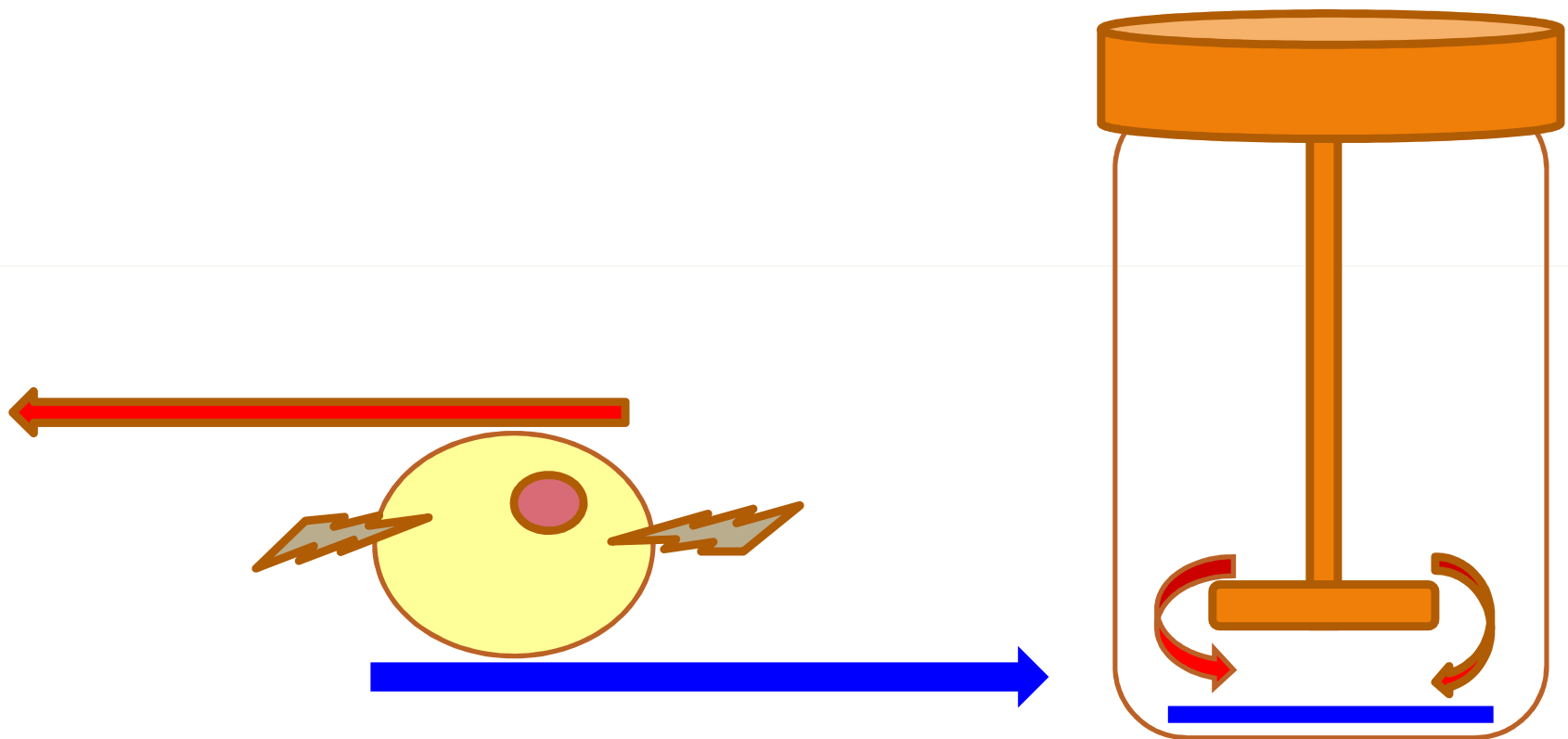
Sistema tamponante

- Bicarbonato /CO₂

Tamponamento com bicarbonato



Fragilidade a tensões



Aumento de Produtividade

- Otimização de parâmetros de crescimento;
- Otimização de meios de cultivo;
- Otimização da expressão proteica;
- Aumento de escala de cultivos.

Bibliografia

- **Tecnologia do Cultivo de células animais de biofarmacos a terapia gênica**, Angela Moraes, Elisabeth Augusto e Leda Castilho ,Ed. Roca, 2008.
- **Biotecnologia Industrial, Processos fermentativos e enzimáticos**, Urgel de Almeida Lima, Eugênio Aquarone, Walter Borzani e Willibaldo Schimidell, Ed. Edgar Blucher, 2001.
- **Cell Culture Technology for pharmaceutical and cell-based therapies**, Sadettin S. Ozturk, Wei-Shou Hu, Taylor e Francis, 2006.
- **Animal cell culture & Technology**, Michael Butler, BIOS Scientific Publishers, 2004.
- **Laboratory Procedures in Biotechnology**, Alan Doyle e J. Bryan Griffiths, Ed. John Wiley & Sons Ltd, 1998.