

Juan Carlos Ramos Gonçalves  
Marianna Vieira Sobral  
organizadores

# Cultivo de células

da teoria à bancada

**EU** Editora  
UFPB

A microscopic image of cells, likely fibroblasts, showing a complex network of branching structures. The image is overlaid with a heatmap, where colors range from blue (low intensity) to red (high intensity), highlighting specific regions of the cells. The text is positioned in the upper right quadrant of the image.

# Cultivo de células

da teoria à bancada



**Reitor**  
**Vice-Reitora**  
**Pró-Reitor PRPG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

VALDINEY VELOSO GOUVEIA  
LIANA FILGUEIRA ALBUQUERQUE  
GUILHERME ATAÍDE DIAS



**Diretor**  
**Coordenadora de editoração**  
**Chefe de produção**

**EDITORA UFPB**

NATANAEL ANTÔNIO DOS SANTOS  
SÂMELLA ARRUDA ARAÚJO  
JOSÉ AUGUSTO DOS SANTOS FILHO

**Conselho editorial**

Adailson Pereira de Souza (Ciências Agrárias)  
Eliana Vasconcelos da Silva Esval (Linguística, Letras e Artes)  
Fabiana Sena da Silva (Interdisciplinar)  
Gisele Rocha Côrtes (Ciências Sociais Aplicadas)  
Ilda Antonieta Salata Toscano (Ciências Exatas e da Terra)  
Luana Rodrigues de Almeida (Ciências da Saúde)  
Maria de Lourdes Barreto Gomes (Engenharias)  
Maria Patrícia Lopes Goldfarb (Ciências Humanas)  
Maria Regina Vasconcelos Barbosa (Ciências Biológicas)

**Conselho científico**

Maria Aurora Cuevas-Cerveró (Universidad Complutense Madrid/ES)  
José Miguel de Abreu (UC/PT)  
Joan Manuel Rodríguez Díaz (Universidade Técnica de Manabí/EC)  
José Manuel Peixoto Caldas (USP/SP)  
Letícia Palazzi Perez (Unesp/Marília/SP)  
Anete Roese (PUC Minas/MG)  
Rosângela Rodrigues Borges (UNIFAL/MG)  
Silvana Aparecida Borsetti Gregorio Vidotti (Unesp/Marília/SP)  
Leilah Santiago Bufrem (UFPR/PR)  
Marta Maria Leone Lima (UNEB/BA)  
Lia Machado Fiuza Fialho (UECE/CE)  
Valdonilson Barbosa dos Santos (UFCG/PB)

**Editora filiada à:**



Juan Carlos Ramos Gonçalves  
Marianna Vieira Sobral  
Organizadores

**CULTIVO DE CÉLULAS**  
da teoria à bancada

João Pessoa  
Editora UFPB  
2020

Direitos autorais 2020 – Editora UFPB  
Efetuado o Depósito Legal na Biblioteca Nacional, conforme a  
Lei nº 10.994, de 14 de dezembro de 2004.  
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS À EDITORA UFPB  
É proibida a reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou  
por qualquer meio.  
A violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610/1998)  
é crime estabelecido no artigo 184 do Código Penal.  
O conteúdo desta publicação é de inteira responsabilidade do autor.

**Projeto Gráfico** Editora UFPB  
**Editoração Eletrônica  
e Design da Capa** Mônica Câmara  
Michele Holanda  
**Ilustração/capa** Pixabay

Catálogo na fonte:  
Biblioteca Central da Universidade Federal da Paraíba

---

C968 Cultivo de células: da teoria à bancada / Juan Carlos Ramos  
Gonçalves, Marianna Vieira Sobral (organizadores). - João  
Pessoa : Editora UFPB, 2020.

166 p. : il.

Recurso digital (5,88 MB)

Formato: PDF

Requisito do Sistema: Adobe Acrobat Reader

ISBN: 978-65-5942-027-8

1. Biologia celular e molecular. 2. Cultivo celular. 3. Cultura  
celular. 4. Biossegurança. 5. Criopreservação. I. Gonçalves, Juan  
Carlos Ramos. II. Sobral, Marianna Vieira. III. Título.

---

UFPB/BC

CDU 576+577.2

Livro aprovado para publicação através do Edital N° 01/2020/Editora Universitária/  
UFPB - Programa de Publicação de E-books.

**EDITORA UFPB** Cidade Universitária, Campus I, Prédio da editora Universitária, s/n  
João Pessoa – PB  
CEP 58.051-970  
<http://www.editora.ufpb.br>  
E-mail: [editora@ufpb.br](mailto:editora@ufpb.br) .  
Fone: (83) 3216.7147

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal da Paraíba e a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a viabilização desta obra.

# APRESENTAÇÃO

A evolução na área da biologia celular e molecular tem proporcionado o desenvolvimento de técnicas e ferramentas cada vez mais avançadas. O domínio das técnicas de cultivo de células em laboratório assume importância crucial no avanço do nosso conhecimento acerca das funções celulares em nível molecular, celular e até mesmo nos eventos fisiopatológicos, alavancando o avanço na compreensão, diagnóstico e tratamento das mais variadas enfermidades, o que possibilita o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficientes e menos danosas.

Diversas publicações têm sido propostas, com o objetivo de apresentar e difundir os fundamentos do cultivo celular adquiridos nas últimas décadas, no entanto, ainda são escassos ou pouco acessíveis, aqueles que conseguiram aliar a teoria à prática de forma didática e com maior direcionamento à rotina diária enfrentada no âmbito do laboratório de cultivo de células.

Portanto, esperamos com este trabalho, disponibilizar um guia básico e, ao mesmo tempo, atualizado sobre as principais técnicas envolvendo o cultivo celular e as rotinas determinantes para o bom desempenho de um laboratório de cultura de células. Dessa forma, a obra apresentada destina-se à um amplo público, compreendido por pesquisadores, profissionais e técnicos, além de estudantes de graduação e pós-graduação, inseridos nas grandes áreas das ciências da saúde, biológicas, biotecnologia e áreas correlatas.

*Juan Carlos Ramos Gonçalves*

*Marianna Vieira Sobral*

Organizadores

*As células de Henrietta agora vivem fora do corpo dela,  
há muito mais tempo do que jamais viveram dentro dele”.*

**Rebecca Skloot**

(A vida Imortal de Henrietta Lacks)



# SUMÁRIO

## **CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTOS DO CULTIVO DE CÉLULAS ..... 10**

*Daiana Karla Frade Silva*

*Rawny Galdino Gouveia*

*Micheline Freire Donato*

## **CAPÍTULO 2 – TIPOS DE CULTURAS CELULARES.....20**

*Daiana Karla Frade Silva*

*Micheline Freire Donato*

*Juan Carlos Ramos Gonçalves*

## **CAPÍTULO 3 – O LABORATÓRIO DE CULTIVO CELULAR.....33**

*Valgrícia Matias de Sousa*

*Juan Carlos Ramos Gonçalves*

## **CAPÍTULO 4 – PRINCÍPIOS DE BIOSSEGURANÇA ..... 44**

*Ana Paula Gomes Moura Farias*

*Juan Carlos Ramos Gonçalves*

## **CAPÍTULO 5 – MEIOS DE CULTIVO CELULAR..... 64**

*Valgrícia Matias de Sousa*

*Juan Carlos Ramos Gonçalves*

## **CAPÍTULO 6 – CRIOPRESERVAÇÃO .....73**

*Thaís Mangeon Honorato Lisboa*

*Marianna Vieira Sobral*

## **CAPÍTULO 7 – PROPAGAÇÃO DAS CULTURAS..... 81**

*Thaís Mangeon Honorato Lisboa*

*Marianna Vieira Sobral*

## **CAPÍTULO 8 – CONTAGEM DE CÉLULAS .....87**

*Rawny Galdino Gouveia*

*Marianna Vieira Sobral*

**CAPÍTULO 9 – CONTAMINANTES DA CULTURA CELULAR .....94**

*Ana Luiza de Oliveira Lopes  
Juan Carlos Ramos Gonçalves  
Marianna Vieira Sobral*

**CAPÍTULO 10 – INTRODUÇÃO À AVALIAÇÃO  
DA VIABILIDADE CELULAR..... 105**

*Camyla Carolyn Neves de Andrade  
Marianna Vieira Sobral*

**CAPÍTULO 11 – ENSAIO DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO .....114**

*Camyla Carolyn Neves de Andrade  
Marianna Vieira Sobral*

**CAPÍTULO 12 – ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT ..... 123**

*Rafael Carlos Ferreira  
Marianna Vieira Sobral*

**CAPÍTULO 13 – ENSAIO DA SULFORODAMINA B ..... 133**

*Sâmia Sousa Duarte  
Rafael Carlos Ferreira  
Juan Carlos Ramos Gonçalves*

**CAPÍTULO 14 – ENSAIO DO IODETO DE PROPÍDEO ..... 141**

*Sâmia Sousa Duarte  
Juan Carlos Ramos Gonçalves*

**APÊNDICE..... 150**

**GLOSSÁRIO..... 155**

**SOBRE OS ORGANIZADORES ..... 161**

**SOBRE OS AUTORES ..... 163**

# CAPÍTULO 1

## FUNDAMENTOS DO CULTIVO DE CÉLULAS

*Daiana Karla Frade Silva*

*Rawny Galdino Gouveia*

*Micheline Freire Donato*

### 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o cultivo celular, em especial de células de mamíferos, constitui uma ferramenta importante utilizada nas pesquisas biológicas e farmacêuticas para prever o mecanismo de ação, o metabolismo e a toxicidade de fármacos e agentes tóxicos. Sabe-se que a célula é a unidade morfofisiológica básica dos seres vivos, com exceção dos vírus. A célula eucariótica (com núcleo organizado por proteínas histonas e delimitado pela membrana nuclear, com organelas membranosas e citoesqueleto, dentre outras particularidades) compreende o modelo básico de "sistema vivo" para os testes de substâncias e o entendimento dos fenômenos fisiológicos no microambiente corpóreo.

O cultivo celular é uma técnica que permite manter e estudar o comportamento de células vivas fora do organismo. Dá-se por meio do isolamento de células eucarióticas de um determinado tecido (animal ou vegetal), da manutenção da viabilidade e proliferação dessas células em um sistema *in vitro* constituído de nutrientes e fatores essenciais à sobrevivência, sob condições controladas de temperatura, pH e osmolaridade (BARBOSA et al., 2015).

Neste capítulo, serão abordados os aspectos fundamentais do cultivo de células em laboratório, ao descrever seu histórico, o padrão de crescimento celular em laboratório e possíveis aplicações médicas e biotecnológicas da cultura celular.

## **2 CULTIVO DE CÉLULAS: BREVE HISTÓRICO**

Historicamente, os primeiros indícios de cultivo celular datam do final do século XIX, numa tentativa de manter células vivas da placa neural de embriões de galinha em solução salina por dias, feita por Wilhelm Roux. Contudo, essa técnica teve o seu marco no início do século XX, com o pesquisador Ross Granville Harrison (1870-1959), um biólogo e anatomista estadunidense que, em 1907, buscando conhecer o funcionamento do Sistema Nervoso, conseguiu demonstrar que as fibras nervosas eram constituídas por células nervosas, tornando-se pioneiro no estudo de tecidos fora do corpo de um animal. Para tal, ele utilizou embriões de anfíbios isolando pequenos fragmentos de tecido e os cultivou em um meio fisiológico nutritivo (linfáfresca de sapo), utilizando o método de "gota suspensa", tendo o cuidado de manter condições assépticas, acompanhando o experimento por meio de observações diárias em microscópio óptico. Os fragmentos de tecido permaneceram vivos e cresceram por alguns dias, sendo este um marco para a cultura de células, o que possibilitou Harrison provar sua hipótese (RODRÍGUES-HERNÁNDEZ et al., 2014). O que chamou atenção nos experimentos de Harrison foi o desenvolvimento de uma técnica com reprodutibilidade, e, por esses resultados, muitos pesquisadores se interessaram e passaram a utilizar esse modelo experimental.

Pouco tempo depois, Montrose Burrows, em 1910, adaptou os ensaios celulares em anfíbios para tecidos sanguíneos de animais de sangue quente, usando coágulo de plasma de galinha em substituição à linfa. Dois anos depois, ele e Alexis Carrel (1873-1944), um médico e

pesquisador francês, cultivaram tecidos embrionários de cães adultos, gatos, galinhas, ratos e cobaias, fazendo uso de plasma fresco de cada organismo que estava sendo cultivado. Logo em seguida, Carrel descobriu a importância da renovação constante dos nutrientes no meio de cultivo, desenvolvendo um modelo de cultivo de células cardíacas de embrião de galinha, possível de ser mantido por bastante tempo em cultura, desde que mantidas as condições de assepsia. Além disso, elaborou subculturas por amostras de tecidos em plasma fresco que foram mantidos em crescimento por alguns meses e, portanto, desenvolveu a primeira linhagem celular (AMBROSE, 2019; RODRÍGUES-HERNÁNDEZ, et al., 2014).

Mas foi no início dos anos 1940 que a cultura de células se expandiu a partir da produção de um meio de cultura sintético para células vegetais e animais, o que possibilitou o surgimento da primeira linhagem celular, os fibroblastos, com adaptação ao crescimento em meio de cultura (EARLE et al., 1943). Desse momento em diante, em 1951, o biólogo e pesquisador americano George Otto Gey (1899–1970) isolou células de câncer cervical da paciente Henrietta Lacks, estabelecendo a linhagem celular HeLa, que revolucionou pesquisas, como no desenvolvimento da vacina Salk contra poliomielite. Mais tarde, o uso dessa linhagem celular ajudou no descobrimento dos 46 cromossomos presentes nas células humanas, no desenvolvimento de pesquisas de fertilização *in vitro*, além de estudos sobre a AIDS, tuberculose e muitas outras doenças, sendo amplamente utilizada no mundo até hoje (SKLOOT, 2010; SHARRER, 2006).

Ainda na década de 1950, diferentes meios de cultura foram sendo produzidos, como o "Meio 199", criado por Morgan, Morton e Parker; o meio essencial livre de proteínas, criado pelo grupo de Eagle (*Minimum Essential Medium Eagle* ou MEM), e o "Meio de Eagle modificado por Dulbecco" (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* ou DMEM), que adicionou aminoácidos essenciais e não-essenciais (RODRÍGUES-HERNÁNDEZ et al., 2014).

A partir de então, muitas descobertas foram feitas por sucessivas décadas. Dentre estas pode-se destacar as primeiras células híbridas de mamíferos, por Harris e Watkins (1965) utilizando partículas virais para fazer uma mistura de células humanas com camundongos (HARRIS et al., 1965). Em 1969, Augustin e Sato produziram linhagens tumorais a partir de células nervosas de camundongos - neuroblastoma, e isolaram clones eletricamente excitáveis. Já em 1973 foram introduzidas amostras de DNA em células em cultura de mamífero, por Graham e van der Eb, sendo um marco importante para a "engenharia de células" e biotecnologia. No início da década de 1990, surge a *American Type Culture Collection* (ATCC), companhia importante para a produção e comercialização de linhagens celulares. Também, ocorre o marco revolucionário para o cultivo de células de mamíferos, no final do século XX, com a clonagem da ovelha Dolly, por Wilmut, Schnieke e colaboradores (RODRÍGUES-HERNÁNDEZ et al., 2014; WILMUT et al., 1997).

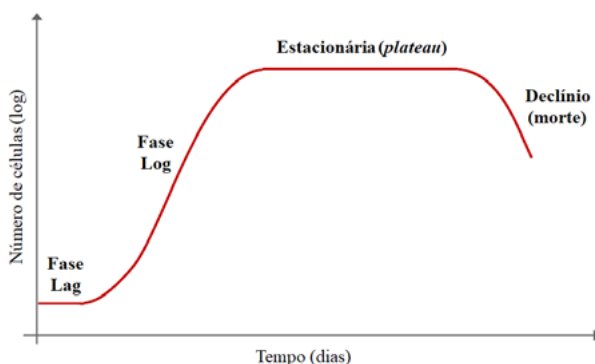
### **3 O CRESCIMENTO CELULAR EM LABORATÓRIO**

Os avanços ocorridos durante os estudos e pesquisas com células em cultura permitiram um maior entendimento acerca das propriedades e características compartilhadas pela maioria dos tipos celulares em crescimento no âmbito laboratorial.

Percebeu-se que muitos experimentos com células exigiam que estas se encontrem em um determinado grau de expansão das células na garrafa de cultivo, denominado de confluência celular. Nesse contexto, diferentes fatores podem interferir no crescimento celular, incluindo a morfologia, a expressão proteica, a adaptação à cultura e às condições do ambiente, além da disponibilidade de nutrientes e substratos para o processo de proliferação (VILELA et al., 2003).

As células em cultura possuem um padrão de crescimento representado por uma curva sigmoideal (Figura 1), denominada curva de crescimento (PERES; CURI, 2005). É essencial o conhecimento das características de crescimento da linhagem celular em manipulação, pois uma alteração no crescimento da linhagem celular poderá indicar um problema significativo e afetar os resultados dos experimentos realizados.

**Figura 1** – Curva de crescimento padrão de células em cultura



**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Legenda:** Na fase Lag as células apresentam um período de adaptação à cultura; na fase Log as células se encontram em um estado de proliferação exponencial; na fase estacionária ou *Plateau* há uma diminuição no crescimento celular; e na fase de declínio ou morte celular, há predominância de células mortas.

A curva de crescimento de células em cultura é dividida nas fases de crescimento descritas a seguir.

### 3.1 Fase Lag

As células apresentam um período de adaptação, no qual a célula demora a se recuperar, juntamente com o tempo de aderência

na garrafa de cultivo (para as células aderentes) e de disseminação celular (CREE, 2011). A duração dessa fase pode variar de acordo com a linhagem celular. Nessa fase, há produção de proteínas estruturais e enzimas, com aumento na síntese de DNA, além de intensa atividade metabólica (PERES; CURI, 2005).

### **3.2 Fase Log**

Também conhecida como fase logarítmica ou exponencial, a fase log é o momento em que o número de células começa a aumentar exponencialmente, e se caracteriza por um processo no qual a proliferação celular é máxima e constante. A população celular nessa fase é considerada a mais viável, a porcentagem de células que podem estar ativas no ciclo celular é entre 90-100%, o que a torna a fase ideal para estudos experimentais (ALVES et al., 2010).

### **3.3 Fase estacionária ou *Plateau***

A fase estacionária ou *plateau* é o período no qual a cultura se torna mais densa e diminui ou interrompe a sua velocidade de crescimento. Nessa fase, o número de morte celular pode se tornar proporcional ao número de células novas, a atividade metabólica decresce e as células se tornam mais susceptíveis a danos (FRESHNEY, 2011).

### **3.4 Fase de declínio ou fase de morte celular**

A fase de declínio ou morte celular é caracterizada pela redução do número de células viáveis e predominância do número de células mortas. A morte das células nessa fase não se dá devido à redução de nutrientes, mas em consequência da progressão natural do ciclo celular (MERCK, 2018).



## 4 APLICAÇÕES MÉDICAS E BIOTECNOLÓGICAS DA CULTURA CELULAR

Com o advento das técnicas modernas de biologia celular e molecular, o cultivo de células de animais nos ensaios *in vitro* tornou-se progressivamente uma ferramenta essencial para o avanço da ciência e trouxe a solução de muitos problemas na área da saúde e medicina. Ainda, vários avanços ocorreram nesses estudos, não se limitando ao entendimento de determinada célula ou tecido, mas sim em diferentes aplicações na área médica, como na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, de vacinas, da terapia gênica, dos transplantes, entre outros, contribuindo com a busca do conhecimento e tratamento de diferentes doenças.

É compreensível que, como qualquer outro modelo, existam desvantagens na utilização de experimentos com cultura de células, uma vez que a proliferação das células *in vitro* ocorre de maneira diferente de *in vivo*, já que o meio é sintético, modificado e favorece o crescimento e espalhamento das células, não ocorrendo crescimento tridimensional como no interior de um organismo, culminando também na redução da adesão célula-célula e célula-matriz. No entanto, grande parte dessas desvantagens foram minimizadas com o advento da cultura de células em 3D, como será discutido no Capítulo seguinte.

Apesar de tudo, os experimentos *in vitro* continuam sendo bastante realizados em pesquisas no mundo inteiro, tendo em vista que apresentam muitas vantagens em seu uso, pois são mais fáceis de controlar, apresentam amostras homogêneas, são mais econômicos do que os modelos *in vivo* e compreendem o principal modelo utilizado como alternativa para substituir ou diminuir a utilização de animais em diferentes pesquisas (ARANGO et al., 2013).

A partir da padronização das culturas de células, houve uma revolução tecnológica que compreende o desenvolvimento de meios de cultura específicos, a manipulação genética de linhagens

celulares, o desenvolvimento de incubadoras cada vez mais sofisticadas que proporcionam a atmosfera desejada, o design de vacinas, o desenvolvimento de novas superfícies de adesão, andaimes 3D, e robotização (FRESHNEY, 2011).

Com o avanço da Biologia Molecular, das técnicas em Bioquímica de proteoma e peptidoma, e da Biologia Celular tornou-se possível a introdução de novas técnicas para produção de diferentes linhagens. Além disso, atualmente é sintetizada uma série de produtos bioterapêutico sem larga escala, que são produzidos para uso comercial ou tecnologia aplicada e estudos clínicos ou de pesquisa.

Na pesquisa básica, podem ser citados estudos que envolvem atividades intracelulares de transcrição de DNA, síntese proteica marcada com isótopos radioligantes ou fluorescência, metabolismo, ensaios de proliferação, senescência, ciclo celular; estudos com RNA; transporte de proteínas, etc. Dessa forma a cultura de células vem cada vez mais permear as áreas de genômica e proteômica.

A cultura de células também tem sido indispensável no estudo da virologia, uma vez que os vírus sobrevivem no interior das células, e o uso de células de mamíferos torna-se então uma ferramenta importante para a produção de vacinas - a exemplo da recente corrida mundial para a descoberta de uma vacina para a Covid-19, e para a produção de fármacos em biorreatores, tais como interferon, insulina, hormônio do crescimento, etc.

Na Farmacologia e Toxicologia, vários estudos são descritos na literatura testando o efeito de diferentes drogas, as interações fármaco-receptor, mutagênese, carcinogênese, dentre outros. Na descoberta de drogas para o tratamento do câncer, em especial nas culturas 3D, com ensaios de ancoragem, agregação de células, etc. E na engenharia de tecidos, onde encontra uma área em destaque para a produção de organoides com o objetivo de transplantes, regeneração de tecido e desenvolvimento de matriz extracelular (YAO; ASAYAMA, 2017; RODRÍGUES-HERNÁNDEZ et al., 2014).

## REFERÊNCIAS

- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v. 2. Rio de Janeiro: **EPSJV**, 2010. p. 215-253.
- AMBROSE, C. T. An amended history of tissue culture: Concerning Harrison, Burrows, Mall, and Carrel. **Journal of Medical Biography**, v. 27, n. 2, p. 95-102, 2019.
- ARANGO, M. T.; QUINTERO-RONDEROS, P.; CASTIBLANCO, J.; et al. Cell culture and cell analysis. In: ANAYA, J. M.; SHOENFELD, Y.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; et al. **Autoimmunity: From Bench to Bedside**. Bogota (Colombia): El Rosario University Press. Jul 18. Chapter 45, 2013.
- BARBOSA, B. S.; SANTOS, F. A.; PIMENTEL, M. M. L.; FERNANDES, D. P.; PREXEDES, E. A.; BEZERRA, M. B. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, 334-347, 2015.
- CREE, I. A. Principles of Cancer Cell Culture. In: **Methods in Molecular Medicine**. p. 13-26, 2011.
- EARLE, W. R.; SCHILING, E. L.; STARCK, T. H.; STRAUS, N. P.; BROWN, M. F.; SHELTON, E. Production of malignancy in vitro IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in living cells. **J. Natl. Cancer Inst.** v.4, p. 165-212, 1943.
- FRESHNEY, R. I. **Cult. Anim. Cells. Wiley Online Books**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- HARRIS, H.; WATKINS, J. F.; CAMPBELL, G. L. M.; EVANS, E. P.; FORD, C. E. Mitosis in Hybrid Cells Derived from Mouse and Man. **Nature** 207, p. 606-608 (1965).
- MERCK. **Fundamental Techniques in Cell Culture**, ECACC Laboratory Handbook 4th Edition, P. 44-45, 2018. Disponível em:

<<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/ecacc-handbook.html>>

PERES, C. M.; CURI, R.; PAFFARO, A. M. D. A.; MARTINS, A. K. A.; PIMENTA, A.; GONÇALVES, C. R.; MARTINS, E. F. Como cultivar células, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.

RODRÍGUES-HERNÁNDEZ, C. O.; TORRES-GARCA, S. E.; OLVERA-SANDOVAL, C.; RAMÍREZ-CASTILLO, F. Y.; MURO, A. L.; AVELAR-GONZALEZ, F. J.; GUERRERO-BARRERA, A. L. Cellculture: History, developmentand prospects. **Int. J. Curr. Res. Aca. Ver.**, 2, p. 188-200, 2014.

SHARRER, T. "He-La" Herself celebrating the woman who gave the world its first immortalized cell line. **The Scientist**, v. 20, 22, 2006.

SKLOOT, R. **The Immortal Life of Henrietta Lacks**. Edição: 1. Crown Publishing Group (NY), 2010.

VILELA, M. J.; MARTINS, M. L.; MENDES, R. L.; SANTOS, A. A. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, 2003.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature** 385, 810-813 (1997).

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reprod. Med. Biol.**, v. 16, p. 99-117, 2017.

