

OBSERVAÇÃO, MANUSEAMENTO E SUBCULTURA DE CÉLULAS VERO

Objectivos

- 1 – Observação de culturas de células VERO.
- 2 – Identificação de culturas confluentes.
- 3 – Obtenção de suspensões celulares.
- 4 – Determinação da concentração e da taxa de viabilidade de uma suspensão celular.
- 5 – Obtenção de subculturas (passagem de células).

Introdução

Vai ser utilizada uma linha celular (células VERO) que é habitualmente cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro fetal de bovino (*foetal bovine serum* - FBS) a 10%: DMEM-FBS₁₀. O pH do meio é mantido numa atmosfera com CO₂ a 5% (obtida por gazeamento ou por colocação em estufa de CO₂ com atmosfera húmida). **Alternativamente as células podem ser cultivadas em meio independente de CO₂ (Gibco) (que garante a estabilidade de pH) suplementado com FBS a 10% (meio independente de CO₂-FBS₁₀).**

As células crescem em monocamada, aderentes à superfície do frasco/placa de cultura.

A subcultura das células faz-se habitualmente a partir de culturas confluentes. As células são subcultivadas, a partir de suspensões celulares obtidas por dissociação das células da monocamada.

Todas as operações envolvidas no manuseamento das células e respectivos meios são efectuadas em condições de assepsia, com material estéril, e em câmara de fluxo laminar classe IIA.

Procedimento

- 1 – Observar os frascos ou placas com culturas celulares.
- 2 – Subcultivar as células de uma placa P6 (com 20,8 cm² de área):
 - 2.1 – Rejeitar o meio de cultura para recipiente apropriado
 - 2.2 – Lavar a monocamada celular com 1,5 mL de PBS-A, que é rejeitado após a lavagem
 - 2.3 – Adicionar 0,5 mL de agente de dissociação (*e.g.* tripsina ou TrypLE Express) e rejeitar o excesso após passagens sucessivas por toda a monocamada.
 - 2.4 – Incubar a 37°C até que as células se destaquem (2 a 5 minutos).
 - 2.5 – Adicionar 1,8 mL de meio-FBS₁₀ e ressuspender bem as células (por pipetagens sucessivas).
 - 2.6 – Contar o número de células presentes na suspensão celular (ver protocolo “[Determinação da concentração e da taxa de viabilidade de uma suspensão celular](#)”).
 - 2.7 – Calcular os inóculos a distribuir pelas placas e/ou frascos de cultura pretendidos (ver protocolo “[Subcultura de células VERO – cálculo do inóculo adequado](#)”).
 - 2.8 – Incubar a 37°C. Caso o meio de cultura seja o DMEM, colocar as culturas em estufa de CO₂ deixando as tampas dos frascos na posição que permite a ventilação.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E DA TAXA DE VIABILIDADE DE UMA SUSPENSÃO CELULAR

Objectivos

- 1 – Determinação da concentração de uma suspensão celular.
- 2 – Determinação da taxa de viabilidade de uma suspensão celular.

Introdução

O número de células de uma cultura pode ser contado. É necessário obter primeiro uma suspensão celular devidamente homogeneizada, da qual se retira uma alíquota para aplicar numa câmara de contagem.

Quando também se pretende conhecer a taxa de viabilidade dessa cultura, utiliza-se para a contagem uma alíquota da suspensão celular diluída numa solução de azul de tripano em PBS-A. O azul de tripano é um corante de exclusão que apenas penetra em células permeabilizadas (inviáveis). Após a entrada na célula atravessa o invólucro nuclear, corando os núcleos de azul.

Procedimento

- 1 – Retirar 0,1 mL da suspensão celular para um microtubo
- 2 – Adicionar 0,2 mL de azul de tripano em PBS-A e misturar bem.
(Nesta alíquota [a suspensão celular fica diluída a 1:3](#))
- 3 – Pipetar uma amostra para uma câmara de contagem (hemacitómetro), após ter montado devidamente a lamela.
- 4 – Contar os números de células **viáveis** e **inviáveis** presentes nos dois campos da câmara de contagem.
(distinguem-se as células inviáveis por apresentarem os núcleos corados de azul). Calcular as médias dos dois valores obtidos: n_v e n_i .
- 5 – Cálculos:

5.1– Calcular a concentração de células viáveis (C_v) na amostra (se diluída 1:3 em azul de tripano)

$$C_v = n_v \times 10^4 \times 3$$

5.2 – Calcular a taxa de viabilidade (T_v)

$$T_v (\%) = (n_v / (n_v + n_i)) \times 100$$

5.3 - Calcular o número de células viáveis (N_v) existentes na suspensão celular

$$N_v = C \times V$$

- **C** (concentração) é o número de células por mililitro de suspensão celular
- **n** é o número de células observado por campo da câmara de contagem, que corresponde a 10^{-4} cm^3 (mL)
- **N** é o número de células presentes na suspensão celular
- **V** é o volume da suspensão celular

SUBCULTURA DE CÉLULAS VERO – CÁLCULO DOS INÓCULOS A DISTRIBUIR

Objectivos:

Tendo em consideração o tipo de frasco/placa a utilizar e o tempo de cultura pretendido, determinar os inóculos adequados para preparação de novas culturas celulares destinadas futuramente a:

- i) Passagem de células / manutenção da linha celular
- ii) Inoculação com um vírus, tendo em vista a sua produção

Introdução

As células VERO são uma linha contínua com origem em células de rim de macaco verde africano.

São células fibroblásticas, que crescem em monocamada, a 37°C, em Meio-FBS₁₀ (DMEM-FBS₁₀ ou meio independente de CO₂-FBS₁₀).

Uma cultura confluenta tem cerca de 2,5 X 10⁵ células por cm²

O ciclo de replicação celular é de cerca de 24 horas, após uma taxa de crescimento de 1,25x ao final do primeiro dia de cultura, e de 2,5x ao final do segundo dia.

A subcultura das células faz-se habitualmente a partir de culturas confluentes, enquanto a infeção é efetuada preferencialmente em culturas subconfluentes.

As células são subcultivadas a partir de suspensões celulares obtidas por dissociação das células da monocamada (ver protocolo “[Observação, manuseamento e subcultura de células animais](#)”).

Procedimento

Utilizar a seguinte tabela para calcular os inóculos adequados à obtenção das subculturas pretendidas

SUBCULTURA DE CÉLULAS VERO

Frasco/Placa	Área (cm ²)	Nº de células na confluência	Inóculo para obtenção de cultura confluenta 3 dias após a subcultura
T25 = T24	24	6x10 ⁶	1,2x10 ⁶
T75 = T83	83	2x10 ⁷	4x10 ⁶
T180 = T175	175	4,5x10 ⁷	9x10 ⁶
Placa de 24 poços (P24)	45	1x10 ⁷	2x10 ⁶
P35 = P40	8,8	2,2x10 ⁶	4,4x10 ⁵
P60 = P58	20,8	5,2x10 ⁶	1,0x10 ⁶
P100 = P92	56,7	1,4x10 ⁷	2,8x10 ⁶
P150 = P144	145	3,6x10 ⁷	7,2x10 ⁶