# CAPÍTULO 2

## TIPOS DE CULTURAS CELULARES

*Daiana Karla Frade Silva*

*Micheline Freire Donato*

*Juan Carlos Ramos Gonçalves*

### 1 INTRODUÇÃO

As células crescem em um ambiente artificial que contém um substrato ou meio que fornece os nutrientes essenciais (aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais), fatores de crescimento, hormônios, gases ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ), e sob condições físico-químicas reguladas como pH, pressão osmótica e temperatura. A maioria das células é dependente de ancoragem e deve ser cultivada aderida a um substrato sólido ou semissólido (cultura aderente ou em monocamada), enquanto outros tipos celulares podem ser cultivados de forma suspensa ou flutuando em meio de cultura (cultura em suspensão).

Por essas particularidades, é preciso conhecer os diferentes tipos de culturas celulares para entender como devem ser mantidas, bem como suas vantagens e desvantagens. No geral, o cultivo celular refere-se à remoção de células de um tecido antes de seu crescimento, para que haja um resultado favorável ao seu desenvolvimento no ambiente artificial. Podem ser removidas diretamente do tecido e desagregadas por enzimas e de modo mecânico, desprendendo uma célula das outras (cultura primária), ou ainda, podem ser derivadas de uma linhagem celular.

Neste capítulo, serão abordados os principais tipos de culturas de células, como cultura primária, células em linhagem contínua além

das células transformadas. Ainda, serão apresentados termos clássicos, como a cultura de células aderentes e em suspensão, bem como serão discutidos métodos modernos como a cultura de células em 3D.

## 2 CULTURA PRIMÁRIA

A **cultura primária** é obtida a partir da fragmentação ou dissociação mecânica e/ou enzimática de tecidos. Desse modo, as células que sobrevivem ao processo de isolamento irão apresentar características genótípicas e fenotípicas do seu tecido de origem, inicialmente heterogêneas, sendo uma vantagem para investigação de um evento fisiológico ou patológico que, em alguns casos, ocorre especificamente naquele órgão ou tecido de origem. Todavia, estas células apresentam crescimento finito, uma vez que não são resistentes a grandes períodos de tempo em cultura, sendo chamadas de **células primárias** (FRESHNEY, 2010). Como exemplo, a cultura primária de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), que é muito utilizada para investigar eventos de citotoxicidade.

Outro modelo interessante de cultura primária são as culturas de células do sistema nervoso periférico, por exemplo, a cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal – DRG de roedores, para investigação de eventos envolvidos na nocicepção ou testes com substâncias analgésicas e anestésicas (GONÇALVES et al., 2013). Para avaliação do sistema nervoso central (SNC) pode-se citar como exemplo a cultura primária de neurônios piramidais de hipocampo de roedores, no intuito de avaliar eventos de neurotoxicidade e excitotoxicidade promovida por neurotransmissores excitatórios, tais como o L-glutamato (DONATO, 2014). Como exemplo de cultura primária de células de tecido periférico pode-se citar a cultura primária de hepatócitos de rato, bastante utilizada em experimentos envolvendo a avaliação da toxicidade, funções bioquímicas e metabolismo de drogas.

Além destes, vários tipos de cultura primária provenientes de tecidos epiteliais, musculares, tumores, entre outros, estão descritos na literatura, cabendo ao experimentador avaliar a mais adequada à sua proposta de investigação e condições laboratoriais.

### **3 LINHAGENS CELULARES**

As células somáticas saudáveis de mamíferos muito raramente adquirem capacidade ilimitada de proliferação durante o cultivo. Como característica, após certo número de divisões celulares, elas param de crescer. Logo, pesquisadores, em busca de conduzir suas pesquisas utilizando as amostras de células de animais em sucessivos experimentos, desenvolveram as linhagens celulares (YAO; ASAYAMA, 2017). Nesse contexto, várias linhagens de diferentes tipos celulares foram isoladas e estabelecidas por pesquisadores em todo o mundo (ARANGO et al., 2013). A seguir, o Quadro 1 apresenta algumas das principais linhagens utilizadas em ensaios biológicos.

**Quadro 1** – Exemplos de linhagens celulares e suas características

<b>Linhagem Celula</b>	<b>Organismo</b>	<b>Tecido de origem</b>	<b>Doença</b>	<b>Propriedade</b>
CHO	<i>Cricetus griseus</i>	ovário de hamster	normal	aderente
L929	<i>Mus musculus</i>	fibroblasto	normal	aderente
RAW 264.7	<i>Mus musculus</i>	tumor induzido	leucemia murinade Abelson	aderente
Neuro-2a	<i>Mus musculus</i>	cérebro	neuroblastoma	aderente
A7r5	<i>Rattus norvegicus</i>	aorta torácica	normal	aderente
VERO	<i>Cercopithecusaethiops</i>	rins	normal	aderente
HEK-293	<i>Homo sapiens</i>	rim embrionário	normal	aderente
MRC5	<i>Homo sapiens</i>	pulmão	normal	aderente
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	cérvice	adenocarcinoma	aderente
Hep G2	<i>Homo sapiens</i>	fígado	carcinoma hepatocelular	aderente
SK-MEL	<i>Homo sapiens</i>	pele	melanoma	aderente
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	glândula mamária	carcinoma ductal	aderente
SH-SY5Y	<i>Homo sapiens</i>	medula óssea	neuroblastoma	aderente/suspensão
U-87 MG	<i>Homo sapiens</i>	cérebro	glioblastoma	aderente
K562	<i>Homo sapiens</i>	medula óssea	leucemia mieloide crônica	suspensão
HL-60	<i>Homo sapiens</i>	sangue periférico	leucemia promielocítica aguda	suspensão



O processo de morte celular controlada (apoptose) ocorre normalmente em nossos tecidos, permitindo a constante renovação das células no organismo. Por conta disso, as células primárias não sobrevivem muito tempo em cultura, além de morrerem por não se adaptarem ao meio ou por conta dos traumas e do estresse oriundos do processo de isolamento. Entretanto, algumas células irão conseguir sobreviver e proliferar mais rapidamente porque se adaptaram bem ao meio de cultivo, se tornando predominantes no meio após algumas passagens. Estas células irão formar linhagens celulares que, diferente da cultura primária, podem ser mantidas por longos períodos de tempo (FRESHNEY, 2010).

A **linhagem celular contínua** ou "imortalizada" exibe algumas características do seu tecido de origem, porém, possui alta capacidade proliferativa e podem se dividir por um grande número de vezes sem perder as suas características (células homogêneas), sendo possível a formação de bancos de células a partir da sua criopreservação (VERTREES, 2009). Por conta disso, essas células são muito utilizadas em pesquisas, como na produção de fármacos e vacinas. Como principal exemplo pode-se citar a linhagem HeLa, proveniente de adenocarcinoma cervical humano, que é considerada a primeira linhagem imortalizada história e ainda hoje comumente utilizada em experimentos de avaliação de atividade antitumoral (Quadro 1).

As **células transformadas** são aquelas com características tumorais, que apresentam modificações que as tornam genética e morfológicamente diferentes do tecido original, principalmente por conta de alterações em genes que controlam a divisão celular, provocando a proliferação descontrolada. A transformação da célula pode ocorrer por diferentes fatores, podendo ser induzida por vírus, substâncias químicas ou agentes físicos. Um exemplo clássico desse tipo de linhagem é a HEK293 (Quadro 1), que foi originalmente gerada pela transformação de células normais do rim embrionário humano (HEK) por fragmentos de DNA de adenovírus humano tipo 5 (Ad5). Esta

linhagem é bastante utilizada em experimentos envolvendo a expressão de proteínas recombinantes (FRESHNEY, 2010).

Atualmente, as linhagens celulares imortalizadas e transformadas comumente são utilizadas como uma alternativa interessante para compreender os processos farmacodinâmicos, como especificidade de drogas aos receptores e sinalização celular, além de serem úteis em ensaios de citotoxicidade utilizando compostos naturais bioativos e derivados, medicamentos, compostos sintéticos e nano compostos. Como exemplo, pode-se citar o uso das linhagens SH-SY5Y e SK-MEL-28 (Quadro 1).

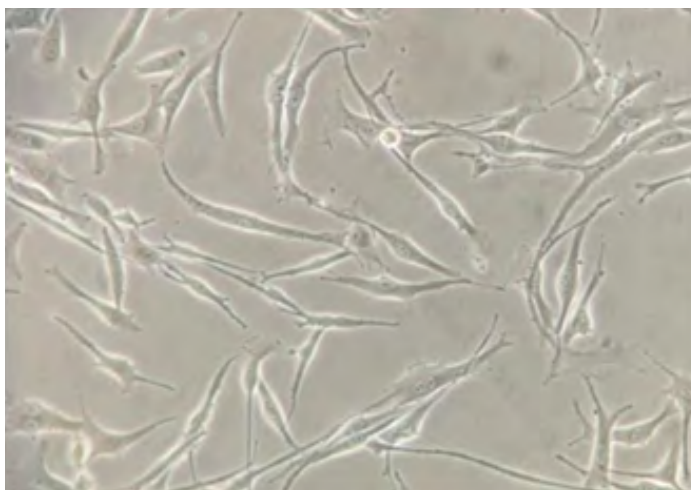
A linhagem SH-SY5Y, frequentemente utilizada durante ensaios de toxicidade *in vitro* de compostos que atuam no SNC (ARBO et al., 2016), foi isolada a partir da biópsia de um paciente na década de 70 e, desde 1980, vem sendo utilizada como modelo de célula neuronal (BIEDLER et al., 1973; JOSHI et al., 2006) por apresentar propriedades bioquímicas e funcionais de células neuronais (XIE; HU; LI, 2010), e por expressarem receptores de membrana celular do tipo colinérgico muscarínico, subtipos M1 e M2 (ADEM et al., 1987), além de receptores dopaminérgicos (XIE; HU; LI, 2010).

Por sua vez, a SK-MEL-28 é uma linhagem celular derivada de melanoma, inicialmente obtida a partir de um linfonodo axilar de um homem de 51 anos (CAREY et al., 1976; SANTOS et al., 2020). Em particular, a SK-MEL-28 é uma linhagem estabelecida e amplamente utilizada na avaliação *in vitro* de drogas com atividade antimelanoma. Essa linhagem expressa o gene mutante B-Raf (V600E) e o tipo selvagem N-Ras, ambos capazes de formar tumores em camundongos *nude* (XING et al., 2012).

## 4 CÉLULAS ADERENTES E EM SUSPENSÃO

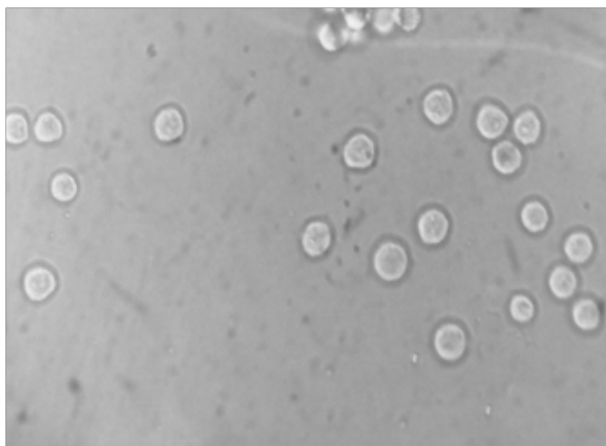
Normalmente as linhagens celulares possuem, ao menos inicialmente, características similares aos seus tecidos de origem. Desse modo, as linhagens provenientes de tecidos sólidos, como células epiteliais, crescem em monocamadas de **células aderentes** na superfície do local de cultivo, pois dependem de ancoragem para se proliferarem (Figura 1). Por outro lado, as **células em suspensão** não necessitam de interação, sendo cultivadas em suspensão no meio (Figura 2), uma vez que são, muitas vezes, derivadas de células hematopoiéticas (FRESHNEY, 2010; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2010).

**Figura 1** – Exemplo de linhagem celular aderente. Linhagem SK-MEL-28 derivada de melanoma humano, observada por microscopia óptica (400x)



**Fonte:** Acervo particular do autor

**Figura 2** – Exemplo de linhagem celular não aderente. Linhagem K562 derivada de leucemia mieloide humana, observada por microscopia óptica (400x)



**Fonte:** Acervo particular do autor

Devido às diferenças entre estes tipos celulares, as garrafas de cultura devem ser, preferencialmente, diferenciadas para as células aderentes, pois possuem uma superfície capaz de atrair as células, com carga negativa para permitir a ancoragem, sendo esta carga importante para a produção de proteínas de adesão celular (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2010).

## **5 CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D)**

A cultura de células convencional envolve o crescimento das células em superfícies planas e sólidas formando monocamadas em formato bidimensional (2D). As células ficam aderidas a substratos plásticos ou de vidro, e seus contatos com outras células só ocorrem nas laterais (periféricamente). Ocorre também que os gradientes de oxigênio e nutrientes não estão distribuídos fisiologicamente de forma

uniforme, uma vez que um dos lados se encontra aderido à superfície do substrato. Isso impede também que as células se amontoem umas sobre as outras, o que as obrigam a assumirem uma morfologia em monocamadas, o que não é natural para boa parte das células. De fato, o cultivo de células em superfícies planas de plástico não mimetiza o modelo *in vivo* com fidedignidade.

Alguns estudos já mostraram haver falhas na comprovação da eficácia e toxicidade de fármacos que se apresentaram promissores quando testados em cultura 2D, mas falharam quando testados posteriormente *in vivo*. Logo, uma alternativa prática foi criar uma terceira dimensão para a cultura de células, sendo esse o princípio da cultura 3D (ANTONI et al., 2015).

Os organismos vivos apresentam um arranjo tridimensional de células com complexas interações célula-célula e um transporte dinâmico de nutrientes. No ambiente *in vivo*, as células são mantidas num ambiente quimiotático e com constante suplementação de nutrientes frescos e oxigênio, além de haver constante remoção de metabólitos e resíduos tóxicos via sistema circulatório. Por isso, é importante que o ambiente da célula em cultura considere essa organização espacial (ABBOT, 2003).

As culturas tridimensionais (3D) são modelos *in vitro* em que células imortalizadas, células tronco ou explantes são inseridos em uma matriz de hidrogel que mimetiza o ambiente *in vivo* (ANTONI et al., 2015). Diversas vantagens e limitações nesse tipo de cultura foram demonstradas em alguns estudos biológicos e foram resumidas no Quadro 2. Dentre as principais vantagens sobre a cultura 2D, pode-se destacar a preservação das características *in vivo* e funções gerais da célula tais como: morfologia, proliferação, diferenciação, migração, expressão gênica, síntese proteica, etc. Como desvantagens, pode-se citar problemas de natureza técnica, reprodutibilidade e dificuldade de controle das condições de temperatura e pH no ambiente da cultura (Quadro 2).

**Quadro 2:** Cultura de células 3D: vantagens e limitações

Características	Propriedades
<b>Vantagens</b>	Monitoramento do número de células; Viabilidade; Morfologia; Proliferação; Diferenciação; Resposta a estímulos; Comunicação célula a célula; Migração de células tumorais para os tecidos circundantes; Invasão de células tumorais nos tecidos circundantes; Polarização celular; Estimulação por angiogênese; Evasão do sistema imunológico; Metabolismo de drogas; Expressão genética; Síntese proteica; Função geral da célula; Relevância do genótipo fisiológico; Relevância fisiológica do fenótipo; Relevância in vivo.
<b>Limitações</b>	Reprodutibilidade entre camadas biomiméticas; Extração de todas as células para análise com aumento de tamanho e tortuosidade; Criação de matrizes 3D; Capacidade para aumentar ou diminuir um único formato 3D; Manuseio do processamento pós-cultura; Imagem dependendo do tamanho da camada, transparência do material e profundidade no microscópio; Desempenho, sensibilidade e compatibilidade com alto rendimento; Instrumentos de triagem; Otimização para cultura de células 3D dos ensaios utilizados para determinar a resposta à interação medicamentosa (viabilidade celular dependente da dose, célula-célula/célula-matriz interação, migração celular); Controle das condições de cultura (temperatura e pH).

**Fonte:** Adaptado de Antoniet al. (2015)

Vários modelos de cultura em 3D podem ser citados, tais como o estudo de todas as células de animais e organotipos de tecidos explantados, células esferoides, cultura de microcarregadores e modelos de engenharia de tecido (PAMPALONI et al., 2007). Apesar dos avanços constantes na última década, a cultura de células em 3D ainda necessita passar por aprimoramentos e acessibilidade até que possa ser estabelecida nos laboratórios de cultivo celular do mundo inteiro.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. Cell culture: Biology's new dimension. **Nature**, 424, p. 870-872, 2003.
- ADEM, A. et al. Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. **Developmental Brain Research**, v. 33, p. 235-242, 1987.
- ANTONI, D.; BURCKEL, H.; JOSSET, E.; NOEL, G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. **Int. J. Mol. Sci**, v. 16, 5517-5527, 2015.
- ARANGO, M. T.; QUINTERO-RONDEROS, P.; CASTIBLANCO, J.; et al. **Cell culture and cell analysis**. In: ANAYA, J. M.; SHOENFELD, Y.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; et al. Autoimmunity: From Bench to Bedside. Bogota (Colombia): El Rosario University Press. Jul 18. Chapter 45, 2013.
- ARBO, M. D. et al. In vitro neurotoxicity evaluation of piperazine designer drugs in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, p. 121-130, 2016.
- BIEDLER, J. L.; HELSON, L.; SPENGLER, B. A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. **Cancer research**, v. 33, p. 2643-2652, 1973.

CAREY, T. E.; TAKAHASHI, T.; RESNICK, L. A.; OETTGEN, H. F.; OLD, L. J. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 73: 3278-3282, 1976.

DONATO, M. F. **“Peçonha da serpente *Micrurus l. lemniscatus* (Roze, 1967), caracterização parcial das propriedades bioquímicas e farmacológicas: neurotoxicidade e atividade pré-sináptica de toxinas três-dígitos”**. Tese de Doutorado. 212f. Belo Horizonte, MG: UFMG, ICB, Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, 2014.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**, Edição: 6. New York: Wiley-Blackwell, 2010.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde – Volume 2**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio; Instituto Oswaldo Cruz, 2010.

GONÇALVES, J. C. R.; SILVEIRA, A. L.; SOUZA, H. D. N.; NERY, A. A.; PRADO, M. A. M.; ULRICH, H.; ARAUJO, D. A. M. The monoterpene (-)-carvone: a novel agonist of TRPV1 channels. **Cytometry Part A**, v. 83A, 212-219, 2013.

JOSHI, S.; GULERIA, R.; PAN, J.; DIPETTE, D.; SINGH, U.S. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Oncogene**. 2006; 25(2):240-247.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 8, p. 839-845, 2007.

SANTOS, L. K. B.; VERAS, M. D. A.; MARQUES, K. K. G.; ALVES, M. M.; MENDES, A. N.; CARVALHO, F. A. A.; SOBRAL, M. V.; CHAVES, M. H.; GONÇALVES, J. C. R. Assessment of In Vitro Anti-melanoma



Potential of Ephedranthus Pisocarpus R. E. Fr. **Anticancer Research**, in press, 2020.

VERTREES, R. A.; GOODWIN, T.; JORDAN, J. M.; ZWISCHENBERGER, J. B. **Tissue Culture Models**. In: ALLEN, T.; CAGLE, P. Basic Concepts of Molecular Pathology. Springer: Molecular Pathology Library, 2009.

XIE, H-R.; HU, L-S.; LI, G-Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chinese medical journal**, v. 123,1086-1092, 2010

XING, F.; PERSAUD, Y.; PRATILAS, C. A.; TAYLOR, B. S.; JANAKIRAMAN, M.; SHE, Q. B.; GALLARDO, H.; LIU, C.; MERGHOU, T.; HEFTER, B.; DOLGALEV, I.; VIALE, A.; HEGUY, A.; DE STANCHINA, E.; COBRINIK, D.; BOLLAG, G.; WOLCHOK, J.; HOUGHTON, A.; SOLIT, D.B. Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. **Oncogene** 31(4): 446-57, 2012. DOI: 10.1038/onc.2011.250.

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reprod. Med. Biol.**, v. 16, 99-117, 2017.

# CAPÍTULO 3

## O LABORATÓRIO DE CULTIVO CELULAR

*Valgrícia Matias de Sousa  
Juan Carlos Ramos Gonçalves*

### 1 INTRODUÇÃO

Um laboratório de cultivo de células e tecidos pode ser distinguido facilmente dos demais, principalmente devido a sua necessidade constante de manter um ambiente de assepsia suficiente para que não ocorram contaminações da cultura por microrganismos e, ao mesmo tempo, proteger ao máximo o manipulador de riscos biológicos.

A introdução de sistemas como cabines de fluxo laminar simplificou bastante o problema corrente da assepsia durante a prática envolvendo o cultivo de células. No entanto, vários outros equipamentos e requisitos mínimos exigidos de boas práticas devem ser adotados para o perfeito funcionamento de um laboratório de cultivo celular (QUISEN; ANGELO, 2008). De fato, podem ser considerados seis esquemas básicos, a saber: manuseio estéril, incubação, preparação, lavagem, esterilização e armazenamento. Para tanto, devem ser tomadas providências para preparação e esterilização, manuseio asséptico e outras atividades na área de cultura, incluindo centrifugação, contagem de células, microscopia, incubação e armazenamento em temperatura ambiente, 4 °C, -20 °C e -196 °C (FRESHNEY, 2010).

Neste capítulo serão delineados a infraestrutura mínima de um laboratório de cultivo de células, a apresentação dos equipamentos

essenciais, e, finalmente, será fornecido um guia básico de boas práticas da manipulação de células e tecidos.

## **2 INFRAESTRUTURA LABORATORIAL**

A infraestrutura laboratorial compreende um ambiente limpo e asséptico, extremamente isolado do ambiente externo, com salas sem janelas ou com janelas duplas, para evitar o risco de contaminações. O laboratório deverá possuir instalações adequadas e equipamentos essenciais para o trabalho e manutenção da cultura celular *in vitro* (QUISEN; ANGELO, 2008).

Para garantir a limpeza e assepsia do ambiente laboratorial, deve-se reduzir o número de pessoas em circulação, evitando-se a contaminação no laboratório, e, em relação a estrutura, alguns critérios devem ser estabelecidos:

- As paredes e pisos devem ser projetados para facilitar a limpeza;
- As salas não devem conter janelas, pois facilita a entrada da luz, poeira, animais, levando ao risco de contaminação;
- As paredes devem ser brancas, para refletir a luz e a iluminação ao ambiente;
- O controle da temperatura é essencial para manutenção do ambiente favorável ao trabalho.

Em relação a infraestrutura e divisão do ambiente ou áreas laboratoriais, deve-se conter:

- a. Área externa ou antessala:** designada ao armazenamento de pertences dos usuários, como calçados, bolsas, dentre outros;

- b. Área de lavagem e esterilização:** ambiente destinado ao descarte de meio de cultura e demais resíduos, e também à lavagem e autoclavagem de vidrarias e utensílios utilizados nos experimentos. Esse ambiente deve possuir equipamentos essenciais, como autoclave, lavador de pipetas, destilador, geladeira. Além disso, deve conter pias grandes, bancadas, armários para armazenamento de materiais e vidrarias e estufas de secagem;
- c. Área de preparação de soluções e meio de cultura:** esse ambiente deve ser comum ao fluxo de pessoas e conter bancadas, armários, pia, geladeiras e freezers. Além de equipamentos como: pHmetro, agitador magnético, balanças de precisão e analítica, essenciais para o preparo de meios e soluções;
- d. Área para manipulação asséptica:** local exclusivamente destinado à manutenção das culturas celulares e experimentos. Esse ambiente possui uma cabine de fluxo laminar, onde são manipuladas as culturas. O local deve ser mantido com controle de temperatura e umidade, sempre fechado e com circulação restrita ao pessoal do laboratório, para garantir um ambiente asséptico e seguro;
- e. Almoxarifado:** ambiente repleto de prateleiras ou estantes, direcionado ao armazenamento de reagentes químicos e materiais utilizados na rotina laboratorial. Além disso, deve-se respeitar as normas de segurança inerentes aos produtos químicos armazenados, mantendo o controle de temperatura e umidade (QUISEN; ANGELO, 2008).

A Figura 1 apresenta, de forma ilustrativa, a infraestrutura básica de um laboratório de cultura de células de pequeno-médio porte, delimitando as áreas principais e organização dos equipamentos.

**Figura 1** – Estrutura básica de um laboratório de cultivo de células de médio porte



**Fonte:** Adaptado de Freshney (2010)

## 3 EQUIPAMENTOS ESSENCIAIS

A necessidade de um equipamento a ser utilizado em um laboratório de cultivo celular específico é frequentemente subjetiva, podendo variar de acordo com o tipo de trabalho pretendido, a economia de tempo ou eficiência técnica, além da qualidade dos dados, capacidade analítica, requisitos de amostra, o orçamento disponível e o custo-benefício potencial, entre outros fatores (FRESHNEY, 2010; MERCK, 2018).

No entanto, alguns equipamentos em particular se fazem essenciais para a realização de procedimentos envolvendo o cultivo de células e na manutenção do ambiente asséptico em um laboratório, dentre estes, pode-se citar:

### 3.1 Cabines de fluxo laminar e segurança biológica

As cabines de fluxo laminar e segurança biológica foram desenvolvidas com o objetivo de proporcionar um ambiente estéril no laboratório, que permita a manipulação de forma segura de materiais biológicos e/ou estéreis, e ainda fornecer proteção adequada ao manipulador contra riscos associados ao material utilizado (MERCK, 2018).

Apesar de serem bastante semelhantes, tanto na aparência quanto na função básica, as cabines (ou capelas) de fluxo laminar e as cabines de segurança biológica possuem diferenças notáveis entre si, cabendo ao manipulador avaliar qual o tipo mais adequado para a suas necessidades.

As **cabines de fluxo laminar** promovem a recirculação de 100% do ar, criando áreas de trabalho estéreis para o manuseio de materiais biológicos que não podem sofrer contaminação do meio externo, garantindo a proteção das amostras manipuladas. Estes equipamentos são subdivididos em duas categorias: a) Fluxo laminar horizontal, que realiza 100% da renovação do ar, direcionado de forma horizontal, e

oferece proteção apenas para os materiais a serem manipulados; b) Fluxo laminar vertical que também produz 100% da recirculação do ar, direcionado verticalmente (de cima para baixo) oferecendo proteção tanto para o operador quanto para o ambiente contra possíveis agentes contaminantes de risco.

Já as **cabines de segurança biológica** são utilizadas para promover a proteção tanto dos usuários quanto das amostras manipuladas e do meio externo, de forma a renovar 100% do ar. Isso é possível devido a sua operação em pressão negativa, evitando a saída do ar contaminado para o ambiente, diferentemente dos fluxos laminares. É recomendada para a manipulação de substâncias e materiais de baixo e moderado risco biológico, não comportando o manuseio de produtos tóxicos ou voláteis. As cabines de segurança biológica podem ser subdivididas em três categorias: a) Classe II A1 promove a recirculação de 70% do ar e renovação de 30%, despejando-os já filtrados para o interior do laboratório; b) Classe II A2 produz a recirculação de 70% do ar e a renovação de 30%, no entanto, despejando o ar filtrado para a área externa do ambiente laboratorial; c) Classe II B2 promove 100% da renovação do ar, que por sua vez é conduzido para fora do laboratório por meio de um sistema de dutos semelhante ao tipo anterior.

### **3.2 INCUBADORA DE CO<sub>2</sub>**

Embora as culturas possam ser incubadas e mantidas em cultura de forma mais simples e de menor custo, as incubadoras de CO<sub>2</sub> são de fato a alternativa mais comumente adotada em laboratórios. Apesar de mais caras, sua facilidade de uso e controle da temperatura e tensão de CO<sub>2</sub> justificam os gastos. Uma atmosfera controlada, geralmente de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C para a maioria das culturas, é alcançada usando-se uma bandeja de umidificação e controlando a tensão gasosa com um dispositivo de monitoramento de CO<sub>2</sub>, que extrai o ar da incubadora para

uma câmara específica, determina a concentração e injeta CO<sub>2</sub> puro na incubadora para compensar qualquer deficiência. O ar é circulado pela incubadora por convecção natural ou usando um ventilador para manter o nível de CO<sub>2</sub> e a temperatura uniformes.

### **3.3 Centrífuga**

Periodicamente, as suspensões celulares requerem centrifugação, seja para aumentar a concentração das células ou para lavar um reagente, trocar meio, etc. Uma pequena centrífuga de bancada, de preferência com frenagem controlada proporcionalmente, é suficiente para a maioria dos propósitos. Apesar de não ser necessária, a refrigeração pode ser uma boa alternativa para evitar o superaquecimento das amostras de células durante as centrifugações. A unidade de rotação pode ser programada em RPM (rotações por minuto) ou RCF (força centrífuga relativa), também representada por força  $g$ , sendo esta última mais adequada por não depender do tamanho e inclinação do rotor. Por exemplo, a maioria das células em cultura sedimentam satisfatoriamente quando centrifugadas a uma velocidade de 80 a 100 x  $g$  (FRESHNEY, 2010).

### **3.4 Micr**

Um simples microscópio invertido é essencial no ambiente de cultivo celular, para permitir a observação das culturas regularmente, detectar alterações morfológicas e a possibilidade de contaminação microbiológica. Um microscópio com bom contraste de fase de longa distância de trabalho, obtido pelo conjunto condensador e objetiva, também é crucial para compensar a espessura dos frascos de e microplacas de plástico.



### 3.5 Outros equipamentos

Além dos equipamentos descritos, vários outros também são considerados essenciais ou de grande importância em um laboratório de cultura celular, tais como hemocitômetro (Câmara de Neubauer) ou contador automatizado de células, geladeira, freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ , cilindro de  $\text{CO}_2$ , botijão de  $\text{N}_2$  (para o estoque de linhagens), purificador de água, balança analítica, pHmetro, autoclave, estufa de secagem, filtros de esterilização, pipetas e pipetadores, vidrarias, materiais descartáveis como tubos e garrafas de cultivo, etc. Os principais equipamentos essenciais e suas respectivas funções encontram-se resumidos no Quadro 1.

**Quadro 1** – Equipamentos essenciais em cultura de células

Item	Finalidade
Cabine de Fluxo laminar	Manutenção do ambiente asséptico
Microscópio invertido	Visualização e avaliação das células em cultura
Hemocitômetro	Contagem de células
Geladeira	Armazenamento local de meios e reagentes
Freezer	Armazenamento a $-20^{\circ}\text{C}$ de soluções instáveis, soro e reagentes
Centrífuga de bancada	Centrifugação de células em cultura
Incubadora de $\text{CO}_2$ úmida	Manutenção das células em ambiente controlado
Cilindro de $\text{CO}_2$	Suprimento de $\text{CO}_2$ para a incubadora
Botijão de $\text{N}_2$	Criopreservação das linhagens celulares
Purificador de água	Suprimento de água pura
Balança	Pesagem de substâncias químicas
pHmetro	Medir o pH em meios preparados e reagentes
Estufa de secagem	Secagem de vidro e plástico

Autoclave	Esterilização de líquidos e soluções estáveis
Pia	Lavagem do material utilizado
Filtros de esterilização	Esterilização de soluções termolábeis

**Fonte:** Adaptado de Freshney (2010)

## 4 BOAS PRÁTICAS EM LABORATÓRIO DE CULTIVO CELULAR

O ambiente de culturas celulares requer uma sequência de normas e cuidados para reduzir ou evitar os riscos de contaminação para o manipulador e para a amostra, evitando o desperdício de tempo, reagentes, material biológico e oneração de custo.

Os vetores de maior contaminação da cultura envolvem o manipulador e o ambiente de trabalho, responsáveis por introduzir contaminantes, como fungos, bactérias, entre outros. Tais microrganismos podem contaminar uma cultura isoladamente, ou disseminar-se, infectando de forma abrangente a sala de cultura e diversos experimentos em análise.

Neste contexto, com o intuito de minimizar os riscos de contaminação, algumas medidas de **boas práticas de manipulação** devem ser introduzidas:

- Higienização das mãos do manipulador com água e sabão antisséptico, ou aplicação de álcool em gel ou líquido a 70%;
- Paramentação adequada do manipulador, com o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), tais como, touca, máscara, jaleco descartável, propés e luvas. Caso se faça a opção de uso de um jaleco de tecido para a cultura de células, este deverá permanecer exclusivamente no ambiente, sem uso externo;

- Realizar a limpeza do ambiente de trabalho, como bancadas, microscópios e cabine de fluxo com papel embebido em álcool 70%;
- Limpar o material necessário para experimento com álcool 70%, antes de levar ao fluxo;
- Ligar a luz ultravioleta (UV) do fluxo por 15-20 min;
- Higienizar as mãos com álcool 70% para retirar as garrafas da estufa de cultivo celular (estufa de CO<sub>2</sub>), para observação das culturas sob microscópio óptico, antes da manipulação, a fim de observar a presença de possíveis contaminantes (bactéria e/ou fungos) na cultura;
- Ao final do experimento, higienizar todas garrafas com álcool 70% antes de devolvê-las à estufa;
- Realizar a antisepsia das bancadas, microscópios e cabine de fluxo laminar com papel embebido de álcool 70% para garantir um ambiente asséptico na sala de cultura.

O ambiente da sala de cultura deve ser limpo uma ou duas vezes por semana com pano embebido com solução desinfetante bactericida e antifúngica ou lisofórmio, realizando a limpeza adequada e desinfecção do ambiente e superfícies que possivelmente estão contaminadas com material biológico ou microrganismos potencialmente infectantes.

Os equipamentos devem ser lavados com água e sabão e/ou higienizados com álcool 70%; a água da estufa e banho-maria deverá ser trocada, e a limpeza realizada periodicamente; além de realizar a limpeza do filtro do ar-condicionado a cada três meses (CURI; PERES, 2005).

## REFERÊNCIAS

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**, Edição: 6. New York: Wiley-Blackwell, 2010.

MERCK. **Fundamental Techniques in Cell Culture**, ECACC Laboratory Handbook 4th Edition, p. 44-45, 2018. Disponível em <<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/ecacc-handbook.html>>

PERES, C. M.; CURI, R.; PAFFARO, A. M. D. A.; MARTINS, A. K. A.; PIMENTA, A.; GONÇALVES, C. R.; MARTINS, E. F. **Como cultivar células**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. da S. **Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.

# CAPÍTULO 4

## PRINCÍPIOS DE BIOSSEGURANÇA

*Ana Paula Gomes Moura Farias*

*Juan Carlos Ramos Gonçalves*

### 1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 70, a construção do conhecimento em biossegurança tem sido adotada pela comunidade científica, iniciando-se uma ampla discussão acerca dos impactos da engenharia genética na sociedade. A partir de então, com a evolução crescente dos conceitos associados, o termo biossegurança tem evoluído em conjunto com as descobertas e avanços científicos, e assim, vem sofrendo alterações em seus fundamentos.

Atualmente, entende-se por biossegurança o conjunto de ações voltadas para a prevenção e minimização de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem, dos animais, à preservação do meio ambiente e à qualidade dos resultados (SILVA, 2017). Caracteriza-se, portanto, como um termo bastante amplo e complexo, que abrange diversas áreas do conhecimento.

Especificamente, a rotina diária de um laboratório de cultivo de células demanda a realização de atividades de risco biológico iminente, não apenas aos pesquisadores envolvidos como também ao meio ambiente em que este encontra-se inserido. Dessa forma, o presente capítulo propõe-se a apresentar e discutir as noções básicas de biossegurança e relacioná-las às práticas de cultivo celular.

## 2 BIOSSEGURANÇA: FUNDAMENTOS BÁSICOS

O objetivo principal da biossegurança em um laboratório de cultura de células é criar um ambiente de trabalho onde se promova a contenção do risco de exposição a agentes potencialmente nocivos ao manipulador, ao material manipulado e ao meio ambiente, de modo que este risco seja minimizado ou eliminado (DA SILVEIRA, 2019).

Segundo a NR 32 (que segue as diretrizes internacionais para classificação dos agentes biológicos para o trabalho em laboratórios) tais agentes biológicos humanos e animais são divididos em quatro classes, de 1 a 4, segundo os seguintes critérios: patogenicidade, alteração genética ou recombinação gênica, virulência, modo de transmissão, endemicidade, estabilidade, concentração e volume, origem do agente biológico, consequências epidemiológicas, disponibilidade de medidas profiláticas e de tratamento eficaz, fatores referentes ao trabalhador.

**Classe de risco 1:** baixo risco individual para o trabalhador e para a coletividade, com baixa probabilidade de causar doença ao ser humano.

**Classe de risco 2:** risco individual moderado para o trabalhador e com baixa probabilidade de disseminação para a coletividade. Podem causar doenças ao ser humano, para as quais existem meios eficazes de profilaxia ou tratamento.

**Classe de risco 3:** risco individual elevado para o trabalhador e com probabilidade de disseminação para a coletividade. Podem causar doenças e infecções graves ao ser humano, para as quais nem sempre existem meios eficazes de profilaxia ou tratamento.

**Classe de risco 4:** risco individual elevado para o trabalhador e com probabilidade elevada de disseminação para a coletividade. Apresenta grande poder de transmissibilidade de um indivíduo a outro. Podem

causar doenças graves ao ser humano, para as quais não existem meios eficazes de profilaxia ou tratamento.

Em função do tipo de risco a que os trabalhadores estão expostos, o nível de biossegurança exigido para o laboratório também é subdividido em quatro níveis.

**Quadro 1 – Caracterização dos níveis de segurança biológica (OMS)**

<b>Nível de Biossegurança 1 – NB1:</b>	Normas para a manipulação de agentes biológicos que representam baixo risco individual e para a comunidade. É o nível de biossegurança necessário ao trabalho que envolva material biológico que contenha agentes biológicos da classe de risco 1.
<b>Nível de Biossegurança 2 – NB2:</b>	Normas para a manipulação de agentes biológicos que representam risco individual moderado e risco limitado para a comunidade. É o nível de biossegurança exigido para o trabalho com agentes biológicos da classe de risco 2.
<b>Nível de Biossegurança 3 – NB3:</b>	Normas para a manipulação de agentes biológicos que representam elevado risco individual e risco limitado para a comunidade. É aplicável aos locais onde forem desenvolvidos trabalhos com material biológico da classe de risco 3.
<b>Nível de Biossegurança 4 – NB4:</b>	Normas para a manipulação de agentes biológicos que representam elevado risco individual e elevado risco para a comunidade. Este nível de contenção deve ser usado sempre que o trabalho envolver material biológico da classe de risco 4.

Como em qualquer atividade laboratorial, antes do início do cultivo celular, deve-se planejar o trabalho a ser realizado de modo a executá-lo com segurança. Para promover segurança é imprescindível que as pessoas que atuam em laboratórios de cultura de células sejam conscientizadas a respeito dos potenciais riscos, como também devem ser treinadas para efetuarem as práticas e técnicas fundamentais para o manuseio seguro dos materiais e fluidos biológicos (TEIXEIRA; VALLE, 2010).

Além do risco biológico, um laboratório de cultivo celular possui risco químico, com a utilização de agentes químicos, no geral, como corantes tóxicos (azul de tripan, MTT), DMSO, quimioterápicos, e risco físico, com agentes físicos como radiações (luz ultravioleta), frio (nitrogênio líquido) e calor (autoclave) (ALVES et al., 2010). O experimentador deve sempre ficar atento aos quadros de aviso no ambiente de trabalho e documentos descritivos de substâncias e meios, que contenham o símbolo universal de biossegurança e risco biológico (Figura 1).

**Figura 1** – Símbolo universal de biossegurança e risco biológico



**Fonte:** Acervo particular do autor.



Dentre as medidas de segurança para garantir um ambiente de trabalho seguro com cultura de células, destacam-se os Equipamentos de Proteção Individual (EPI), que são considerados elementos de contenção primária que podem reduzir a exposição individual a agentes potencialmente perigosos assim como proteger o material manipulado de potenciais contaminações (DA SILVEIRA, 2019).

A higienização das mãos deve anteceder o uso dos EPIs com o objetivo de remover as células descamativas, sujidades, pelos, oleosidade e a microbiota da pele, interrompendo a transmissão pelo contato, além de prevenir as infecções cruzadas. Por isso, todos os profissionais de laboratório devem adotar essa prática, para tanto, deve lavar as mãos até a parte anterior do antebraço com água e sabão, preferencialmente antisséptico, e devem retirar anéis, relógios, e demais adornos (PAULA et al., 2017).

### 3 EPIS NA CULTURA DE CÉLULAS

A seguir serão descritos os principais EPIs de uso comum em um laboratório de cultivo celular.

#### 3.1 Luvas

As luvas são utilizadas para proteger as mãos e o material manejado, seu uso é obrigatório na manipulação de qualquer material biológico ou produto químico. São fabricadas em diferentes materiais para atender às atividades laboratoriais.

- a. Luva de procedimento (descartável):** São colocadas após a higienização das mãos, deve-se realizar assepsia das luvas com álcool 70% após calça-las e sempre que necessário durante o desenvolvimento das atividades e devem ser descartadas ao término (Figura 2A).

**Figura 2** – Tipos de luvas. A) Luvas descartáveis comuns. B) Luva de borracha antiderrapante. C) Luva de fio de Kevlar tricotado. D) Luva criogênica impermeável



**Fonte:** Acervo particular do autor.

- b. Luva de borracha antiderrapante:** As luvas de borracha grossas são usadas para manipulação de resíduos, lavagem de material ou para procedimentos de limpeza em geral. Essas luvas podem ser reutilizadas depois de higienizadas (Figura 2B).
- c. Luvas resistentes a temperaturas altas e baixas:** São utilizadas na manipulação de materiais submetidos a aquecimentos ou congelamentos. Utilizadas, por exemplo, no processo de autoclavagem de material e na criopreservação das células. Como exemplo, pode-se citar as luvas de fio de Kevlar tricotado, que protegem o experimentador durante a realização de trabalhos a temperaturas até 250 °C (Figura 2C). Já as luvas criogênicas impermeáveis são utilizadas em temperaturas baixas de até -196 °C (Figura 2D).

## 3.2 Máscaras

As máscaras são EPIs projetadas para ajudar a prevenir a contaminação do ambiente de trabalho ou o material manipulado com as partículas de saliva ou muco, geradas pelo pesquisador, evitando-se também a contaminação do manipulador com material biológico e substâncias químicas. O uso das máscaras (Figura 3) auxilia na prevenção, por exemplo, da propagação de bactérias como *Mycoplasmaspp*, consideradas um dos grandes vilões da cultura celular, sendo responsáveis por frequentes contaminações (SHLOMO; KORNSPAN, 2012), evitando que atinjam as células, meios, reagentes e equipamentos. Dividem-se em dois tipos principais: as máscaras cirúrgicas, que são sempre descartáveis (Figura 3A), e as máscaras de proteção respiratória propriamente ditas (também designadas "respiradores") (Figura 5-B).

**a. Máscara cirúrgica:** é um equipamento médico hospitalar descartável que limita a transmissão de agentes infecciosos por gotículas, não protegendo de agentes infecciosos transmitidos por via aérea, ou seja, presentes em partículas de dimensões iguais ou inferiores a 5µm. São projetadas, portanto, para ajudar a prevenir a contaminação do ambiente de trabalho ou da amostra com as partículas grandes (exemplo: saliva e muco).

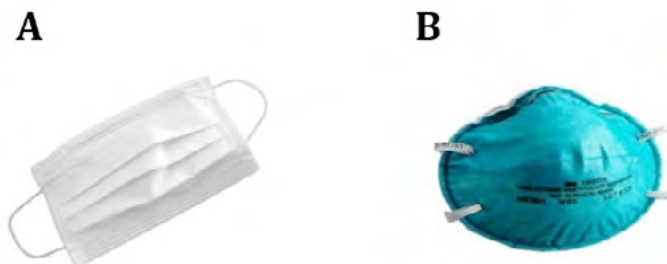
**b. Respiradores:** também designada "máscara de proteção respiratória" são constituídas por uma peça facial e por um elemento filtrante. Nos modelos autofiltrantes, a peça facial é composta pelo próprio material filtrante – Peça Facial Filtrante - (PFF). Seguem abaixo as classificações dos filtros e para quais contaminantes são recomendados:

PFF1 / P1: Poeiras e/ou Névoas (aerossóis mecanicamente gerados)

PFF2 / P2: Fumos (aerossóis termicamente gerados) e/ou Agentes Biológicos

PFF3 / P3: Particulados altamente tóxicos ( $LT < 0,05 \text{ mg/m}^3$ ) e/ou de toxidez desconhecida.

**Figura 3** – Máscara descartável (A) e máscara N95(PFF2) (B).



**Fonte:** Acervo particular do autor.

### 3.3 Jaleco (avental)

O jaleco ou avental é uma vestimenta de proteção que deve ser separado para uso exclusivo dentro da sala de cultura. Tem a função de minimizar a exposição dos pesquisadores e do meio ambiente a materiais perigosos associados às células cultivadas, enquanto protege simultaneamente as culturas celulares de contaminações. Deve ser lavado com frequência e esterilizado com lâmpada UV antes do uso.

### 3.4 Touca

O gorro ou touca tem a função de proteger os cabelos de aerossóis e salpicos durante a manipulação como também evitar contaminação da cultura com queda de fios de cabelo.

### 3.5 Propé

O propé é para proteção dos calçados para trabalhar em áreas estéreis como no laboratório de cultura de células, podendo ser substituídos por sapatos de plástico de fácil higienização de uso exclusivo dentro do laboratório.

### 3.6 Protetores faciais

Os óculos de segurança e os protetores faciais tipo escudo (*shield*) (Figura 4) são usados para proteger os olhos e o rosto em todas as atividades que possam produzir salpicos, respingos e aerossóis, assim como possível projeção de estilhaços pela quebra de materiais contaminados com substâncias químicas ou material biológico.

**Figura 4** – Óculos (A) e protetor facial tipo *shield* (B)

**A**



**B**



**Fonte:** Acervo particular do autor.

## 4 TÉCNICAS DE CONTROLE DE CONTAMINAÇÕES

De fato, as infecções microbiológicas representam o principal problema para a manutenção das células *in vitro*. Agentes infecciosos,

como bactérias e fungos, são tóxicos para as células eucarióticas e, por fim, levam à morte celular. Além disso, mesmo níveis baixos de contaminação podem produzir resultados anormais e levar a interpretações científicas erradas (SEGERITZ; VALLIER, 2017).

Então, além do uso dos EPIs, faz-se necessário manter o ambiente do laboratório de cultura de células o mais asséptico possível, uma vez que o ar atmosférico carrega micropartículas de natureza potencialmente infecciosa, sendo assim, a cabine de segurança biológica é o equipamento de proteção coletiva (EPC) crucial para restringir a contaminação das células cultivadas pelos aerossóis não estéreis e os componentes transportados pelo ar.

## 4.1 Cabine de Segurança Biológica (CSB)

As cabines de segurança biológica (CSBs) são equipamentos com sistemas de filtração de ar que protegem o profissional, o material que está sendo manipulado e o ambiente laboratorial dos aerossóis potencialmente infectantes. As CSBs têm filtros de alta eficiência, sendo mais utilizado atualmente o filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) que apresenta uma eficiência de filtração de 99,93% para partículas de 0,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, chamadas de MPPS (*Maximum Penetration Particulate Size*) (BRASIL, 2010).

Os sistemas de filtração das CSBs são de acordo com o tipo de microrganismo ou produto que vai ser manipulado em cada cabine, podendo esse filtro ser mais ou menos complexo para atender a necessidade de trabalho de cada laboratório. Por isto, elas são classificadas em três tipos: Classe I, Classe II, subdivididas em A1, A2 e B2 (Tabela 1) e Classe III, sendo a de classe II a mais utilizada na cultura de células (Figura 5).

**Figura 5** – Cabine de segurança biológica classe II tipo A1



**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Tabela 1** – Comparação entre as CSBs de Classe II

<b>Tipo</b>	<b>Padrão de fluxo do ar</b>	<b>Radionucleotídeos / Substâncias Químicas</b>	<b>Risco Biológico (classes)</b>
Classe II Tipo A1	70% de ar recirculado através de filtro HEPA.  30% de ar exaurido para o ambiente interno através de filtro HEPA.	Não	1 e 2
Classe II Tipo A2	70% de ar recirculado através de filtro HEPA.  30% de ar exaurido para o ambiente externo através de filtro HEPA.  Nenhuma recirculação de ar.	Sim (Níveis baixos / baixa volatilidade-toxicidade)	1, 2 e 3
Classe II Tipo B2	100% de ar exaurido através de filtros HEPA e tubulação rígida para o ambiente externo.	Sim	1, 2 e 3

As instruções para utilização das CSBs devem ser bem descritas nos Protocolos Operacionais Padrão (POP) e seguidos à risca (BRASIL, 2010). Dessa forma, algumas recomendações são indispensáveis, como:

- Ao ligar a cabine, esperar o fluxo de ar estabilizar e, então, se inicia o processo de descontaminação da superfície da área de trabalho com álcool 70%;
- Pulverizar as paredes e superfície de trabalho com o álcool 70% com cuidado para não atingir o filtro e nem os terminais elétricos da lâmpada fluorescente e a lâmpada Ultravioleta (UV);
- Não colocar a cabeça dentro da cabine, limpar as paredes de cima para baixo e a mesa de trabalho de trás para frente, seguindo o fluxo da exaustão e evitando trazer a contaminação removida na sua direção;
- Todo material que entrará na CSB também precisa ser pulverizado com álcool 70%, mantendo o menor número possível de itens e evitando qualquer obstrução ao fluxo de ar, verificando sempre se as grelhas estão totalmente desbloqueadas;
- Por fim, liga-se a luz UV como método secundário de descontaminação por 15 a 20 minutos, lembrando que a luz UV não penetra em materiais, agindo somente na superfície, então, materiais com embalagens de fábrica ou do processo de autoclavagem devem ser abertos dentro da cabine e expostos para receber a luz UV.

Uma atenção especial deve ser dada a utilização da lâmpada UV, pois a intensidade da mesma é afetada pela distância da superfície a ser descontaminada e pelo acúmulo de sujidades em sua superfície. Portanto, é necessário limpar após cada utilização e não tocar a lâmpada com as mãos sem luvas, pois o óleo natural da pele pode criar uma barreira para a luz. Durante o período em



que a lâmpada UV estiver ligada é aconselhável que ninguém permaneça no ambiente, a menos que a abertura frontal da cabine esteja fechada (BRASIL, 2010).

Após desligar a lâmpada UV, a cabine estará pronta para receber as células, sendo agora a cabine um ambiente asséptico. É importante ajustar a altura da cadeira, fazendo com que o rosto do pesquisador fique acima da abertura frontal, posicionar os braços dentro da cabine e esperar alguns segundos para que ocorra a estabilização do fluxo de ar e a remoção de partículas contaminantes que são introduzidas junto com os braços. É importante executar as atividades dentro da cabine evitando movimentos bruscos e o movimento de introduzir e retirar os braços da cabine deve ser cuidadoso para não interferir no fluxo de ar.

Ao término das atividades dentro da CSB deve-se pulverizar álcool 70% novamente nas garrafas de cultura que voltarão para incubadora de CO<sub>2</sub>, segregar o que vai para descarte de material contaminado, e o que vai para lavagem/autoclavação, cobrindo o recipiente de descarte antes de serem retirados. É necessário proceder a descontaminação da CSB após o uso (SEGERITZ; VALLIER, 2017).

## **5 LIMPEZA, DESINFECÇÃO E ESTERILIZAÇÃO**

Toda superfície da área de trabalho do laboratório de cultura de células incluindo bancadas, pisos e paredes necessitam de limpeza e desinfecção regular. Utiliza-se para tanto, solução de hipoclorito (água sanitária comercial, 2% a 5% de cloro) diluindo-se 5 mL de solução de hipoclorito em um litro de água. Por ser um agente oxidante, o hipoclorito age sobre os constituintes da membrana, levando os microrganismos à morte. Outro aliado indispensável no processo de desinfecção é o álcool etílico a 70%, um excelente desinfetante por suas propriedades desidratante e desnaturante de proteínas, sendo esse feito responsável por sua ação antimicrobiana. Lembrando que

o material de limpeza deve ser exclusivo da sala de cultura (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Também é essencial manter todas as outras superfícies que entram em contato com as garrafas de cultura de células, meios e suplementos limpos e desinfetados, isso inclui todos os equipamentos como incubadora de CO<sub>2</sub>, centrífuga, microscópio, banho-maria, geladeira e freezer.

A desinfecção dos equipamentos deve ser realizada semanalmente com álcool 70% como o microscópio, balança e centrífuga, mas há equipamentos que exige uma limpeza prévia com água e detergente neutro para remoção de sujidades para posterior desinfecção com álcool 70%, como é o caso do banho-maria e incubadora de CO<sub>2</sub> (SALVATORI, 2013).

A incubadora de CO<sub>2</sub> e o banho-maria são os equipamentos mais favoráveis para a proliferação de microrganismos, porém, seu material em inox favorece esse protocolo de limpeza e desinfecção. Para tanto, as garrafas de cultura da incubadora são removidas para dentro da cabine de segurança previamente limpa, ficando a incubadora livre para uma completa limpeza e descontaminação (ÇELIK-UZUNER; UZUNER, 2017).

## **5.1 Limpeza e desinfecção da Incubadora de CO<sub>2</sub>**

- Retirar da incubadora todas as partes removíveis, como estantes, hastes e bandeja, e lavar com água e sabão neutro;
- Em caso específico de derramamento de meio com células nas estantes ou no caso de contaminação recente, fazer uma descontaminação com hipoclorito ou detergente específico;
- Enxaguar com água abundante;
- Enxugar com papel toalha;

- Desinfectar com álcool 70%;
- A água da bandeja deve ser previamente preparada (água destilada autoclavada e acrescida de dodecil sulfato de sódio- SDS);
- Finalizar a descontaminação com a luz ultravioleta;
- A parte interna da incubadora deve ser desinfectada com álcool 70%.

## **5.2 Limpeza e desinfecção do banho-maria**

- Esvaziar o banho e lavar com água edetergente neutro;
- Enxugar;
- Passar álcool 70%;
- Encher o banho-maria com água destilada (pode-se colocar um pouco de hipoclorito na água do banho-maria).

## **5.3 Esterilização (Autoclavação)**

Todos os materiais utilizados no laboratório de cultura de células, desde vidrarias, tubos e ponteiros, devem ser estéreis. Primeiramente, o material passa pelo processamento de limpeza e desinfecção.

A esterilização é o processo de destruição ou eliminação total de todos os microrganismos na forma vegetativa e esporulada, por meio do uso de agentes físicos ou químicos (MCDONNELL, 2017).

Em laboratórios de cultura de células a forma mais utilizada é por meios físicos, o calor úmido e o seco, sendo a esterilização por calor úmido a autoclavação, que é o processo que oferece maior segurança e economia.

Na autoclavação, a esterilização é feita por vapor saturado sob pressão de 1 atmosfera, a uma temperatura de 121 °C. O processo leva em média 15 minutos, dependendo do material. É um método indicado

para a esterilização de materiais termorresistentes. É realizada com um equipamento denominado autoclave, semelhante a uma grande panela de pressão.

Antes de ser autoclavado, o material deve ser higienizado (BACHA; PONSANO, 2005), conforme descrito a seguir:

- Imergir em solução de água, hipoclorito e detergente neutro;
- Enxaguar abundantemente;
- Imergir em solução de água e detergente enzimático;
- Enxaguar abundantemente;
- Imergir em água destilada;
- Secar em estufa de secagem.

Após esses procedimentos, o material deverá estar pronto para ser autoclavado (BRASIL, 2010), conforme os passos a seguir:

- Todos os materiais precisam estar acondicionados em recipientes com aberturas para facilitar a retirada do ar e permitir a penetração do calor;
- Embalar o material com papel cirúrgico ou Kraft e fita adesiva termossensível;
- Identificar e datar;
- Não encher a autoclave até o máximo, é importante deixar espaço para a circulação do vapor. Distribuir o material de modo a garantir a circulação do vapor. A autoclavação perde a eficiência se o vapor não atingir todos os materiais. Com a câmara muito carregada a penetração do calor será inadequada e parte da carga não será esterilizada;

- Sempre conferir o nível de água, pois, se estiver abaixo da resistência, a autoclave pode ser danificada.
- Fechar e selar a tampa;
- Ligar no máximo e, quando começar a sair vapor, fechar a válvula;
- Esperar a temperatura atingir 121°C;
- Uma vez nessa temperatura, mudar para o médio e deixar 15 minutos;
- Após o período, desligar a autoclave e abrir a válvula para o vapor sair;
- Só abrir a tampa depois que o manômetro estiver no zero;
- Retirar o material com luvas resistentes ao calor.
- Colocar na estufa de secagem;
- Guardar em recipiente fechado.

Faz-se necessário realizar monitoramento da esterilização com testes biológicos para verificar a eficiência do processo de esterilização. Os indicadores biológicos são representados por tiras de celulose, meios de cultura ou outros veículos, impregnados geralmente por esporos bacterianos como *B. stearothermophilus* (JORGE, 2002).

Para a realização de testes biológicos, deve-se:

- Colocar os envelopes contendo os esporos na autoclave, em diferentes locais, inclusive dentro de caixas e pacotes.
- Submeter ao procedimento de esterilização adequado.
- A seguir, abrir os envelopes, retirar assepticamente a tira de papel contendo esporos com auxílio de uma pinça esterilizada e colocar no interior de tubos com meio de cultura (*TrypticSoyBroth*).

- Incubar a 37° C por 48 horas, deixando na estufa por até oito dias para confirmação. Observar crescimento de microrganismos; quando positivo, fazer esfregaço, corar pelo Gram e observar na microscopia presença de bacilos Gram-positivos esporulados.

## 5.4 Controle microbiológico

O controle microbiológico deve ser realizado não apenas no processo de autoclavação, mas em todo o ambiente do laboratório para o cultivo de células. O monitoramento microbiológico da sala, bem como das cabines de segurança biológica, deve ser realizado pela pesquisa de microrganismos, como fungos e bactérias. Um procedimento rotineiro indicado para controle ambiental é o método de exposição de placas com meios nutritivos ágar caseína de soja (trypticasesoyagar-TSA) e ágar sabouraud 4% de glicose (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Embora as bactérias possam ser detectadas como pequenas partículas com baixa ampliação ao microscópio, suas formas distintas são geralmente detectadas com maior ampliação. E, embora cepas bacterianas como *E. coli* possam ser descobertas facilmente devido ao seu tamanho (~ 2 µM) e à mobilidade induzida por flagelos, outras cepas como *Mycoplasma spp.* são de tamanho menor (<1 µM), imóveis e, portanto, não tão facilmente detectáveis. Como resultado, as infecções por *Mycoplasma* podem passar despercebidas por um longo período de tempo e, geralmente, só se tornam aparentes devido à diminuição da qualidade das células cultivadas. Isso pode se manifestar como proliferação celular reduzida e morte celular (SEGERITZ; VALLIER, 2017).

Para monitorar as culturas de células em busca de possíveis infecções por *Mycoplasma*, é aconselhável testar rotineiramente as culturas quanto à sua presença, uma vez que é muito fácil esse tipo de contaminação, pois eles se encontram na via respiratória humana. Para detectar micoplasmas, pode-se utilizar o teste de coloração fluorescente Hoescht 33258, que cora DNA, assim, ao observar uma

cultura contaminada em microscopia de fluorescência é possível visualizar o núcleo da célula e o seu contorno (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Pode-se também identificar a contaminação usando reação em cadeia da polimerase (PCR), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou imunocoloração (DREXLER; UPHOFF, 2002). Outro desafio é a presença de contaminantes virais, mas que também pode ser confirmado com PCR, ELISA, imunohistoquímica, ou microscopia eletrônica (SEGERITZ; VALLIER, 2017; MERTEN, 2002).

## REFERÊNCIAS

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. **EPSJV**, 2010.

ALVES, E. A. et al. Cultivo celular. 2010

BACHA, Stella Maris Cortez; PONSANO, Giglio. **Biossegurança em fonoaudiologia: enfoque em motricidade orofacial**. Pulso Editorial, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde de Brasília. Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. Biossegurança- Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais. Série Telelab, 2010.

ÇELIK-UZUNER, S.; UZUNER, U. An Extensive Method for Maintenance of Sterility in Mammalian Cell Culture Laboratory Routine. **Challenges**, v. 8, n. 2, p. 26, 2017.

DA SILVEIRA, J. E. S. et al. PRINCIPAIS MEDIDAS PREVENTIVAS DE BIOSSEGURANÇA UTILIZADAS EM LABORATÓRIOS CLÍNICOS DE SAÚDE. **Mostra Científica da Farmácia**, v. 6, n. 1, 2019.

DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology**, v. 39, n. 2, p. 75-90, 2002.

JORGE, A. O. C. Princípios de biossegurança em odontologia. **Revista biociências**, v. 8, n. 1, 2002.

MCDONNELL, G. E. **Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action, and resistance**. John Wiley & Sons, 2017.

MERTEN, O.-W. Virus contaminations of cell cultures—a biotechnological view. **Cytotechnology**, v. 39, n. 2, p. 91-116, 2002.

PAULA, D. G. et al. Estratégias de adesão à higienização das mãos por profissionais de saúde. **R Epidemiol Control Infec**, v. 7, n. 2, p. 113-21, 2017

SALVATORI, R. U. **Laboratório de Microbiologia: normas gerais, instruções de trabalho e procedimentos operacionais padrões** / Rosângela UhrigSalvatori, Greice Aline Kaisecamp Wolf, Fabíola Dresch e Andreia Aparecida Guimarães Strohschoen - Lajeado: Ed. da Univates, 2013.

SEGERITZ, C.-P.; VALLIER, L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. In: **Basic Science Methods for Clinical Researchers**. Academic Press,. p. 151-172, 2017.

SHLOMO, R. K., N. S.; KORNSPAN, J. D. Contamination of Tissue Cultures by Mycoplasmas. 35-56, **IntechOpen**, 2012.

SILVA, E. J. **Princípios de biossegurança aplicados à fase pré-analítica do laboratório de análises clínicas**. 2017.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (Ed.). **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2010.



# CAPÍTULO 5

## MEIOS DE CULTIVO CELULAR

*Valgrícia Matias de Sousa  
Juan Carlos Ramos Gonçalves*

### 1 INTRODUÇÃO

Para que as células cresçam e se mantenham em cultura é necessário que sejam disponibilizados meios nutritivos, capazes de simular as condições ideais para um determinado tipo celular. Muitas vezes, estes meios requerem suplementação com outras substâncias e devem ser constantemente renovados, de modo a fornecerem os nutrientes adequados, bem como garantir condições de assepsia suficientes, evitando-se contaminações.

Neste capítulo, serão fornecidos elementos teóricos e práticos, de modo a permitir uma melhor compreensão acerca dos principais meios de cultura de células utilizados na rotina laboratorial.

### 2 COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

As células animais isoladas de tecidos vivos e as células de linhagem podem crescer *in vitro* quando são suplementadas de nutrientes e estímulos essenciais para o seu crescimento, proliferação e sobrevivência. Esse ambiente artificial propício para as células é chamado de cultura celular, intrinsecamente controlado por parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, oxigênio, gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e umidade.

Os nutrientes necessários para o crescimento, divisão e multiplicação celular são fornecidos por um veículo líquido chamado de **meio de cultura**. Este veículo nutricional é composto por diversos componentes, dentre estes: sais inorgânicos, vitaminas, aminoácidos essenciais e não essenciais, proteínas, glicose, antibióticos e um indicador de pH, sendo necessária uma composição específica para as diferentes linhagens celulares dependendo da demanda nutricional e energética de cada uma delas (Quadro 1) (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009).

**Quadro 1** – Componentes básicos dos meios de cultura

Sais	Vitaminas	Aminoácidos	Proteínas	Outros
NaCl	Biotina	Arginina		Penicilina
KCl	Colina	Cistina	Insulina	Estreptomicina
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Folato	Glutamina	Transferrina	Glicose
NaHCO <sub>3</sub>	Nicotinamida	Isoleucina	Fatores específicos do crescimento	Vermelho de fenol
CaCl <sub>2</sub>	Tiamina	Leucina		Soro fetal
MgCl <sub>2</sub>	Riboflavina	Triptofano		

Os meios de cultura celular podem ser classificados em **meio completo e incompleto**. A denominação de meio completo é designada pela presença do elemento soro, que o difere do meio incompleto. Este elemento é rico em fatores de crescimento que induzem a proliferação, e fatores de adesão que são responsáveis pela adesão celular ao substrato e que levam a sustentabilidade das células.

Os soros mais utilizados na complementação dos meios são provenientes de bezerro bovino (BCS) ou bovino fetal (SBF), sendo este último geralmente mais enriquecido em fatores de crescimento e, portanto, mais adequado para a maior parte das culturas celulares.

A suplementação de componentes adicionais no meio de cultura, como os tampões HEPES (ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1) e bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), ou de fontes energéticas como piruvato de sódio e glicose, além de insulina bovina, dentre outros, são condicionados às necessidades nutricionais de cada linhagem celular específica, o que por sua vez, está atrelado ao metabolismo e função celular característicos (Tabela 1) (FRESHNEY, 2011).

**Tabela 1.** Exemplos da suplementação de meios para algumas linhagens celulares específicas

Linhagens e meios	L929	OVCAR-3	PC-3	HeLa
<b>Componentes adicionais</b>	RPMI -1640 Tradicional	RPMI -1640 Modificado	F-12K	DMEM alta glicose
<b>Bicarbonato de sódio</b>	2,0 g/L	1,5 g/L	----	3,7 g/L
<b>HEPES</b>	3,0 g/L	2,4 g/L	----	2,0 g/L
<b>Glicose</b>	----	2,5 g/L	----	----
<b>Piruvato de sódio</b>	----	10 mL (estoque [10 mM])	----	----
<b>Insulina bovina</b>	----	10 mg/L	----	----
<b>Soro Fetal Bovino (SBF)</b>	10%	20%	10%	10%
<b>Solução de antibióticos (penicilina/ eestreptomicina)</b>	1%	1%	1%	1%
<b>Solução de aminoácidos</b>	----	----	1% (500 $\mu\text{L}$ / 50 mL de meio)	----

**Legenda:** RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute;  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium;  
F-12K: Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium.

## **3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

Os meios de culturas utilizados na rotina para a manutenção e o crescimento de células eucarióticas são, em sua grande maioria, de natureza química complexa, sujeitos, portanto, às variações de natureza físico-química, tais como pH, temperatura, tensão gasosa de oxigênio (O<sub>2</sub>), gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e umidade.

Qualquer variação nos fatores físico-químicos pode interferir no crescimento celular, devendo o manipulador estar sempre atento às variações nestes parâmetros. A seguir, serão apresentados alguns dos principais fatores físico-químicos relacionados aos meios de cultivo.

### **3.1 pH**

O pH ideal para o crescimento da maioria das células em cultura pode variar em torno de pH 7,4 a pH 7,7, de acordo com o tipo celular específico. Majoritariamente, as linhagens celulares desenvolvem-se saudavelmente em pH 7,4, e as células transformadas crescem bem entre pH 7,0 a pH 7,4 (YAO; ASAYAMA, 2017).

Com o intuito de facilitar a análise visível do pH no microambiente da cultura celular ideal, faz-se necessário o uso de um indicador de pH adicionado ao meio de cultura, como o vermelho de fenol. Este indicador, em pH 7,4, reflete uma coloração vermelho claro, em pH 7,0 exibe uma cor alaranjada, já em pH 6,5 apresenta-se amarelo, e, com o aumento do pH para 7,8, o indicador reflete uma coloração vermelho escuro/roxa. A vantagem de utilizar o indicador é a facilidade de avaliação de alterações no meio, e a desvantagem está na percepção da cor que é subjetiva (FRESHNEY, 2011).

## 3.2 Tamponamento

Os sistemas-tampão, ou tampões, são frequentemente utilizados na rotina laboratorial, uma vez que servem para evitar a variação significativa do pH na faixa ideal do meio, quando expostos a diferentes condições inerentes da cultura celular, como a variação nas concentrações de  $\text{CO}_2$ , metabólitos, etc. Dentre os principais tampões utilizados em grande parte das culturas, pode-se citar o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e o HEPES ( $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ).

O bicarbonato de sódio é um tampão inorgânico que possui capacidade fraca de tamponamento, mas é amplamente utilizado por apresentar baixa toxicidade, baixo custo e benefício nutricional para a cultura. Além disso, esse sistema de tamponamento ocorre naturalmente no corpo humano e outros animais, melhor se aproximando das condições fisiológicas.

Por sua vez, o HEPES é um agente orgânico zwitteriônico (dupla polaridade) que possui maior tamponamento, porém, é mais tóxico e de alto custo, quando comparado ao bicarbonato de sódio, devendo ser utilizado com maior cautela (FRESHNEY, 2011).

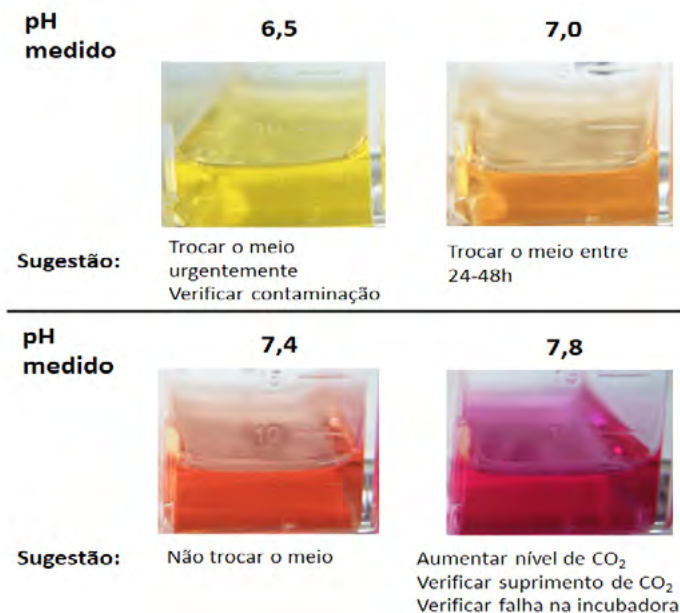
## 3.3 Concentração de $\text{CO}_2$

A maioria dos laboratórios de cultura de células possui uma incubadora de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) umidificada em 5% de  $\text{CO}_2$ , no entanto, nem sempre é óbvio o motivo pelo qual as culturas precisam dessa quantidade de  $\text{CO}_2$ .

Inicialmente, é importante ressaltar que o  $\text{CO}_2$  não é um requisito metabólico para as culturas celulares e tecidos de animais. O objetivo do uso desse gás está envolvido na formação do ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), por meio das reações de tamponamento do sistema bicarbonato, utilizado no controle do pH. Dessa forma, a quantidade de  $\text{NaHCO}_3$  no

meio é o que na verdade determina a quantidade de CO<sub>2</sub> que deve ser usada para manter o pH da cultura (Figura 1).

**Figura 1** – Variações na coloração do meio DMEM em função do pH e da concentração de CO<sub>2</sub>



**Fonte:** Acervo particular do autor.

### 3.4 Controle de qualidade da água

A água é o componente primordial utilizado na preparação dos meios e soluções. O controle de qualidade da água é essencial para evitar a contaminação por diferentes compostos orgânicos e microrganismos, em virtude da facilidade desse veículo em reter impurezas que venham a influenciar no crescimento das células *in vitro*.

A água utilizada em cultura celular passa por um processo de filtração com carvão ativado, colunas de troca iônica e filtros revestidos de acetato de celulose, que produzem a água ultrapura proveniente de um ciclo do sistema de purificação. A vantagem deste processo é a redução do risco de possíveis contaminações, no entanto trata-se de um sistema de alto custo e que requer manutenção frequente, sendo esta a desvantagem na produção (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009).

## 4 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

A seguir, para fins ilustrativos, será descrito como exemplo prático a preparação do meio RPMI – 1640 (Tabela 2).

**Tabela 2** –Preparo de 1L de meio RPMI - 1640

COMPONENTES	QUANTIDADES
HEPES	3,0 g/L
Bicarbonato de sódio	2,0 g/L
RPMI - 1640	1 frasco em pó
Água	q.s.p. 1L
NaOH	Se necessário
HCl	Se necessário

### 4.1 Protocolo de preparação

- Pesar o HEPES e o bicarbonato de sódio;
- Depositar o volume de 1 L de água ultrapura em uma proveta;
- Em um béquer de 1 L, adicionar parte do volume de água reservado 800 ml);

- d) Colocar o béquer com o volume de água em um agitador magnético e adicionar lentamente todo o conteúdo do frasco de meio RPMI 1640;
- e) Após a dissolução do meio, acrescentar os tampões: HEPES e bicarbonato de sódio. Manter sob agitação, até que ambos sejam dissolvidos totalmente;
- f) Ainda sob agitação, ajustar o pH para 7,2, adicionando soluções específicas (NaOH ou HCl);
- g) Completar o volume com água para 1 L;
- h) Ligar o fluxo laminar e colocar todos os materiais estéreis necessários para a filtração do meio. Ligar a lâmpada UV por 15 minutos;
- i) Levar o béquer (contendo o meio preparado) para o fluxo laminar previamente estéril;
- j) Instalar a bomba à vácuo ao sistema de filtração estéril;
- k) Após o término da filtração, deve-se adicionar 1% da solução de antibióticos (penicilina/estreptomicina) ao meio (10 ml da solução a cada 1 L de meio RPMI). Homogeneizar;
- l) Realizar o teste de esterilidade do meio filtrado na incubadora de células por 24 horas.

## **4.2 Filtração do meio**

O processo de filtração para substâncias orgânicas ou lábeis, como o meio de cultura, consiste em um sistema de filtração por membranas de acetato de celulose com porosidade menor que 0,22  $\mu\text{m}$ . Em virtude dessas substâncias serem facilmente degradadas na presença do calor, são consideradas lábeis ao processo de autoclavagem. No entanto, o aparato utilizado no sistema de filtração é anteriormente autoclavado para garantir esterilidade e segurança no processo.



Dessa forma, o processo de filtração consiste na passagem do líquido (meio) pela membrana (0,22 µm) impedindo a passagem de microrganismo, e garantindo a esterilidade e eficiência do procedimento. Em seguida, o material filtrado é analisado por meio do teste de esterilidade por incubação do líquido em um tubo cônico de polipropileno estéril tipo Falcon, levado diretamente à estufa de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, com a tampa semiaberta. Após 24 horas uma alíquota é analisada no microscópio, e, sendo descartado indício de contaminação, o meio filtrado poderá ser utilizado com segurança.

O meio é filtrado sem suplementação, como soro bovino fetal (SBF) ou solução de aminoácidos, para evitar a perda desses componentes nutritivos no processo de filtração. Dessa forma, o meio deverá ser alíquotado e suplementado conforme a necessidade de uso (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009).

## REFERÊNCIAS

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells. Wiley Online Books.** Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 99-114.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**, v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2009.

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cellculture media: History, characteristics, and current issues. **Reprod. Med. Biol.**, v. 16, 99-117, 2017.

# CAPÍTULO 6

## CRIOPRESERVAÇÃO

*Thaís Mangeon Honorato Lisboa*

*Marianna Vieira Sobral*

### 1 INTRODUÇÃO

A utilização de células em cultura por longos períodos de tempo acabam induzindo alterações fenotípicas, uma vez que, durante os processos de imortalização que ocorrem durante várias gerações celulares, há uma grande probabilidade de ocorrerem alterações demasiadas em seu DNA. Dessa forma, faz-se necessário induzir o processo de congelamento celular, para que as células diminuam ou mesmo atrasem o surgimento de eventuais alterações que poderiam ocorrer quando em cultura.

Neste capítulo, serão introduzidos os fundamentos da criopreservação de células animais, além de fornecer em detalhes protocolos demonstrativos e ilustrados de técnicas de congelamento e descongelamento de células utilizadas na rotina de um laboratório de cultivo celular.

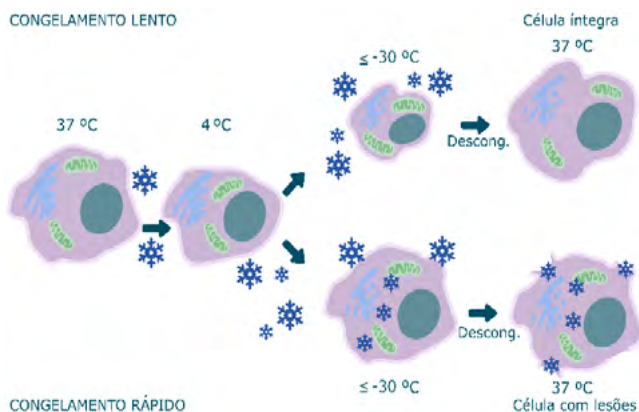
## **2 CRIOPRESERVAÇÃO: DA TEORIA À BANCADA**

A criopreservação é uma técnica empregada no cultivo celular que utiliza baixas temperaturas para armazenar células. A preservação do estoque de células em temperaturas abaixo de -130 °C permite o armazenamento de células a longo prazo por períodos de pelo menos duas a três décadas (GURRUCHAGA et al., 2018). A temperatura muito baixa utilizada na criopreservação (-196 °C) interrompe a atividade biológica, preserva o DNA celular e impede a morte celular, de modo a conservar a capacidade proliferativa da célula (PERES; CURI, 2005). É importante que o congelamento seja feito em células com poucas passagens para preservar as características celulares (CREE, 2011).

### **2.1 Congelamento**

Células em cultura geralmente são congeladas em nitrogênio líquido. O congelamento deve ser um processo lento, em geral, sugere-se a redução de 1 °C por minuto (PEGG, 2007). A redução vagarosa da temperatura promove a solidificação da água presente no meio, e o aumento da força osmótica causa um efluxo de água das células, essa água congela no exterior, deixando a célula desidratada (GURRUCHAGA et al., 2018; ALVES; GUIMARÃES, 2010). Um resfriamento lento é necessário para permitir o efluxo suficiente de água, e assim minimizar a probabilidade de formação de gelo intracelular (PEGG, 2007). Esse processo é necessário, pois a formação de cristais dentro da célula pode levar ao rompimento da membrana celular, e, conseqüentemente, à morte celular (Figura 1).

**Figura 1** – Processos de congelamento lento e rápido, seguido de descongelamento (Descong.)



**Fonte:** Autoria própria.

Legenda: O processo de congelamento envolve a redução gradual de temperatura que pode ser realizada de forma lenta (congelamento lento) ou rápida (congelamento rápido). No processo de congelamento lento a vagarosa redução de temperatura promove o congelamento da água presente no meio extracelular, o que permite que a água do meio intracelular saia da célula pelo processo de osmose, e à medida que a água sai ela congela no meio extracelular.

No processo de congelamento rápido ocorre o congelamento da água no meio extracelular e intracelular, formando cristais dentro da célula que levam a dano na membrana celular e posterior morte da célula.

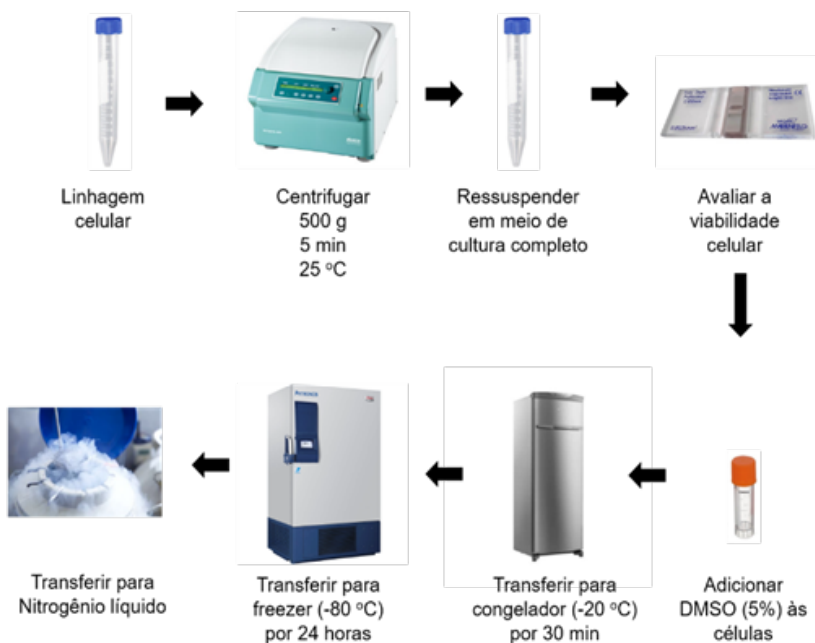
Utilizando esse processo de congelamento lento obtém-se maior viabilidade celular do que no processo de congelamento rápido, no qual as células são transferidas diretamente para o nitrogênio líquido (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Além disso, também são usados crioprotetores, que protegem a membrana das células dos cristais formados. O agente crioprotetor comumente utilizado é o dimetilsulfóxido (DMSO), mas o glicerol também é uma alternativa (GURRUCHAGA et al., 2018; PERES; CURI, 2005; ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Os processos de congelamento e descongelamento é o mesmo para células em suspensão ou de adesão. Segue uma metodologia simplificada para o congelamento de linhagens celulares (Figura 2).

- Transferir as células para um tubo cônico de polipropileno estéril tipo Falcon (se as células forem aderentes deve ser realizado o processo de tripsinização, e, após 5-10 minutos, inativar a tripsina com meio de cultura e transferir as células para o tubo cônico de polipropileno estéril tipo Falcon).
- Centrifugar a 500 x g por 5 minutos a 25°C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em meio de cultura completo (10% de Soro Bovino Fetal - SBF + 1% de penicilina/estreptomicina. O volume de meio dependerá do tamanho do precipitado formado: geralmente 1 mL de meio para um precipitado celular pequeno).
- Realizar coloração com azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer para avaliar a viabilidade celular (ver Capítulo 8).
- Se a cultura apresentar  $\geq 90\%$  de células viáveis, seguir o procedimento de congelamento.
- Transferir 950  $\mu\text{L}$  da suspensão celular para um tubo criogênico e adicionar 50  $\mu\text{L}$  de DMSO por gotejamento (5% de DMSO).
- Homogeneizar rapidamente e vedar o tubo criogênico com filme de alta aderência utilizado para vedação (Parafilm M).
- Transferir para o congelador (-20 °C), onde o criotubo deve permanecer por 20 a 30 minutos.
- Transferir o criotubo para o freezer -80 °C.

- No dia seguinte, transferir o criotubo para um container de nitrogênio líquido, onde os criotubos devem ser mantidos imersos na fase líquida no nitrogênio.

**Figura 2** – Metodologia para congelamento de células



**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Legenda:** Para o processo de congelamento, as células devem ser centrifugadas, em seguida, ressuspensas em meio de cultura completo e avaliada a viabilidade celular. Posteriormente, as células devem ser transferidas para tubo criogênico e o DMSO adicionado por gotejamento, o tubo criogênico deve ser transferido para o congelador por 30 minutos e, em seguida, transferido para o freezer -80 °C. Após 24 horas, o tubo criogênico deve ser armazenado em nitrogênio líquido.

## 2.2 Descongelamento

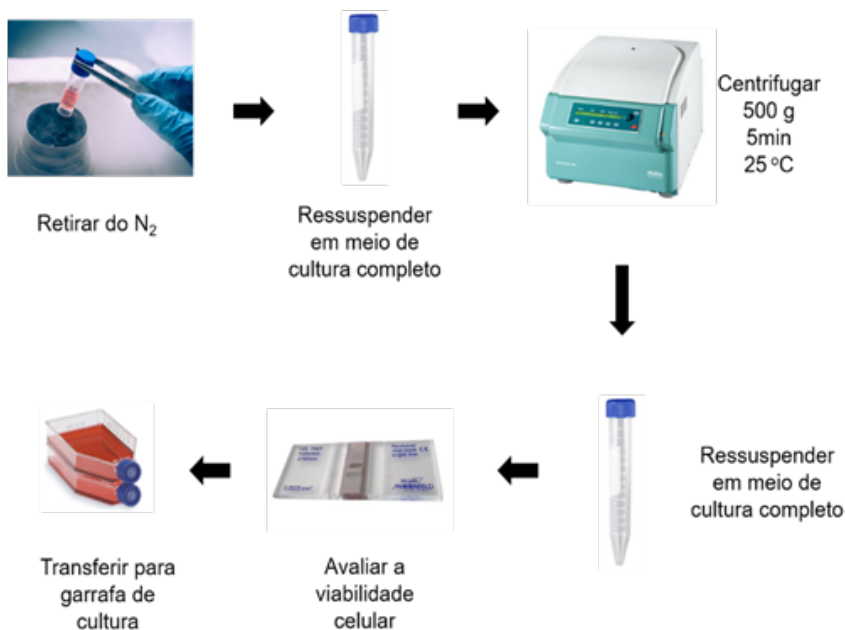
O descongelamento das células é um processo simples, porém importante, que requer a mesma atenção que o processo de congelamento. Apesar do congelamento lento e do uso de agentes crioprotetores durante o congelamento, o processo de criopreservação é danoso para as células e o crescimento de células após o descongelamento é lento. Portanto, após o descongelamento, as células devem ser cultivadas em meio de cultura com uma concentração de soro bovino fetal maior que a usual (20%) até que se recuperem (ALVES; GUIMARÃES, 2010; PERES; CURI, 2005).

Para minimizar a perda de células, o processo de descongelamento deve ser realizado com cuidado e rapidamente (PERES; CURI, 2005). As etapas do descongelamento que devem ser levadas em consideração para garantir uma criopreservação bem-sucedida serão resumidas e discutidas a seguir (Figura 3).

- Retirar o tubo criogênico do container de nitrogênio líquido e colocar em gelo.
- Dentro do fluxo laminar, deixar descongelar (não totalmente) em temperatura ambiente, e transferir rapidamente o conteúdo celular para um tubo cônico de polipropileno estéril tipo Falcon contendo 10-20 mL de meio de cultura completo (adicionado de 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina).
- Centrifugar a 500 x *g* por 5 minutos a 25 °C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender em meio de cultura completo (20% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina). Essas duas últimas etapas têm como objetivo eliminar o crioprotetor do meio celular.

- Realizar coloração com azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer para avaliar a viabilidade celular (ver Capítulo 8).
- Transferir a suspensão celular para uma garrafa de cultivo celular.
- Manter em incubadora de CO<sub>2</sub> para recuperação das células.

**Figura 3** – Metodologia para descongelamento de células



**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Legenda:** O processo de descongelamento deve ser iniciado com a retirada do tubo criogênico do nitrogênio líquido, em seguida, as células devem ser ressuspensas em meio de cultura completo. Após centrifugação, as células devem ser novamente ressuspensas em meio de cultura completo para avaliação da viabilidade celular, seguida de transferência para a garrafa de cultivo celular.



## REFERÊNCIAS

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. "Cultivo celular". Rio de Janeiro: Fiocruz, **EPSJV**, 2010.

CREE, I. A. Principles of Cancer Cell Culture. In: **Methods in Molecular Medicine**. p. 13-26, 2011.

GURRUCHAGA, H; DEL BURGO, L. S.; HERNANDEZ, R. M.; ORIVE, G.; SELDEN, C.; FULLER, B.; PEDRAZ, J. Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. **Journal of Controlled Release**, 2018.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. In: Cryopreservation and freeze-drying protocols. **Humana Press**, p. 39-57, 2007.

PERES, C. M.; CURI, R.; PAFFARO, A. M. D. A.; MARTINS, A. K. A.; PIMENTA, A.; GONÇALVES, C. R; MARTINS, E. F. **Como cultivar células**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.

# CAPÍTULO 7

## PROPAGAÇÃO DAS CULTURAS

*Tháís Mangeon Honorato Lisboa*

*Marianna Vieira Sobral*

### 1 INTRODUÇÃO

O processo de propagação celular visa evitar a morte nos cultivos, pois as células geralmente param de se dividir em alta densidade devido a vários fatores, dentre estes, o aglomerado celular e o esgotamento de fatores de crescimento, a exaustão de nutrientes no meio, a inibição do crescimento por contato, o excesso de metabólitos secretados para o meio e a acidificação do meio (PERES; CURI, 2005).

Caso a quantidade de células na garrafa de cultivo celular exceda o limite de confluência adequado, não haverá o crescimento normal da suspensão celular ou da monocamada (células aderentes), e, conseqüentemente, as células entrarão em seguida na fase de morte. Por isso, é necessário realizar o procedimento de repique para, periodicamente, retirar células do cultivo e mantê-las com o crescimento ideal, ou seja, em fase log (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Neste capítulo serão descritos os procedimentos básicos para a propagação das culturas celulares, incluindo protocolos ilustrativos e detalhados dos processos envolvendo a troca de meio, repiques e passagens celulares.

## **2 TROCA DE MEIO, REPIQUE E PASSAGENS**

Para a manutenção de cultura de linhagens celulares é necessário observar a densidade de células (confluência para células aderentes) e seu aspecto geral (FRESHNEY, 2011). Normalmente, esse procedimento é realizado em microscópio óptico invertido com contraste de fase. É essencial familiarizar-se com o ciclo celular de crescimento de cada linhagem celular, uma vez que, diferentes tipos celulares e também células em diferentes fases se comportam de maneira distinta em relação à proliferação, atividade enzimática, glicólise, respiração, etc.

As culturas de células aderentes devem ser mantidas com confluência entre 80-90% (subconfluência), enquanto que as células em suspensão são utilizadas em concentrações entre  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células/mL, isso porque, antes de atingirem esse limiar, as células devem ser repicadas (PURDIE; POURREYRON; SOUTH, 2011; HELGALSON; MILLER, 2004; PERES; CURI, 2005).

Caso a densidade ou confluência celular não estejam próximas a seu limiar é necessário apenas que o meio de cultura seja substituído periodicamente (a cada 48 horas aproximadamente) (PERES; CURI, 2005). Alguns fatores podem indicar a necessidade de troca do meio de cultura, como: queda no pH (para  $\leq 6,5$ ), alta concentração de células, tipo celular e modificação da morfologia celular (FRESHNEY, 2011). Nesse contexto, a troca do meio irá garantir o ambiente adequado para o crescimento e função celulares.

### **2.1 Troca de meio de cultura**

A troca de meio de cultura é um procedimento simples e rápido que envolve as seguintes etapas para células aderentes:

- Remover o meio de cultura da garrafa de cultivo celular.

- Lavar a garrafa de cultura com Tampão Fosfato Salino (PBS).
- Ressuspender as células em novo meio de cultura.

No caso das células em suspensão, esse procedimento pode ser realizado apenas por adição de novo meio de cultura e diluição do número de células, sem remover o meio de cultura já existente.

## 2.2 Repique

O procedimento de repique inicia-se com a observação do aspecto e confluência das células em microscópio. Existem procedimentos diferentes para o início do repique em linhagens aderentes e em suspensão, os quais estão descritos abaixo.

### **a) Para linhagens em suspensão:**

- As linhagens em suspensão devem ser cuidadosamente homogeneizadas com a pipeta, para desagrupar as células em grumos, e seu conteúdo deve ser transferido para um tubo cônico de polipropileno estéril tipo Falcon.

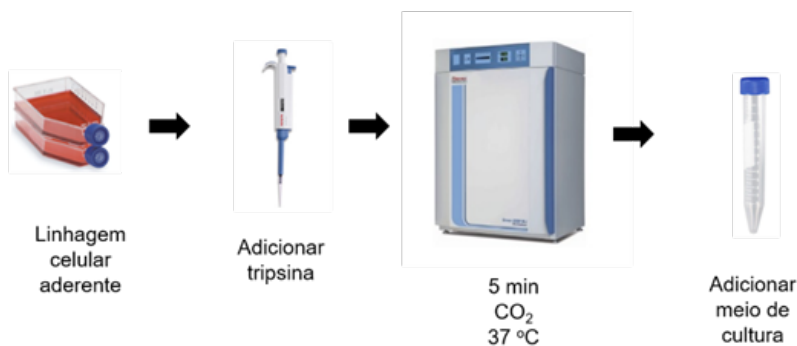
### **b) Para linhagens aderentes:**

- Remover o meio de cultura da garrafa de cultivo celular.
- Lavar a cultura com PBS para remover os resíduos de meio de cultura.
- Incubar a cultura com tripsina em incubadora de CO<sub>2</sub> por 5-10 minutos (esse tempo varia de acordo com o tipo celular), a qual age digerindo e clivando as proteínas de adesão das células. Geralmente, a tripsina utilizada é a tripsina-EDTA (0,25%), pois o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) adicionado à solução (protocolo descrito no apêndice) atua como um agente quelante que neutraliza os íons cálcio e magnésio, que estariam favorecendo as ligações

peptídicas nas quais a tripsina atua (PERES; CURI, 2005). Sendo assim, a remoção desses íons aumenta a atividade enzimática da tripsina. O volume de tripsina-EDTA (0,25%) varia de acordo com o tamanho do frasco de cultura, porém, geralmente, é utilizado 2 mL da solução para garrafas grandes (250 mL, 75 cm<sup>2</sup>) e 1 mL para garrafas pequenas (50 mL, 25 cm<sup>2</sup>).

- Inativar a tripsina com meio de cultura específico para o tipo celular, adicionado de 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina, e transferir para um tubo cônico de polipropileno estéril tipo Falcon. As proteínas do soro irão bloquear a ação da tripsina, uma vez que a tripsina cliva as proteínas do soro, que competem com as moléculas de adesão das células (Figura 1).

**Figura 1** – Tripsinização de células aderentes em cultura celular



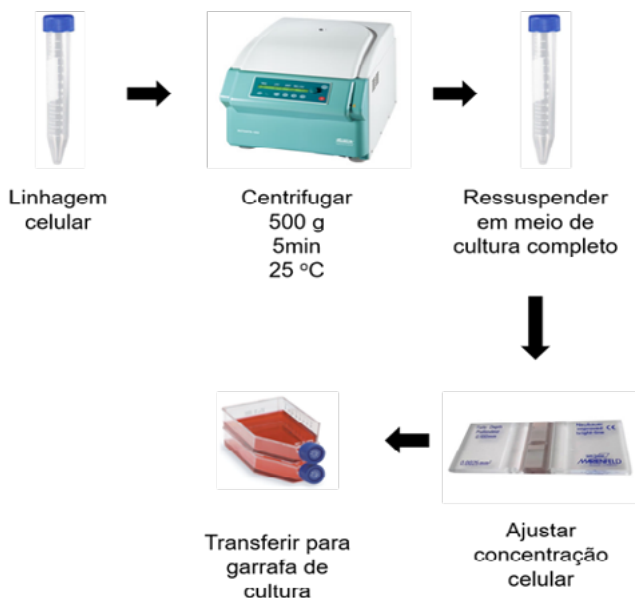
**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Legenda:** Para tripsinização, as células aderentes devem ser incubadas com a tripsina por 5-10 minutos em incubadora de CO<sub>2</sub> (37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>). Em seguida, meio de cultura completo deve ser adicionado à garrafa de cultivo para bloquear a ação da tripsina.

As etapas seguintes são comuns para células aderentes e em suspensão, após as etapas descritas anteriormente (Figura 2):

- Centrifugar a 500 x g por 5 minutos a 25 °C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em meio de cultura suplementado (10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina).
- Realizar coloração com azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer (ver Capítulo 8).
- Ajustar a concentração celular de acordo com a linhagem utilizada.
- Transferir as células para garrafa de cultivo.

**Figura 2** – Metodologia para repique de células



**Fonte:** Acervo particular do autor

**Legenda:** Para o processo de repique da cultura, as células devem ser centrifugadas, em seguida, ressuspensas em meio de cultura completo. Posteriormente, deve ser realizado o ajuste da concentração celular e transferência para garrafa de cultura.

## 2.3 Passagens celulares

O número de passagens é um fator importante que deve ser monitorado durante a manutenção de linhagens celulares, pois influencia na proliferação celular e também na expressão de proteínas. Isso ocorre devido a alterações na expressão gênica ou silenciamento de genes que podem acontecer espontaneamente, modificando o fenótipo celular (ALVES; GUIMARÃES, 2010; PERES; CURI, 2005).

Portanto, é importante controlar o número de passagens de uma linhagem celular visando a reprodutibilidade dos resultados experimentais. O número de passagens que garante a manutenção das características fenotípicas da célula pode variar de acordo com a linhagem e não existe um limite definido, mas, em geral, varia entre 70 e 80 passagens (PERES; CURI, 2005).

## REFERÊNCIAS

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. "Cultivo celular". Rio de Janeiro: Fiocruz, **EPSJV**, 2010.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 6. ed. NJ, USA: John Wiley and Sons, 2011.

HELGASON, C. D.; MILLER, C. Basic Cell Culture Protocols.[s.l.] **Humana Press**, 2004.

PERES, C. M.; CURI, R.; PAFFARO, A. M. D. A.; MARTINS, A. K. A.; PIMENTA, A.; GONÇALVES, C. R; MARTINS, E. F. **Como cultivar células**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.

PURDIE, K. J.; POURREYRON, C.; SOUTH, A. P. Cancer Cell Culture. Totowa, NJ: **Humana Press**, v. 731, 2011.

# CAPÍTULO 8

## CONTAGEM DE CÉLULAS

*Rawny Galdino Gouveia*

*Marianna Vieira Sobral*

### 1 INTRODUÇÃO

A contagem de células é um procedimento básico e fundamental para a pesquisa científica que utiliza células em cultura para o desenvolvimento de protocolos experimentais. Esse procedimento permite estimar a taxa de crescimento das células na garrafa de cultivo, avaliar a viabilidade celular e as condições de crescimento, além de direcionar o planejamento dos possíveis experimentos nos quais as células serão utilizadas (MACLEOD, 2004).

Neste capítulo, serão descritos em detalhes os procedimentos necessários para a contagem manual de células por hemocítômetro, um dos métodos mais utilizados pelos laboratórios de cultivo celular, por possuir melhor custo benefício.

### 2 CONTAGEM DE CÉLULAS: DA TEORIA À BANCADA

Uma das formas mais comuns de estimar o número de células é por meio da contagem ao microscópio utilizando uma câmara de Neubauer, que também é conhecida como hemocítômetro ou câmara de contagem (LUCARINI; SILVA; BIANCHI, 2004; ALVES et al., 2010).

Existem procedimentos diferentes para a etapa inicial da contagem de células em linhagens aderentes e em suspensão, os quais estão descritos a seguir.



### **a) Preparação das células em suspensão:**

- As linhagens em suspensão devem ser cuidadosamente homogeneizadas com a pipeta, para desagrupar as células em grumos, e seu conteúdo deve ser transferido para um tubo cônico de polipropileno estéril tipo Falcon.

### **b) Preparação das células aderentes:**

- Remover o meio de cultura da garrafa de cultivo celular.
- Incubar a cultura com tripsina em incubadora de CO<sub>2</sub> [O volume da tripsina-EDTA (0,25%) varia de acordo com o tamanho do frasco de cultura, porém, geralmente, é utilizado 2 mL da solução para garrafas grandes (250 mL, 75 cm<sup>2</sup>) e 1 mL para garrafas pequenas (50 mL, 25 cm<sup>2</sup>)], por 5-10 minutos. Esse tempo varia de acordo com o tipo celular, e deve ser monitorado observando-se ao microscópio se as células foram removidas da superfície da garrafa.
- Inativar a tripsina com meio de cultura específico para o tipo celular, adicionado de 10% de soro bovino fetal (SBF), e transferir para um tubo cônico de polipropileno estéril tipo Falcon. O processo de tripsinização está descrito no capítulo 7.

Após essas etapas, os passos seguintes são comuns tanto para células aderentes quanto em suspensão.

- Centrifugar a 500 x *g* por 5 minutos a 25 °C.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em meio de cultura completo (10% de SBF + 1% de penicilina/estreptomicina. O volume dependerá do tamanho do precipitado formado, geralmente 1 mL de meio para um precipitado celular pequeno). Nesse processo é necessária uma boa homogeneização para que as células fiquem completamente desagrupadas.

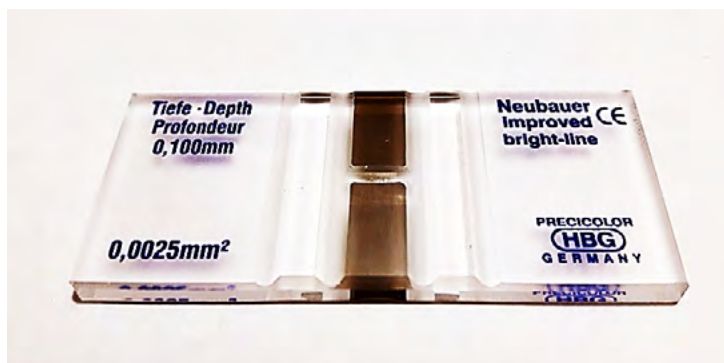
- Realizar coloração com azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer.

## 2.1 A câmara de Neubauer e a contagem de células

A câmara de Neubauer é uma lâmina de microscopia diferente de uma lâmina normal, uma vez que existe uma câmara gravada no vidro, sendo que cada lâmina contém geralmente duas câmaras iguais.

Ao lado da câmara existem dois suportes onde a lamínula é posicionada, permitindo um espaço entre a lamínula e a câmara de 0,1 mm (Figura 1). Assim, quando se coloca uma solução de células na câmara e a lamínula é posicionada, é conhecida a profundidade da solução, sendo possível determinar o número de células contido na solução (LUCARINI; SILVA; BIANCHI, 2004).

**Figura 1** – A Câmara de Neubauer

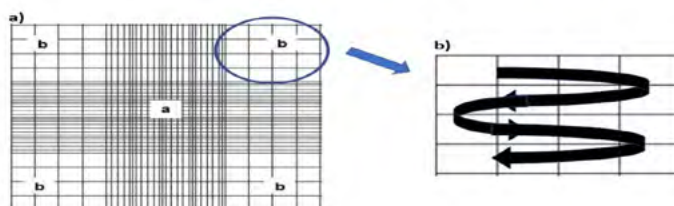


**Fonte:** SPLAB (2020)

**Legenda:** Foto da câmara de Neubauer espelhada tradicional, onde é possível observar as câmaras gravadas no vidro (as duas partes mais escuras no centro).

Por sua vez, a grade de contagem que compõe a câmara de Neubauer possui 3 mm<sup>2</sup> e a área de contagem de cada câmara é composta de nove quadrantes grandes, sendo cada um de área igual a 1 mm<sup>2</sup> (ALVES et al., 2010). Cada quadrante é subdividido em quadrados de 0,25 mm<sup>2</sup> de área, e o central é subdividido até ter área igual a 0,0025 mm<sup>2</sup> (Figura 2).

**Figura 2** – Quadrantes da câmara de Neubauer



**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Legenda:** A) Quadrantes da câmara de Neubauer. Em "a" observa-se o quadrante central e em "b" observam-se os quadrantes externos. B) Sentido utilizado no quadrante para a realização da contagem de células.

Para a realização da contagem de células na câmara de Neubauer deve-se realizar um procedimento de coloração das células com o azul de Tripán. Este corante é utilizado para diferenciar células viáveis, nas quais o corante não consegue permanecer no citoplasma, das células danificadas que são coradas em azul (ver Capítulo 10).

Os seguintes passos devem ser seguidos para a contagem de células em câmara de Neubauer (Figura 3):

- Volumes iguais da suspensão celular e da solução do azul de Tripán à 0,4% (10 a 20 µL) devem ser homogêneos em um microtubo cônico de polipropileno estéril tipo Eppendorf.

- Deixar a mistura descansar de 2 a 3 minutos em temperatura ambiente (períodos mais longos levarão à morte celular e a contagem de viabilidade reduzida).
- Antes de usar, lavar o hemocitômetro com etanol a 70% (v/v) e deixar secar.
- Lavar uma lamínula com etanol a 70% (v/v), deixar secar e aplicá-la em cima da câmara de contagem do hemocitômetro.
- Aplicar 10 µL da mistura de azul de Tripán/células na borda da câmara entre a lamínula e a ranhura em forma de V na câmara. Permita que a suspensão de células seja puxada para a câmara por ação capilar.
- Colocar o hemocitômetro na mesa/platina de um microscópio óptico para a contagem das células (objetiva 10×).
- Contar o número de células viáveis (não coradas com o azul de Tripán) e não viáveis (coradas em azul) nos quatro quadrantes externos (A, B, C e D) da câmara de Neubauer. Fazer a média dos quatro quadrantes e multiplicar por 10<sup>4</sup> (fator da câmara) para obter o número de células por mL na amostra aplicada ao hemocitômetro.
- Multiplicar por dois (2) para levar em consideração a diluição 1:1 da suspensão de células no azul de Tripán e multiplicar por qualquer diluição na preparação original da amostra da suspensão celular, conforme a seguinte equação:

$$\frac{(A + B + C + D)}{4} \times 10^4 \times FD = n^\circ \text{ células/mL}$$

Onde: A, B, C e D representam os quadrantes externos da câmara de Neubauer e FD o fator de diluição utilizado.

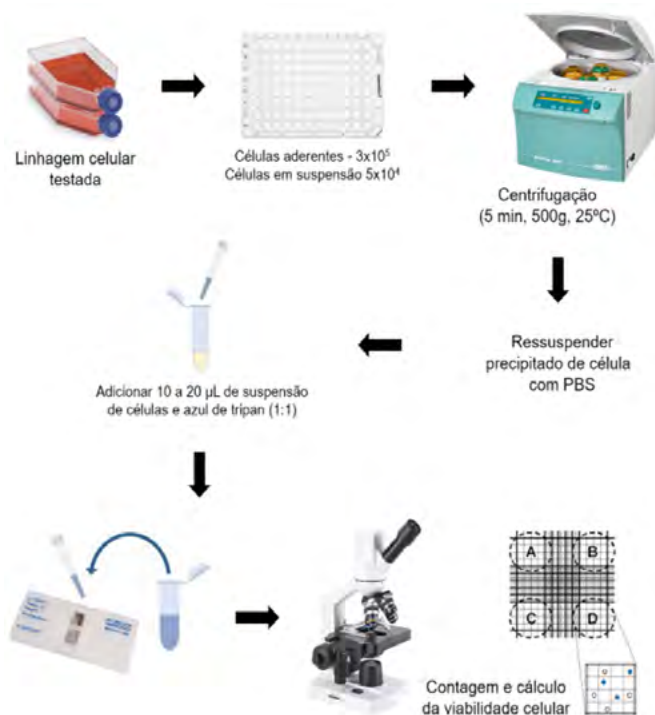
Obs.: Em uma diluição 1:1 o FD = 2.

Para o cálculo do número de células viáveis, deve entrar na fórmula a contagem média dos quatro quadrantes apenas das células

não coradas em azul. Portanto, a porcentagem de células não coradas representa a porcentagem de células viáveis na suspensão, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

**Figura 3** – Contagem de células em câmara de Neubauer utilizando o ensaio de exclusão do azul de Tripán



**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Legenda:** Após centrifugação, uma mistura do azul de tripan e das células ressuspensas (1:1) deve ser aplicada ao hemocitômetro para contagem em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico.

## REFERÊNCIAS

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. "Cultivo celular". Rio de Janeiro: Fiocruz, **EPSJV**, 2010.

LUCARINI, A. C.; SILVA, L. A.; BIANCHI, R. A. C. Um sistema para contagem semiautomática de microorganismos. **Revista pesquisa e tecnologia FEI**, São Bernardo do Campo, v. 26, p. 36-40, 2004.

MACLEOD, K. G. Essential Techniques of Cancer Cell Culture. In: LANGDON, Simon, P. Methods in Molecular Medicine, vol. 88: **Cancer Cell Culture: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. p. 17-29

# CAPÍTULO 9

## CONTAMINANTES DA CULTURA CELULAR

*Ana Luiza de Oliveira Lopes*

*Juan Carlos Ramos Gonçalves*

*Marianna Vieira Sobral*

### 1 INTRODUÇÃO

O trabalho com cultivos celulares exige uma série de cuidados que objetivam reduzir os riscos de contaminação. As técnicas assépticas reduzem a probabilidade de infecção por microrganismos, desse modo, é importante que sejam mantidas a todo momento (ALVES; GUIMARÃES, 2010; FREEDMAN et al., 2015). Ainda, é necessário que a contaminação seja mantida a um mínimo possível para evitar interferência nos resultados dos experimentos que comprometam sua reprodutibilidade e confiabilidade.

Conhecer os principais agentes contaminantes presentes no ambiente em que um laboratório de cultivo de células está inserido é tão importante quanto o domínio das técnicas de cultivo celular. Portanto, neste capítulo, serão abordados os tipos mais comuns de contaminações que ocorrem em uma cultura de células.

### 2 AGENTES CONTAMINANTES

Diferentes tipos de contaminações podem acontecer durante o cultivo celular, a saber, contaminação biológica, química ou cruzada. Os principais contaminantes biológicos das culturas celulares são vírus, fungos e bactérias (incluindo micoplasmas,

acholeplasmas e micobactérias) (MAHMOOD; ALI, 2017). Os contaminantes químicos preocupantes incluem as endotoxinas das bactérias gram negativas, detergentes residuais, radicais livres, metais pesados e fixadores residuais (BAUST et al., 2017). Por fim, a contaminação cruzada indica contaminação entre diferentes linhagens celulares (ROUTRAY et al., 2016).

## **2.1 Fontes de contaminantes no laboratório**

Na maioria dos laboratórios de pesquisa as principais fontes de microrganismos são aquelas que acompanham os usuários do laboratório. Aerossóis gerados ao falar, espirrar e tossir podem carregar quantidades significativas de contaminantes (BATES; WERNERSPACH, 2018).

As roupas também podem abrigar e transportar uma variedade de microrganismos, por isso, é crucial a existência de uma antessala de paramentação, além do uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) (PHILIPPEOS et al., 2012).

Meios de cultura, soro bovino fetal, reagentes e materiais plásticos podem ser fontes importantes de contaminantes, por isso, é fundamental usar materiais estéreis e sempre realizar assepsia dos frascos com álcool 70% (v/v) antes da introdução na cabine de segurança biológica (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Além dessas precauções, a sala de cultura deve ser limpa com frequência para reduzir as partículas de poeira no chão e nos equipamentos, incluindo banho-maria, geladeira e microscópio. Estufas mal limpas e mantidas de forma incorreta podem servir como "um lar" para diversos contaminantes (BATES; WERNERSPACH, 2018; PHILIPPEOS et al., 2012).



## **3 CONTAMINANTES BIOLÓGICOS**

A contaminação biológica constitui um dos problemas mais comuns em laboratórios. Nesse caso, a contaminação é introduzida por meio de técnicas assépticas impróprias, materiais esterilizados inadequadamente (pipetas, frascos de cultura, tubos, etc.) ou reagentes contaminados (tampões, meios de cultura, tripsina, etc.) (GIBCO, 2016; LANGDON, 2012). Esses contaminantes também são chamados de agentes adventícios, visto que eles não surgem da própria cultura celular e sim de fontes extrínsecas à cultura (BAUST et al., 2017).

Alguns desses agentes adventícios podem ser patogênicos para seres humanos, e sua presença deve ser eliminada de linhagens celulares em cultivo, assim como de qualquer cultura utilizada na fabricação de produtos biológicos ou destinados ao uso humano ou animal. O termo agente adventício não se aplica a vírus endógenos ou latentes que são intrínsecos à linhagem celular (sendo codificados no genoma celular e expressos em condições normais ou sob certas condições de indução pela célula) (LANGDON, 2012).

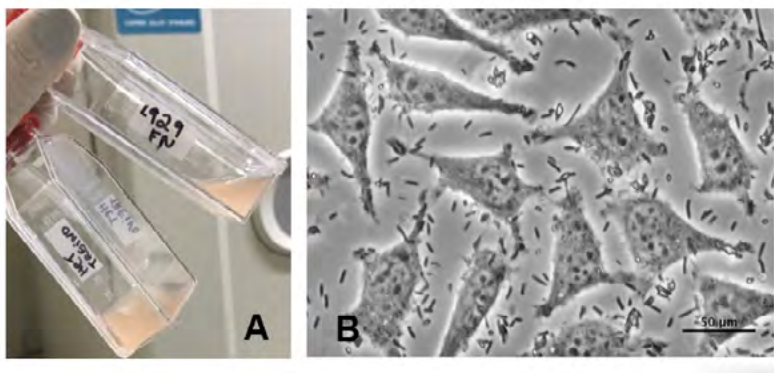
### **3.1 Contaminação por bactérias**

As bactérias são organismos procariontes com tamanho variando entre 2-5  $\mu\text{m}$ , apresentam alta capacidade de proliferação e, na maioria das vezes, conseguem crescer em quaisquer condições. Elas estão presentes no ar, nas superfícies, no trato digestivo humano e em outros locais (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

A contaminação bacteriana em uma cultura de células eucariontes é facilmente detectada macro e microscopicamente, uma vez que se observa turvação do meio de cultura, acompanhada de mudança no pH, tornando o meio ácido, além de morte das células devido à competição por nutrientes do meio de cultura. Além disso,

bactérias em cultura assemelham-se a “grânulos de areia” sobre as linhagens de células eucariontes (Figura 1).

**Figura 1** – Culturas de células eucariontes contaminadas por bactérias



**Fonte:** A) Acervo particular do autor.  
B) Adaptado de Handling Solutions (2020)

**Legenda:** A) Turvação do meio de cultivo, sinal macroscópico característico de contaminação bacteriana. B) Presença de bastonetes nas células aderentes, observadas por microscopia de contraste de fase, 400x.

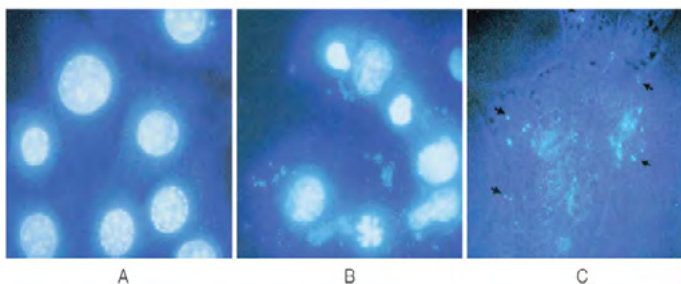
O contaminante biológico mais grave e disseminado de todos é o micoplasma, uma bactéria que não apresenta parede celular e se caracteriza como o menor organismo de replicação celular que infecta as células com maior frequência (PHILIPPEOS et al., 2012). Os aerossóis contaminados por micoplasmas juntamente com técnicas assépticas inadequadas constituem a maior fonte de disseminação de bactérias em culturas celulares (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Por causa do seu tamanho (menos de 1 µm), os micoplasmas são difíceis de serem detectados, ademais, a depender da célula infectada e da espécie de micoplasma, a infecção pode passar

macroscopicamente despercebida já que não ocorre turvação do meio (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Com o passar do tempo, as células que apresentam infecção crônica por micoplasma começam a manifestar taxas reduzidas de proliferação celular, alterações metabólicas e aglutinação em culturas de suspensão. A única maneira garantida de detectar a contaminação por essa bactéria é utilizando periodicamente técnicas de fluorescência (Figura 2), hibridação de DNA, PCR (reação em cadeia da polimerase) ou técnicas microbiológicas (CREE et al., 2011; GIBCO, 2016).

**Figura 2** – Fotomicrografia de micoplasmas em células aderentes



**Fonte:** Gibco (2016)

**Legenda:** A) Fotomicrografia de cultura de micoplasma.  
B) e C) Células infectadas por micoplasmas.  
As células foram tratadas com o kit MycoFluor™ da Invitrogen™.  
As imagens foram obtidas utilizando uma excitação  
de 365 nm com lente objetiva Plan Neofluar™.

### 3.2 Contaminação por fungos

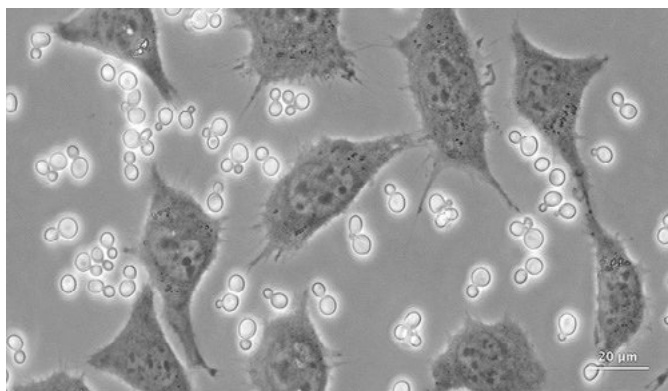
Fungos são microrganismos unicelulares (formas leveduriformes) ou multicelulares (formas filamentosas) que pertencem ao reino Fungi. Seu tamanho varia de 2-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro

até vários centímetros de comprimento. Quando ocorre contaminação por fungos em cultivo de células eucariontes é possível observar macroscopicamente a turvação do meio de cultivo, assim como a formação de colônias isoladas na placa (HANDLING SOLUTIONS, 2020). Do ponto de vista microscópico é possível identificar as estruturas fúngicas que parasitam à garrafa (GIBCO, 2016).

### **a. Contaminação por fungos leveduriformes**

Leveduras são estruturas unicelulares, com tamanho que varia de alguns micrômetros até 40µm. Microscopicamente, as leveduras apresentam-se como partículas ovoides ou esféricas individuais que podem brotar de partículas menores (Figura 3).

**Figura 3** – Presença de leveduras em cultura de células aderentes (cinza escuro)



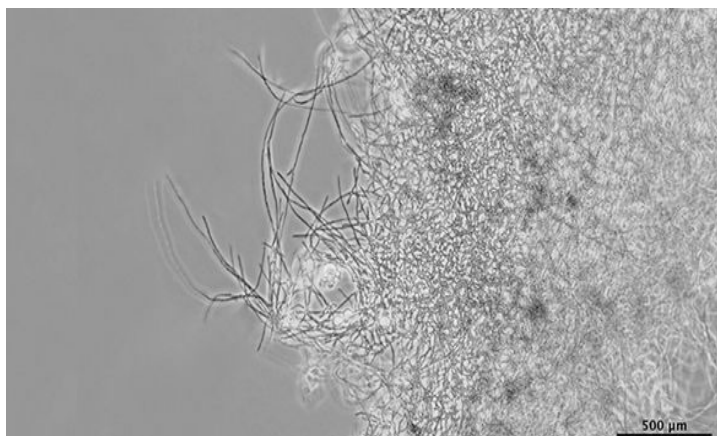
**Fonte:** Handling Solutions, 2020.

**Legenda:** Imagem em microscópio de contraste de fases (400x) mostrando células aderentes contaminadas com leveduras (pequenas estruturas em cinza claro)

## b. Contaminação por fungos filamentosos

Os fungos filamentosos crescem como filamentos multicelulares formando as hifas, cujo tamanho pode variar de alguns micrômetros até centímetros. Uma rede conectada de hifas contém núcleos geneticamente idênticos, e são denominadas como colônia ou micélio (GIBCO, 2016). Geralmente são os esporos fúngicos que contaminam uma garrafa de cultura e utilizam-na para se desenvolver (Figura 4).

**Figura 4** – Presença de fungos filamentosos em garrafa de cultivo celular (50x)



**Fonte:** Handling Solutions, 2020.

## 3.3 Contaminação por vírus

Assim como os micoplasmas, os vírus não fornecem pistas visuais para a sua presença; eles não alteram o pH do meio de cultura nem promovem a turbidez do meio. Como os vírus usam seu hospedeiro para replicação, os medicamentos usados para bloquear os vírus

também podem ser tóxicos para as células que estão sendo cultivadas (BATES; WERNERSPACH, 2018).

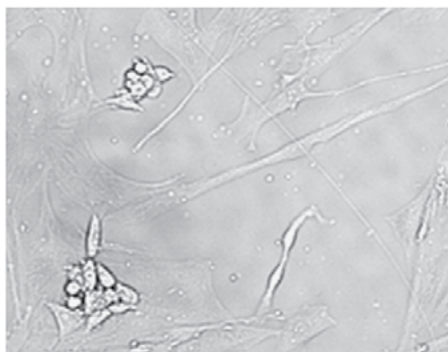
Esses agentes são extremamente difíceis de serem detectados em culturas celulares, e o uso de células infectadas com vírus representa um risco sério à saúde para todos que frequentam o laboratório. Infecções virais podem ser detectadas por microscopia eletrônica, ensaios de ELISA ou pela técnica de PCR (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Nesse contexto, a presença de retrovírus (especialmente HIV ou HTLV) nas linhagens celulares humanas primárias deve ser sempre considerada ao manusear tais culturas celulares (BAUST et al., 2017).

## **4 CONTAMINAÇÃO CRUZADA**

Em todas as ocasiões, uma célula que é mantida em laboratório enfrenta o risco de contaminação com outra célula, particularmente as linhagens celulares de crescimento rápido e contínuo. O primeiro caso de contaminação cruzada na cultura de células foi relatado na década de 1950 e, desde então, a contaminação cruzada continua sendo um problema preocupante nos laboratórios de cultura de células, pois a contaminação de uma linhagem celular com outra linhagem celular não é facilmente detectável como a contaminação bacteriana ou fúngica (ROUTRAY et al., 2016).

O Comitê Internacional de Autenticação de Linhagem Celular (ICLAC) relata que cerca de 500 linhagens celulares eucarióticas documentadas estão contaminadas com células de outras linhagens (ICLAC, 2019). Um caso comum de contaminação cruzada, e de fácil identificação, é a presença de células HeLa (linhagem de adenocarcinoma de colo do útero humano), que forma colônias de células arredondadas, em fibroblastos humanos normais, com a forma orbital (Figura 5).

**Figura 5** – Fibroblastos humanos normais contaminados com a linhagem HeLa (setas). Microscopia óptica (400x)



**Fonte:** Adaptado de Routray et al. (2016)

## 5 CONTAMINANTES QUÍMICOS

Os contaminantes químicos são derivados do manuseio ou uso inadequado de reagentes e da cultura de células. Deve-se utilizar substâncias próprias para cultura de células e com alto grau de pureza (GIBCO, 2016).

A água é componente essencial na preparação de meios e soluções, porém, constitui uma fonte potencial de impurezas que podem afetar o crescimento de culturas *in vitro*. Para evitar contaminação por compostos orgânicos voláteis, que permanecem após a destilação e que inibem o crescimento das culturas, deve-se utilizar água ultrapura, que consiste num sistema de purificação por filtração com carvão ativado, colunas de troca iônica e filtros de acetato de celulose (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Por fim, é importante ressaltar que a ocorrência de contaminação química é atenuada por meio da adesão às melhores práticas de manuseio de todos os materiais em uso, assim como por evitar o uso de solventes voláteis nas incubadoras celulares.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. "Cultivo celular". Rio de Janeiro: Fiocruz, **EPSJV**, 2010.
- BATES M. K.; WERNERSPACH D. Entendendo as causas e gerenciando riscos. **Datamed**, 2018. Disponível em: <<https://datamedweb.com.br/2018/08/contaminacao-em-cultura-de-celulas/>> Acesso em: 09 abr. 2020.
- BAUST, J. M.; BUEHRING, G. C.; CAMPBELL, L.; ELMORE, E.; HARBELL, J. W.; NIMS, R. W.; SIMIONE, F. Best practices in cell culture: an overview. In: **Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 53, n. 8, p. 669-672, 2017.
- CREE, I. A. et al. (Ed.). **Cancer cell culture: methods and protocols**. Humana Press, 2011.
- FREEDMAN, L. P.; GIBSON, M. C.; ETHIER, S. P.; SOULE, H. R.; NEVE, R. M.; REID, Y. A. Reproducibility: Changing the policies and culture of cell line authentication. **Nature Methods**, v. 12, n. 6, p. 493-497, 2015.
- GIBCO. Cell Culture Basics. **Thermo Fisher Scientific**, p. 20-27, 2016. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-culture/cell-culture-learning-center/gibco-education.html?CID=fl-gibcoeducation>>
- HANDLING SOLUTIONS. **Contamination in Cell Culture**, 2020. Disponível em: <<https://handling-solutions.eppendorf.com/cell-handling/contamination/introduction/>> Acesso em: 13 abr. de 2020.
- ICLAC. Register of Misidentified Cell Lines, 2019. Disponível em: <<https://iclac.org/databases/cross-contaminations/>> Acesso em: 1 abr. 2020.
- LANGDON, S. P. Cancer cell culture. **Humana**, 2010.
- MAHMOOD, A.; ALI, S. Microbial and viral contamination of animal and stem cell cultures: common contaminants, detection and elimination. **J. Stem Cell Res. Ther.**, v. 2, p. 00078, 2017.



PHILIPPEOS, C.; HUGHES, R. D.; DHAWAN, A.; MITRY, R. R.  
Introduction to cell culture. In: Human Cell Culture Protocols.  
**Humana Press**, p. 1-13, 2012.

ROUTRAY, I.; MAHMOOD, A.; NGWA, N. E.; TASLEEM, M., SAHIN, K.;  
KUCUK, O. Cell Line Cross-Contamination and Accidental Co-  
Culture. **J StemCell Res Ther**, v. 1, n. 5, p. 00031, 2016.

# CAPÍTULO 10

## INTRODUÇÃO À AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

*Camyla Caroliny Neves de Andrade*

*Marianna Vieira Sobral*

### 1 INTRODUÇÃO

A determinação da viabilidade celular é uma etapa imprescindível na avaliação e triagem de novos compostos candidatos a fármacos, bem como na seleção de suspensões celulares contendo um maior número de células viáveis antes da realização de ensaios específicos. Além disso, o domínio destas técnicas básicas é fundamental para as mais diversas áreas, desde a pesquisa básica até as áreas aplicadas em saúde, biotecnologia, indústria, etc.

Neste capítulo serão descritas as etapas comuns de preparação da cultura celular e tratamento com as amostras teste, de forma prática e detalhada, visando a realização de testes de viabilidade celular como o ensaio de exclusão do azul de Tripán. Nos próximos capítulos, serão apresentados os testes mais comumente utilizados em laboratórios de cultivo celular.

### 2 PREPARO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS

As etapas iniciais para a determinação da viabilidade celular por meio de ensaios específicos consistem na preparação prévia da cultura celular e exposição das células às amostras teste, que serão investigadas quanto às suas atividades farmacológicas. A seguir, estão

descritas as etapas comuns (Figura 1) de preparação da cultura e tratamento com as amostras teste.

- Centrifugar as células em cultura (aderentes ou em suspensão), seguindo-se o protocolo descrito no Capítulo 7.
- Proceder com o protocolo de contagem de células do Capítulo 8. As células devem encontrar-se com alta viabilidade (>90%).
- Ajustar a concentração e incubar as células em microplacas de cultura de 96 poços (plaqueamento celular), 100 µL da suspensão celular por poço. Sugerimos  $3 \times 10^5$  células/mL para linhagens aderentes e  $5 \times 10^5$  células/mL para linhagens em suspensão.
- Para células aderentes, incubar a placa em estufa (5%CO<sub>2</sub>, 37 °C) por 24h, período necessário para a aderência das células às placas. Esta etapa não é necessária para células em suspensão.
- Adicionar 100 µL da amostra teste, previamente dissolvida em DMSO (ou em solvente similar indicado), nas diferentes concentrações a serem testadas.
- Incubar as placas em estufa (5%CO<sub>2</sub>, 37 °C) em diferentes intervalos de tempos (como, por exemplo, de 24 à 72h) para observar a cinética de citotoxicidade da amostra teste.
- Após o período de incubação, proceder com a execução das metodologias específicas para avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular.

**Figura 1** – Metodologia para plaqueamento celular e tratamento com as amostras teste



**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Legenda:** Após o preparo da suspensão celular, deve-se adicionar 100 µL desta suspensão na placa e incubá-la por 24 h (para células aderentes). Em seguida, adicionar 100 µL da amostra teste dissolvida em DMSO nas diferentes concentrações e incubar a placa por um período de 24, 48 e/ou 72 h. Decorrido o tempo de incubação, proceder com os ensaios de citotoxicidade.

### 3 ENSAIO DE EXCLUSÃO DO AZUL DE TRIPAN

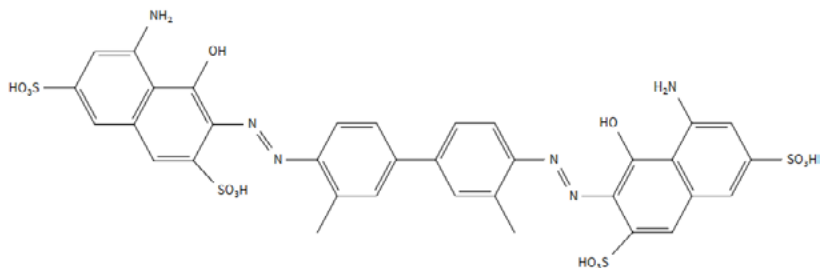
A avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de exclusão do azul de Tripán foi a primeira metodologia proposta na literatura e

vem sendo realizada há mais de um século. É considerada uma técnica padrão para a avaliação da viabilidade celular, e continua sendo a mais utilizada (PICCININI et al., 2017; CHAN; RICE; QIU, 2020).

### 3.1 Fundamentação do ensaio

O azul de Tripán ( $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4$ ) (Figura 2) é um corante diazoderivado da toluidina e solúvel em água. Foi descoberto em 1904 por Paul Ehrlich para o tratamento da tripanossomíase africana e utilizado pela primeira vez na oftalmologia para fins de diagnóstico para marcar a córnea e a conjuntiva (PICCININI et al., 2017; BROCKMANN et al., 2018).

**Figura 2** – Estrutura química do azul de Tripán

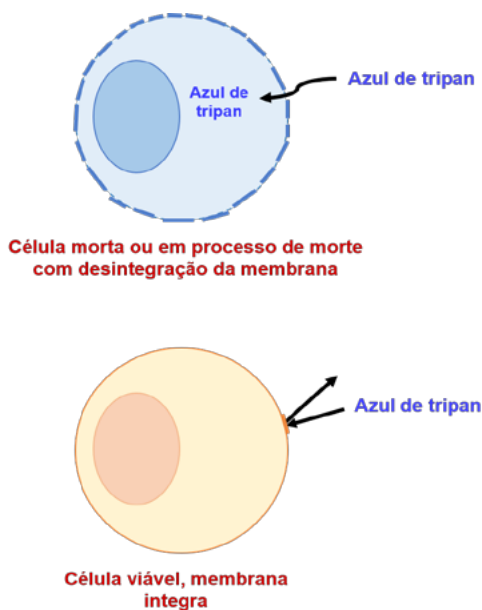


**Fonte:** Acervo particular do autor.

Quando a membrana celular está íntegra, esta não permite a entrada de diversos compostos químicos, inclusive o azul de Tripán. Assim, o azul de Tripán é uma molécula que não consegue atravessar a membrana semipermeável das células vivas. Portanto, ele só é absorvido por células com a membrana comprometida, ou seja, por células mortas ou que estejam em processo de morte celular, cuja membrana começou a se romper (CROWLEY et al., 2016a; PICCININI et

al., 2017). Sendo assim, esse corante é frequentemente utilizado para marcar e distinguir células vivas de células mortas (SINUMOL et al., 2019) (Figura 3).

**Figura 3** – Fundamento do ensaio de exclusão do azul de Tripán



**Fonte:** Autoria própria.

Nesse ensaio, a viabilidade celular é avaliada indiretamente por meio da observação da integridade da membrana celular. Após penetrar na célula, o azul de Tripán liga-se a proteínas intracelulares e, em campo claro, as células mortas encontram-se coradas em azul (células em apoptose ou em necrose não são diferenciadas), já as células vivas permanecem com a coloração inalterada (PICCININI et al., 2017). Com isso, torna-se possível avaliar a viabilidade celular por

meio da quantificação das células mortas ou em processo de morte celular coradas com o azul de Tripán.

As células coradas com o azul de Tripán podem ser observadas com o auxílio de microscópio óptico de campo claro de baixa resolução, tornando este ensaio acessível à maioria dos laboratórios de pesquisa (CROWLEY et al., 2016). O procedimento de coloração das células acontece rapidamente, podendo ser analisadas em pouquíssimo tempo, o que facilita sua realização em combinação com outros ensaios de morte celular (CROWLEY et al., 2016).

O ensaio de exclusão do azul de Tripán apresenta algumas desvantagens, tais como: janela de tempo de contagem limitada, pois o azul de Tripán exerce um efeito tóxico nas células após um curto período de exposição, o que limita o tempo de contagem após a coloração; e contagens imprecisas, pois existe uma grande quantidade de falsos positivos, ou seja, "células mortas" que sofreram algum dano a sua membrana, e falsos negativos, células que iniciaram a apoptose, porém ainda possuem a membrana íntegra (PICCININI et al., 2017; CHAN; RICE; QIU, 2020). Ainda assim, o azul de Tripán continua sendo o corante mais utilizado para avaliar a viabilidade celular, pois, apesar de apresentar desvantagens, possui inúmeras vantagens, como por exemplo, a rapidez na execução do procedimento experimental, a facilidade na utilização, o baixo custo e a análise pode ser realizada com microscópio óptico de campo claro, acessível a praticamente todos os laboratórios de pesquisa, além de poder ser contabilizado também por meio de contadores automáticos. Sendo assim, esse método é considerado um método de referência para a avaliação da viabilidade celular (CHAN; RICE; QIU, 2020).

O produto azul de Tripán possui risco biológico associado como agente carcinogênico, portanto, deve ser manipulado seguindo-se os procedimentos de biossegurança descritos no Capítulo 4.

## **3.2 Procedimento experimental**

### **3.2.1 Material**

A seguir, estão elencados os materiais necessários para a realização do ensaio de exclusão do azul de Tripán:

- Capela de segurança biológica ou fluxo laminar;
- Cultura celular;
- Solução tampão fosfato (PBS) estéril;
- Solução de azul de Tripán a 0,4% (armazenado em frasco âmbar);
- Câmara de Neubauer (hemocitômetro) e lamínula;
- Centrífuga refrigerada;
- Tubo cônico de polipropileno estéril tipo Falcon;
- Microtubo cônico de polipropileno estéril tipo Eppendorf;
- Microscópio óptico;
- Kit de micropipetas e ponteiras de volumes variados;
- Etanol a 70% (v/v);
- Contador digital ou analógico (opcional).

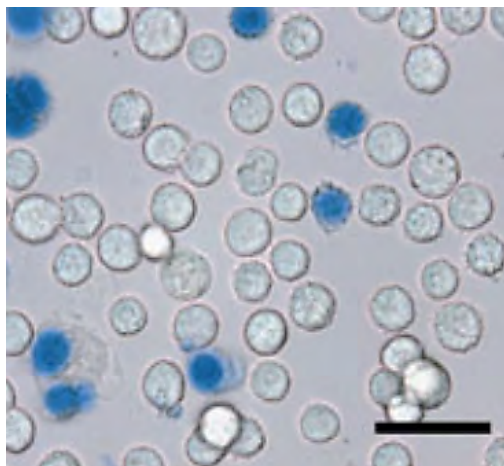
### **3.2.2 Protocolo**

O protocolo experimental detalhado para a contagem de células em câmara de Neubauer utilizando como método o ensaio de exclusão do azul de Tripán encontra-se descrito no Capítulo 8.

Resumidamente, o corante azul de Tripán e a suspensão celular devem ser homogeneizados na proporção 1:1, e a mistura aplicada ao hemocitômetro para a contagem de células utilizando microscópio óptico. As células coradas em azul são consideradas não viáveis (Figura 4).



**Figura 4** – Células HepG2 viáveis (setas pretas) e não viáveis (setas brancas) marcadas com o azul de Tripán. Escala: 50 µm



**Fonte:** Adaptado de Liu et al. (2012)

## REFERÊNCIAS

BROCKMANN, T.; BLANCHARD, V.; HERETSCH, P.; BROCKMANN, C.; BERTELMANN, E. Photochemical degradation of trypan blue. **PloS one**, v. 13, n. 4, 2018.

CHAN, L. L. Y.; RICE, W. L.; QIU, J., Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. **PloS one**, v. 15, n. 1, p.e0227950, 2020.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, pp.pdb-prot087155, 2016.

LIU, J. J.; GAO, D.; MAO, S.; LIN, J-M. A microfluidic photolithography for controlled encapsulation of single cells inside hydrogel

microstructures. **Science China Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 494-501, 2012.

PICCININI, F.; TESEI, A.; ARIENTI, C.; BEVILACQUA, A. Cell counting and viability assessment of 2D and 3D cell cultures: expected reliability of the trypan blue assay. **Biological procedures online**, v. 19, n.1, p. 8, 2017.

SINUMOL, S.; JAYALAKSHMY, P. S.; SREEDHARAN, T.; UNNI, M. O.; NARAYAN, S.; SUJATHA, N. Effect of intraoperative trypan blue on lens epithelial cells-Histomorphological analysis. **Saudi Journal of Ophthalmology**, v. 33, n. 1, p. 18-23, 2019.

# CAPÍTULO 11

## ENSAIO DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

*Camyla Caroliny Neves de Andrade*

*Marianna Vieira Sobral*

### 1 INTRODUÇÃO

O vermelho neutro (VN) é um dos corantes mais empregados em pesquisas e exames médicos. Ele pode ser utilizado como corante histológico, indicador de pH e, principalmente, por ser considerado também um corante vital, é bastante utilizado na avaliação da viabilidade celular em ensaios de citotoxicidade de diversos compostos químicos (PATHROSE et al., 2017; NABLO et al., 2019; VAHEDI et al., 2018).

Neste capítulo serão introduzidos os princípios fundamentais do uso do VN em cultivo de células, apresentando-se um protocolo detalhado de sua utilização visando ensaios de avaliação de viabilidade celular.

### 2 FUNDAMENTAÇÃO DO ENSAIO

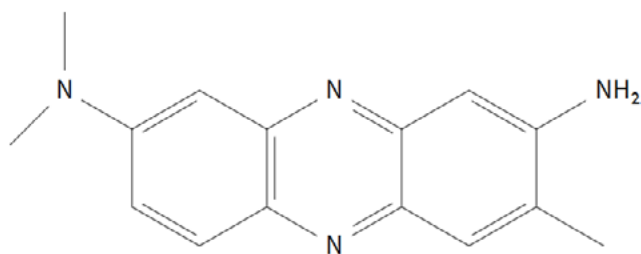
O ensaio de captação do vermelho neutro é baseado na capacidade das células viáveis de incorporar e reter o VN no interior dos lisossomos (MELLO et al., 2020).

O vermelho neutro (VN) (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) é um corante catiônico eurodina, solúvel em água, pertencente à classe de corantes com estrutura fundamental fenazina.

Estruturalmente, possui fórmula  $C_{15}H_{17}ClN_4$ , sendo formado por dois anéis fenil, que se encontram ligados por um composto heterocíclico contendo dois átomos de nitrogênio (fenazina) (Figura 1) (ATES et al., 2017; GEORGE et al., 2014; VAHEDI et al., 2018).

Sua captação depende da capacidade da célula de manter gradientes de pH, por meio da produção de ATP. Em pH fisiológico, o VN é fracamente catiônico e entra nas células por meio de difusão passiva não iônica.

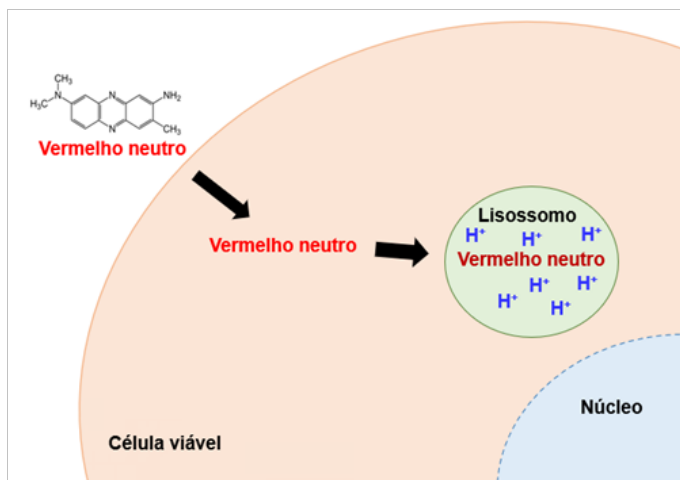
**Figura 1** – Estrutura química do vermelho neutro



**Fonte:** Acervo particular do autor.

Ao penetrar na célula, o VN irá se acumular nos lisossomos, onde se liga por meio de ligações eletrostáticas hidrofóbicas à matriz aniônica e/ou a grupos fosfato. No interior dos lisossomos há um gradiente de prótons que mantém um pH menor que o do citoplasma (pH lisossômico < pH citoplasmático), com isso, o VN recebe um próton e fica carregado e retido no interior dos lisossomos (Figura 2) (ATES et al., 2017; BULGARELLI et al., 2018; REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; LEMOS, 2018; SOUZA et al., 2011; BAYDYUK et al., 2019).

**Figura 2** – Fundamento do ensaio de marcação com vermelho neutro.



**Fonte:** Autoria própria.

**Legenda:** O vermelho neutro, um corante fracamente catiônico, penetra nas células por difusão passiva não iônica e se acumula no interior dos lisossomos, ligando-se por meio de ligações eletrostáticas hidrofóbicas à matriz aniônica e/ou aos grupos fosfato. Devido ao gradiente de prótons que mantém o pH lisossômico inferior ao pH citoplasmático, o VN recebe um próton, ficando carregado e retido no interior dos lisossomos.

Compostos citotóxicos podem causar alterações na superfície das células ou na membrana lisossomal, resultando em uma diminuição na captação e retenção do vermelho neutro, devido à redução da eficiência da bomba de prótons (H<sup>+</sup>-ATPase), com conseqüente diminuição do gradiente de prótons e elevação do pH no interior dos lisossomos, resultando na desprotonação do VN, o qual não é mais retido nos lisossomos. Dessa forma, o ensaio de captação de VN possibilita a avaliação da integridade da membrana lisossomal e sua capacidade para reter o corante, permitindo a diferenciação entre células viáveis

e células mortas (ATES et al., 2017; REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; SOUZA et al., 2011).

A viabilidade celular é quantificada por espectrofotometria após a extração do corante acumulado no interior das células utilizando uma solução alcoólica acidificada, sendo a quantidade de corante incorporado diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (PEREZ et al., 2017; NABLO et al., 2019). Portanto, a redução na viabilidade celular é expressa como uma redução da captação do VN após a exposição à amostra em teste, representando assim uma estimativa sensível da integridade celular e da inibição do crescimento (MANNERSTRÖM et al., 2017). Adicionalmente, pesquisas mostram que algumas células, a exemplo das células cancerígenas, possuem uma absorção diferenciada de vermelho neutro em comparação com células normais, o que possibilita uma distinção entre elas (VAHEDI et al., 2018).

O VN é capaz de induzir toxicidade aguda quando ingerido, podendo causar irritações na pele e mucosas (olho, pele, trato respiratório). Além disso, possui risco biológico associado como agente carcinogênico, portanto, deve ser manipulado seguindo-se os procedimentos de biossegurança descritos no Capítulo 4.

## **3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.1 Material**

A seguir, estão elencados os materiais necessários para realização do ensaio do VN:

- Capela de segurança biológica ou fluxo laminar;
- Cultura celular;

- Vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metil-fenazina);
- Solução tampão fosfato (PBS) estéril;
- Meio de cultura adequado e suplementado;
- Ácido acético glacial;
- Etanol absoluto (96%);
- Microscópio óptico invertido;
- Incubadora de CO<sub>2</sub>;
- Centrífuga refrigerada;
- Espectrofotômetro com comprimentos de onda de excitação e emissão de 530 e 645 nm, respectivamente;
- Agitador para microplacas;
- Microplaca de 96 poços;
- Tubos cônicos de polipropileno estéril tipo Falcon (50 mL);
- Pipeta multicanal (preferencialmente) e ponteiras.

## 3.2 Protocolo

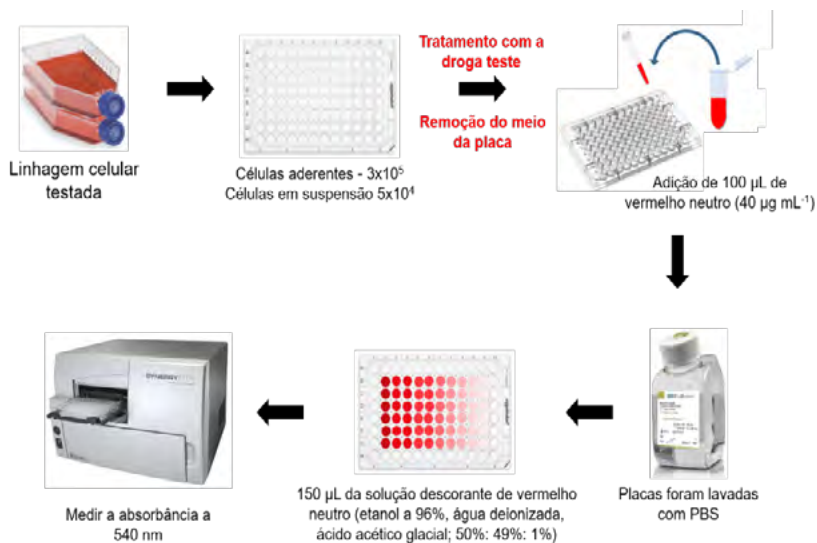
A seguir, detalha-se o protocolo para a realização do ensaio do VN (Figura 3):

- Preparar uma solução de trabalho de vermelho neutro de 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (protocolo descrito no apêndice) e incubar *overnight*, a 37°C.
- Proceder com o protocolo de "preparo e tratamento das células para ensaios de citotoxicidade", conforme descrito no Capítulo 10.
- Aspirar ou descartar o meio das células.

- Centrifugar o meio vermelho neutro por 10 min a  $600 \times g$  para remover quaisquer cristais de corante precipitados.
- *Obs.: Colocar o meio vermelho neutro em um reservatório. Fazer isso com cuidado para não ressuspender os cristais na parte inferior do tubo.*
- Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de meio vermelho neutro à cada poço da placa. Incubar a placa por 2 horas nas condições de cultura apropriadas.
- *Obs.: Avaliar as placas em um microscópio invertido para verificar a possível precipitação do vermelho neutro.*
- Retirar o meio vermelho neutro. Lavar as células com 150  $\mu\text{L}$  de PBS, em seguida, descartar. Adicionar 150  $\mu\text{L}$  da solução descorante de vermelho neutro (protocolo descrito no apêndice) em cada poço.
- Agitar a placa rapidamente em um agitador de microplacas por pelo menos 10 minutos ou até que o vermelho neutro seja extraído das células e forme uma solução homogênea.
- Realizar a leitura da absorbância a 540 nm em um espectrofotômetro de leitor de microplacas, utilizando espaços em branco que não contenham células como referência.



**Figura 3** – Metodologia para o ensaio de captação do vermelho neutro



**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Legenda:** Após incubação com a amostra teste deve-se remover o meio presente na placa. Em seguida, adicionar 100  $\mu\text{L}$  da solução de vermelho neutro ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubar a placa por 2 horas. Decorrido o tempo de incubação, a placa deve ser lavada com 150  $\mu\text{L}$  de PBS, seguida da adição de 150  $\mu\text{L}$  da solução descorante de vermelho neutro. Posteriormente, deve-se manter a placa em agitação por 10 minutos e realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro.

## REFERÊNCIAS

ATES, G.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V.; RODRIGUES, R. M. Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. In **Cell Viability Assays**. p. 19-26. Humana Press, New York, NY. 2017.

BAYDYUK, M.; CHA, D. S.; HU, J.; YAMAZAKI, R.; MILLER, E. M.; SMITH, V. N.; KELLY, K. A.; HUANG, J. K. Tracking the evolution of CNS remyelinating lesion in mice with neutral red dye. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 28, p. 14290-14299, 2019.

BULGARELLI, D. L.; TING, A. Y.; GORDON, B. J.; DE SÁ ROSA, A. C. J.; ZELINSKI, M. B. Development of macaque secondary follicles exposed to neutral red prior to 3-dimensional culture. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 35, n. 1, p. 71-79, 2018.

GEORGE, M.; MUNEEERA, C.I.; SINGH, C. P.; BINDRA, K. S.; OAK, S. M.; Z-SCAN STUDIES; FRENETTE, M.; HATAMIMOSLEHABADI, M.; BELLINGER-BUCKLEY, S.; LAOUI, S.; BAG, S.; DANTISTE, O.; ROCHFORD, J.; YELLESWARAPU, C. Nonlinear optical properties of multipyrrole dyes. **Chem. Phys. Lett.** v. 608, p. 303-307, 2014.

LE MOS, R. C., 2018. **Testes de citotoxicidade *in vitro* no controle da qualidade de biomateriais empregados em luvas utilizadas por profissionais da FIOCRUZ**. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

MANNERSTRÖM, M.; TOIMELA, T.; SARKANEN, J. R.; HEINONEN, T. Human BJ fibroblasts is an alternative to mouse BALB/c 3T3 cells in *in vitro* neutral red uptake assay. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 121, p. 109-115, 2017.

MELLO, D. F.; TREVISAN, R.; RIVERA, N.; GEITNER, N. K.; DI GIULIO, R. T.; WIESNER, M. R.; HSU-KIM, H.; MEYER, J. N. Caveats to the use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. **Chemico-biological interactions**, v. 315, p. 108868, 2020.

NABLO, B. J.; AHN, J.; BHADRIRAJU, K.; LEE, J. M.; REYES-HERNANDEZ, D. R. Live quantification of cell viability via neutral red uptake using lens-free imaging. **National Institute of Standards and Technology**. 2019.

PATHROSE, B. P.; PRAKASH, A.; NAMPOORI, V. P. N.; RADHAKRISHNAN, P.; MUJEEB, A. Investigations of the of Ag nanosol impact on the nonlinear optical properties of neutral red dye. **Optical and Quantum Electronics**, v. 50, n. 2, p. 26, 2018.

PEREZ, M. G.; FOURCADE, L.; MATEESCU, M. A.; PAQUIN, J. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. **Analytical biochemistry**, v. 535, p. 43-46, 2017.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Natureprotocols**, v. 3, n. 7, p. 1125, 2008.

SOUZA, I. C.; SANTANA JR, P. J.; ALMADA, B. V.; ZARONI, L. P.; MATSUMOTO, S. T. Avaliação da resposta celular do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na Baía do Espírito Santo por meio do tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN). **Natureza on Line**, v. 9, p. 54-58, 2011.

VAHEDI, K.; SHARIFI, S.; ALIZADEH, K.; MARTI, O.; AMIRKHANI, M. Enhancement of nonlinear optical response and fluorescence spectra of cationic neutral red by anionic surfactant. **Optical and Quantum Electronics**, v. 50, n. 1, p. 24, 2018.

# CAPÍTULO 12

## ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT

*Rafael Carlos Ferreira*

*Marianna Vieira Sobral*

### 1 INTRODUÇÃO

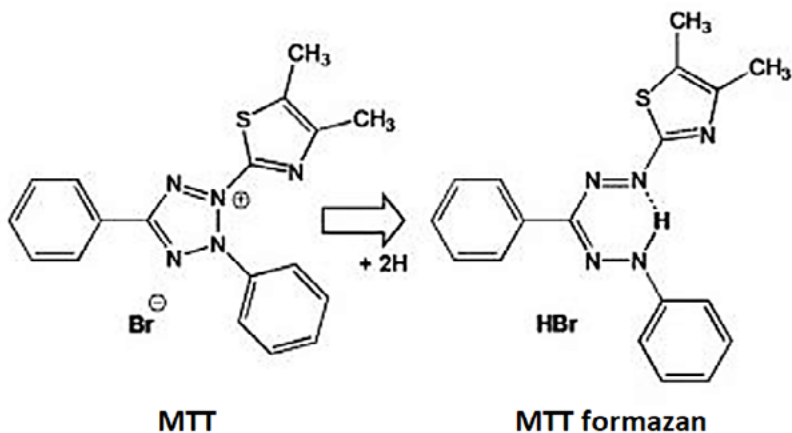
O ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) é um método colorimétrico que mede indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular. Este teste foi inicialmente proposto por Mosmann (1983), sendo considerado até os dias de hoje como um dos ensaios mais utilizados no mundo inteiro, devido ao seu bom custo benefício.

Neste capítulo serão apresentados os fundamentos do teste do MTT bem como a descrição detalhada de um protocolo de execução desta técnica.

### 2 FUNDAMENTAÇÃO DO ENSAIO

O MTT é um sal de cor amarela e solúvel em água (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Por ter uma carga residual positiva, essa molécula é permeável às membranas celulares (STEPANENKO; DMITRENK, 2015) e, no interior das células viáveis, o MTT é reduzido aos cristais de formazan, de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel tetrazólio mediada por enzimas, tais como as desidrogenases mitocondriais (Figura 1).

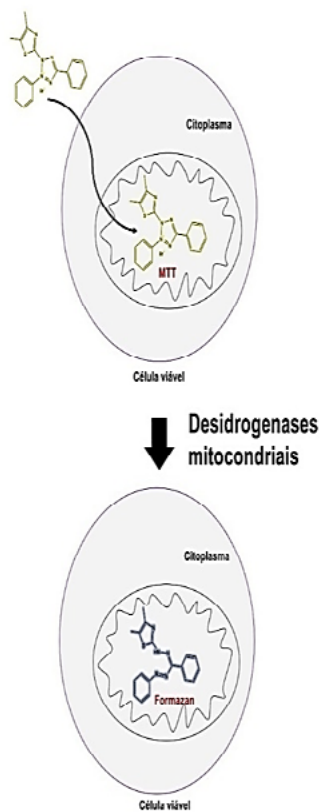
**Figura 1** – Reação de redução do MTT.  
A linha pontilhada na estrutura do MTT formazan indica o local de clivagem no anel tetrazólio



**Fonte:** Mittal et al. (2017)

Uma vez solubilizado, o produto formado (formazan) pode ser quantificado por espectrofotômetro e sua intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; SURIN et al., 2017; PASCUA-MAESTRO et al., 2018). A figura 2 demonstra a fundamentação do ensaio do MTT em nível celular.

**Figura 2** – Fundamento do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT)



**Fonte:** Autoria própria.

**Legenda:** O MTT é um sal de cor amarela permeável às membranas celulares. A ação enzimática de oxidoredutases, como as desidrogenases mitocondriais, em células metabolicamente ativas, reduz o MTT aos cristais de formazan, de cor púrpura.

Nesse ensaio são utilizadas células em fase logarítmica de crescimento que podem ser incubadas com a amostra teste por um período de 24 – 72 h, a 37°C em uma atmosfera umidificada com CO<sub>2</sub> a 5%. Ao final do período de incubação, a solução de MTT é adicionada a cada poço, e a placa é incubada por um período de 3-4 h, para redução do MTT ao formazan (MOSMANN, 1983; ALLEY et al., 1988; PIETERS et al., 1990; HAYON et al., 2003; KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018; BARROS et al., 2020; TOKAY et al., 2020).

O formazan deve ser solubilizado para a leitura da absorbância. Para isso, diversos agentes podem ser usados, tais como o etanol, o lauril sulfato de sódio (SDS) e o dimetilsulfóxido (DMSO) (TADA et al., 1986; BAHUGUNA et al., 2017). A quantificação do formazan pode ser determinada por leitura em comprimento de onda de 570 nm em leitor de placas de múltiplos poços (leitor de ELISA) (MARKS et al., 1992; KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018), estando linearmente associado à atividade enzimática e ao número de células viáveis. Assim, a alta intensidade da cor púrpura indica maior viabilidade celular, enquanto a diminuição da intensidade da cor púrpura significa o número reduzido de células viáveis e, portanto, a citotoxicidade da amostra teste (BAHUGUNA et al., 2017).

Os valores obtidos da leitura da densidade óptica das células submetidas ao tratamento com a amostra teste são comparados com os valores de densidade óptica das células controle não tratadas e os resultados são apresentados como porcentagem de sobrevivência celular (HAYON et al., 2003). Vale ressaltar que diferentes linhagens celulares apresentam diferentes taxas de produção de formazan (MARKS et al., 1992).

Esse teste é um dos mais utilizados para a avaliação da citotoxicidade de novos candidatos à fármacos antitumorais (ŚLIWKA et al., 2016; LIN et al., 2019; LI et al., 2020; ZHU et al., 2020), apresentando significativa sensibilidade (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006), rapidez (CIAPETTI et al., 1993), precisão e acessibilidade técnica, o

que proporciona um alto rendimento na avaliação da citotoxicidade de novas amostras (HAYON et al., 2003).

Contudo, algumas desvantagens têm sido observadas no uso desse ensaio. Por exemplo, pode haver uma diminuição na produção de formazan mesmo em células viáveis, após modificação da composição do meio de cultura, como por diminuição na concentração de D-glicose, NADH ou NADPH. Além disso, tem sido observado que células em estágios iniciais de apoptose com a atividade mitocondrial intacta reduzem o MTT ao formazan, o que pode interferir na legitimidade dos resultados (VISTICA et al., 1991; VAN DE LOOSDRECHT et al., 1995; HAYON et al., 2003).

## **3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.1 Material**

A seguir, estão elencados os materiais necessários para realização do ensaio do MTT:

- Microplaca de 96 poços;
- Micropipetas e ponteiras de diferentes volumes;
- Centrífuga refrigerada;
- Leitor de microplacas;
- Agitador de microplacas;
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Meio de cultivo celular;
- Solução de MTT (5 mg/mL em PBS);
- Solução SDS/HCL 0,01 N.

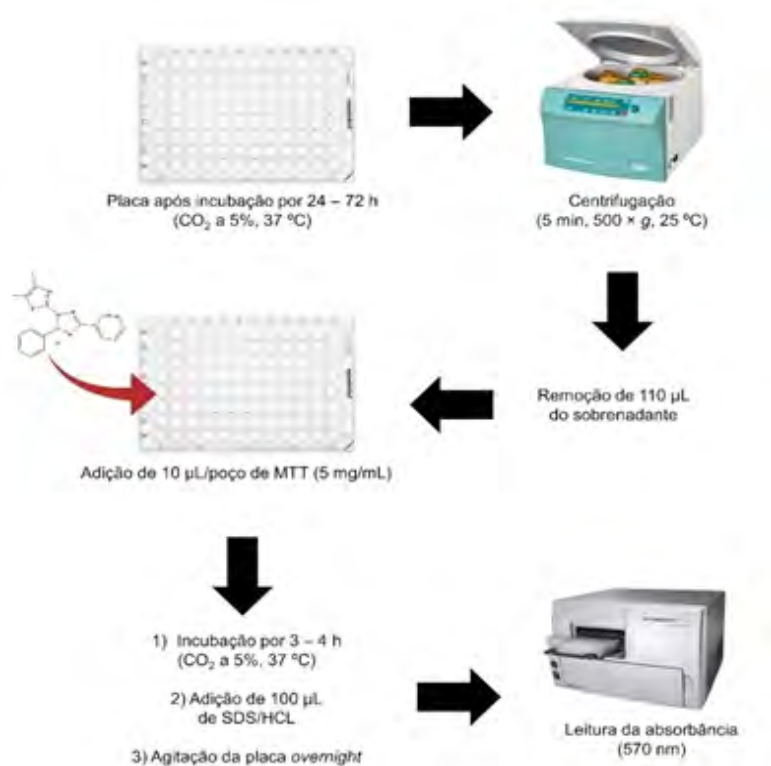


## 3.2 Protocolo

A seguir, detalha-se o protocolo para a realização do ensaio do MTT (Figura 3):

- Proceder com o protocolo de "preparo e tratamento das células para ensaios de citotoxicidade", conforme descrito no Capítulo 10. Decorrido o período de incubação com as amostras teste (24 – 72 h), centrifugar a placa (5 min,  $500 \times g$ , 25 °C).
- Remover 110  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e, ao abrigo de luz, adicionar 10  $\mu\text{L}$  da solução de MTT previamente preparada (5 mg/mL em PBS, protocolo descrito no apêndice).
- *Obs.: Proceder com cuidado para não ressuspender as células nesta etapa.*
- Incubar as placas em estufa (5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C) por 3-4h.
- Adicionar 100  $\mu\text{L}$ /poço da solução de SDS/HCl (protocolo descrito no apêndice).
- Ao abrigo de luz, agitar a placa *overnight*.
- Realizar leitura da absorbância a 570 nm em um espectrofotômetro de leitor de microplacas.

**Figura 3** – Metodologia para o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT)



**Fonte:** Acervo particular do autor

**Legenda:** Após incubação com a substância teste, a placa deve ser centrifugada e, em seguida, deve-se remover parte do sobrenadante. Posteriormente, o MTT deve ser adicionado e a placa incubada por 3-4 h. Decorrido o tempo de incubação, deve-se adicionar o SDS/HCL, seguido de agitação da placa *overnight*. Posteriormente, deve-se realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro

## REFERÊNCIAS

- ALLEY, M. C.; SCUDERIO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKY, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, 48, 589-601, 1988.
- BAHUGUNA, A.; KHAN, I.; BAJPAI, V.K.; KANG, S.C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, 2017.
- BARROS, A. B.; MOURA, A. F.; SILVA, D. A.; OLIVEIRA, T. M.; BARRETO, F. S.; RIBEIRO, W. L. C.; ALVES, A. P. N. N.; ARAÚJO, A. J.; MORAES FILHO, M. O.; ILES, B.; MEDEIROS, J. V. R.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; Evaluation of antitumor potential of cashew gum extracted from *Anacardium occidentale* Linn. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.
- CIAPETTI, G. CENNI, E.; PRATELLI, L.; PIZZOFERRATO, A. *In vitro* evaluation of cell/ biomaterial interaction by MTT assay. **Biomaterials**, v. 14, n. 5, p. 359-364, 1993.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.
- HAYON, T.; DVILANSKY, A.; SHPILBERG, O.; NATHAN, I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 44, n. 11, p. 1957-1962, 2003.
- KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot 095505, 2018.

LAKSHYA MITTAL, VISHAK RAMAN, IGNACIO G. CAMARILLO, RAJI SUNDARARAJAN. Electrical Pulse-Mediated Veliparib for Effective Treatment of Triple Negative Breast Cancer: An in vitro Model Study. **Int. J. Curr. Res. Aca. Rev.** 2017; 5(3): 53-64.

LI, Y.; LI, Y.; LI, D.; LI, K.; QUAN, Z.; WANG, Z.; SUN, Z. Repositioning of Hypoglycemic Drug Linagliptin for Cancer Treatment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 187, 2020.

LIN, X.; JIA, Y.; DONG, X.; SHEN, J.; JIN, Y.; LI, Y.; WANG, F.; ANENBERG, E.; ZHOU, J.; ZHU, J.; CHEN, X.; XIE, XIE, Y. Diplatin, a novel low toxicity and less resistance anti-lung cancer platinum complex activates cell death in tumors via a ROS/JNK/p53 dependent pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 982, 2019.

MARKS, D. C.; BELOV, L., DAVEY, M. W.; DAVEY, R. A.; KIDMAN, A. D. The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug resistant human leukemic cells. **Leukemia Research**, v. 16, n. 12, p. 1165-1173, 1992.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

PASCUA-MAESTRO, R.; CORRALIZA-GOMEZ, M., DIEZ-HERMANO, S., PEREZ-SEGURADO, C., GANFORNINA, M. D.; SANCHEZ, D. The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and *in vivo* validation in *Drosophila larvae*. **Acta histochemica**, v. 120, n. 3, p. 179-186, 2018.

PIETERS, R., LOONEN, A.H., HUISMANS, D.R., BROEKMAN, G.J., DRIVEN, M. W. J., HENENBROK, M. W., HAHLEN, K.; VEERMAN, A. J. P. *In vitro* drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. **Blood**, v. 76, n. 11, p. 2327-2336, 1990.

ŚLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; MILCZAREK, M.; MIELCZAREK, S.; LUBELSKA, K.; CIERPIAŁ, T.; ŁYŻWA, P.;

- KIEŁBASIŃSKI, P.; JAROMIN, A.; FLIS, A.; CHILMONCZYK, Z. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. **PloS One**, v. 11, n. 5, 2016.
- STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193-203, 2015.
- SURIN, A. M.; SHARIPOV, R. R.; KRASIL'NIKOVA, I. A.; BOYARKIN, D. P.; LISINA, O. Y.; GORBACHEVA, L. R.; AVETISYAN, A. V.; PINELIS, V. G. Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 6, p. 737-749, 2017.
- TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K. I.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, 93(2), 157-165, 1986.
- TOKAY, E.; GÜNGÖR, T.; HACIOĞLU, N.; ÖNDER, F. C.; GÜLHAN, Ü. G.; TOK, T. T.; ÇELIK, A.; AY, M.; KÖÇKAR, F. Prodrugs for nitroreductase-based cancer therapy-3: Antitumor activity of the novel dinitroaniline prodrugs/Ssap-NtrB enzyme suicide gene system: Synthesis, *in vitro* and *in silico* evaluation in prostate cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 187, p. 111937, 2020.
- VAN DE LOOSDRECHT, A., OSSENKOPPELE, G.J., BEELEN, R.H.J., DRAGER, A.M. AND LANGENHUIJSEN, M.M. Apoptosis in tumor necrosis factor-dependent, monocyte-mediated leukemic cell death: a functional, morphologic and flow cytometric analysis. **Experimental Hematology**, 21, p. 1628-1639, 1995.
- VISTICA, D.T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M.R. Tetrazolium-based assay for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **CancerResearch**, 51, p. 2515-2520, 1991.

# CAPÍTULO 13

## ENSAIO DA SULFORODAMINA B

*Sâmia Sousa Duarte*

*Rafael Carlos Ferreira*

*Juan Carlos Ramos Gonçalves*

### 1 INTRODUÇÃO

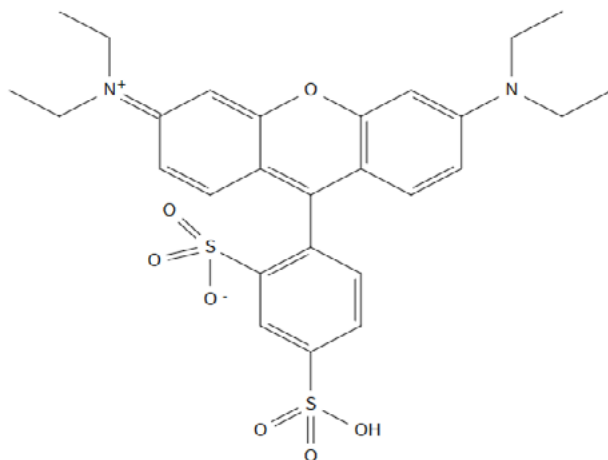
O ensaio da Sulforodamina B foi descrito em 1990 por Skehan e colaboradores (SKEHAN et al., 1990) e permanece como um dos principais métodos utilizados atualmente na triagem citotóxica *in vitro* de novos compostos (GUPTA et al., 2017; TENG et al., 2018; RAUT et al., 2018; SAADULLAH et al., 2020). Esta técnica possui bom custo benefício, podendo ser realizada pela maioria dos laboratórios de cultivo de células.

Neste capítulo, serão demonstrados os fundamentos do ensaio de avaliação da viabilidade celular pela Sulforodamina B (SRB), bem como um passo a passo ilustrativo a respeito desta técnica.

### 2 FUNDAMENTAÇÃO DO ENSAIO

O método colorimétrico descrito tem como princípio a utilização da Sulforodamina B ( $C_{27}H_{30}N_2O_7S_2$ ), também conhecida por vermelho Kiton 620. Trata-se de um corante aminoxanteno aniônico (Figura 1) de coloração avermelhada, que, sob condições ligeiramente ácidas, é capaz de se ligar estequiometricamente aos resíduos de aminoácidos básicos presentes nos constituintes proteicos das células (KUETE; KARAOSMANOGLU; SIVAS, 2017).

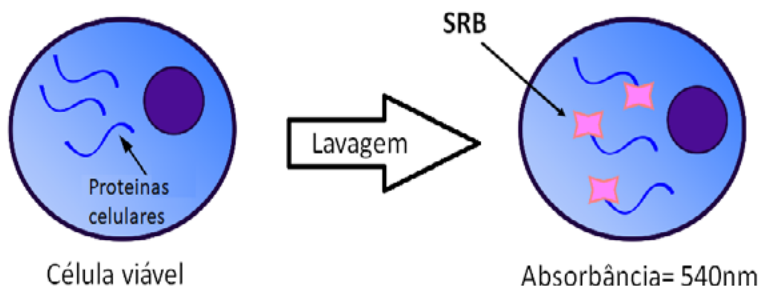
**Figura 1** – Estrutura química da Sulforodamina B



**Fonte:** Acervo particular do autor.

Após a ligação com a SRB, as proteínas celulares são extraídas em meio básico e a quantidade de corante ligado às células coradas pode ser estimada por espectrofotometria (Figura 2), sendo diretamente proporcional à massa celular e, portanto, ao número de células presentes na amostra avaliada (ORELLANA; KASINSKI, 2016). Assim, este ensaio mensura o conteúdo proteico celular, que é um parâmetro utilizado para inferir indiretamente a proliferação celular, bem como a citotoxicidade de um composto (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

**Figura 2** – Fundamento do ensaio da Sulforodamina B (SRB)



**Fonte:** Acervo particular do autor.

De maneira geral, o protocolo deste ensaio consiste na preparação e tratamento prévio das células com as amostras teste, seguido pela fixação celular com ácido tricloroacético, coloração com SRB e remoção do excesso de corante não ligado por meio de lavagens sucessivas das placas tratadas. Finalmente, o corante ligado é solubilizado em condições básicas e a absorbância da SRB é mensurada através de um espectrofotômetro (SKEHAN et al., 1990; VICHAI; KIRTIKARA, 2006; ORELLANA; KASINSKI, 2016).

A SRB é usualmente comparada à outras metodologias utilizadas para avaliação da citotoxicidade celular, tais com o MTT (RUBINSTEIN et al., 1990; KEEPERS et al., 1991; VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015), apresentando algumas vantagens em comparação a esta técnica, entre elas: o baixo custo (VOIGT, 2005); a possibilidade de triagem de drogas em larga escala (VOIGT, 2005); e a maior sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez (HOUGHTON et al., 2007).

Além dessas vantagens, a coloração com SRB raramente sofre interferência de fatores externos, fornecendo uma maior confiabilidade dos resultados obtidos. Em contrapartida, como mencionado no Capítulo 12, a conversão do MTT à formazan pode ser influenciada por outros



fatores que não sejam decorrentes da exposição celular às drogas, havendo a possibilidade da obtenção de resultados não fidedignos (VICHAI; KIRTIKARA, 2006; VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015).

Porém, algumas desvantagens também podem ser observadas com o uso do ensaio da SRB, incluindo: a menor sensibilidade em células não aderentes (VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015); a necessidade de sucessivas etapas de lavagens das células tratadas (VICHAI; KIRTIKARA, 2006); e o uso de ácido tricloroacético para fixação celular, que se não utilizado corretamente pode produzir artefatos nas amostras, alterando os dados (KUETE; KARAOSMANOGLU; SIVAS, 2017).

## **3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.1 Material**

A seguir, estão elencados os materiais necessários para a realização do ensaio da sulforodamina B:

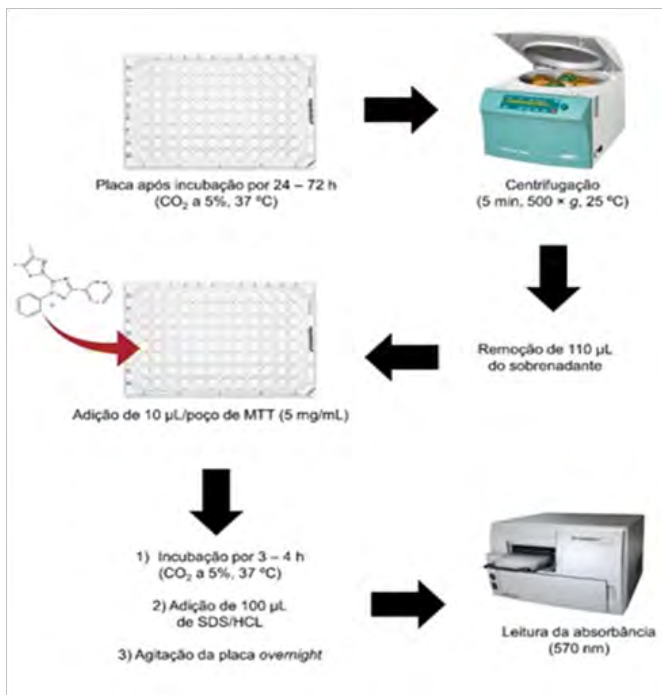
- Microplaca de 96 poços;
- Micropipetas e ponteiras de diferentes volumes;
- Leitor de microplacas;
- Ácido tricloroacético (TCA) a 20 %;
- Água destilada;
- Sulforodamina B (SRB) a 0,1%;
- Ácido acético a 1%;
- Tris Base a 10 mM.

## 3.2 Protocolo

A seguir, detalha-se o protocolo para a realização do ensaio da sulforodamina B (Figura 3):

- Plaquear as células e incubar por 24 h (conforme descrito no Capítulo 10).
- Fixar as células do grupo controle negativo com 100 µL de TCA a 20%, 4 °C, por 30 min.
- Nos demais poços, adicionar 200 µL da amostra teste ou droga padrão em diferentes concentrações, em triplicata.
- Incubar a placa em estufa (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) por 48 h.
- Fixar as células com TCA a 20%, 4 °C, por 30 min.
- Lavar os poços com água destilada e deixar a placa secar a temperatura ambiente.
- Adicionar 50 µL de SRB a 0,1% em ácido acético a 1%, por 30 min.
- Lavar os poços com ácido acético 1% (4 x).
- Deixar a placa secar a temperatura ambiente.
- Adicionar 100 µL de Tris Base (10 mM), para solubilização da SRB incorporada.
- Realizar leitura da absorbância a 540 nm em um espectrofotômetro de leitor de microplacas.

**Figura 3** – Metodologia para o ensaio da sulforodamina B (SRB)



**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Legenda:** Após incubação por 24 h, as células do grupo controle negativo devem ser fixadas com TCA a 20%. Em seguida, a amostra teste e a droga padrão devem ser adicionadas aos poços restantes, seguido da exposição por 48 h em incubadora de CO<sub>2</sub>. Decorrido este período, deve-se fixar as células tratadas (TCA a 20%), seguido da lavagem com água destilada e secagem a temperatura ambiente. Posteriormente, deve-se adicionar a SRB e, em seguida, incubar a placa por 30 minutos. Após esse período, os poços devem ser lavados com ácido acético, seguido da secagem a temperatura ambiente. Por fim, deve-se adicionar a cada poço o Tris Base e realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro (540 nm).

## REFERÊNCIAS

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377-387, 2007.

KEEPERS, Y. P.; PIZAO, P. E.; PETERS, G. J.; ARK-OTTE, J. V.; WINOGRAD, B.; PINEDO, H. M. Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTT) Assays for in vitro Chemosensitivity Testing. **European journal of cancer**, v. 27, n. 7, p. 897-900, 1991.

KUETE, V.; KARAOSMANOGLU, O.; SIVAS, H. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In: HALEY, Mica. **Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases**. Academic Press, Elsevier, London, United Kingdom, 2017, p. 271- 297.

ORELLANA, E. A.; KASINSKI, A. L. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. **Bio-protocol**, v. 6, n. 21, e1984, 2016.

RAUT, D. G.; PATIL, S. B.; KADU, V. D.; HUBLIKAR, M. G.; BHOSALE, R. B. Synthesis of Asymmetric 1-Thiocarbamoyl Pyrazoles as Potent Anti- Colon Cancer, Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 18, n. 15, p. 2117-2123, 2018.

RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; SIMON, R. M.; TOSINI, S.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; BOYD, M. R. Comparison of In Vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated With a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay Against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1113-1118, 1990.

SAADULLAH, M.; ASIF, M.; CH, B. A.; YASEEN, H. S.; UZAIR, M.; AFZAL, K. Isolation, Characterization and Preliminary Cytotoxic and Antifungal Evaluations of Novel Lancifoliate Isolated from Methanol

Extract of *Conocarpus Lancifolius*. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, 2020.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n.13; p. 1107-1112, 1990.

TENG, Y. N.; YINGZI, W.; HSU, P. L.; XIN, G.; ZHANG, Y.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; GOTO, M.; LEE, K. H. Mechanism of Action of Cytotoxic Compounds from the Seeds of *Euphorbia lathyris*. **Phytomedicine**, v. 41, p. 62-66, 2018.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC research notes**, v. 8, n. 47, p. 1-10, 2015.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1112-1116, 2006.

VOIGT, W. Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. In: Blumenthal, R. D. *Methods in Molecular Medicine*, vol. 110: Chemosensitivity: Vol. 1: In **Vitro Assays**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005, p. 39- 48.

# CAPÍTULO 14

## ENSAIO DO IODETO DE PROPÍDEO

*Sâmia Sousa Duarte*

*Juan Carlos Ramos Gonçalves*

### 1 INTRODUÇÃO

Há vários anos foi demonstrado que a perda da capacidade de transporte e da integridade física da membrana plasmática é uma das características típicas presentes em células mortas, o que permite diferenciá-las das células viáveis (DARZYNKIEWICZ; LI; GONG, 1994; HORAN; KAPPLER, 1977).

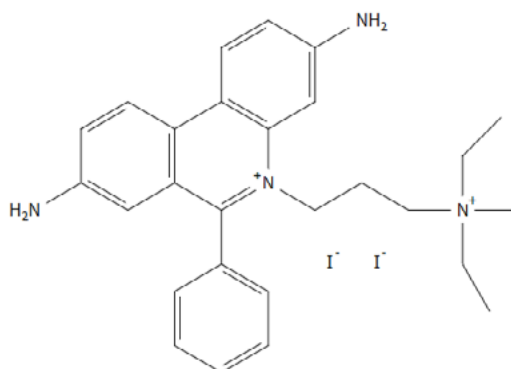
A marcação com iodeto de propídeo é utilizada principalmente com o objetivo de mensurar a viabilidade celular, relacionada com a diminuição da permeabilidade de membrana plasmática, possibilitando inferir indiretamente o potencial de drogas com atividade citotóxica (DENGLER et al., 1995; WROBEL et al., 1996) which can be performed in microtiter plates using a fluorescence plate scanner. The method is based on the binding of propidium iodide (PI).

Portanto, este capítulo tem como objetivo apresentar a técnica de incorporação do iodeto de propídeo, para fins de determinação da viabilidade celular. Para tanto, será apresentado um protocolo detalhando o passo a passo desta técnica de grande importância.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO DO ENSAIO

O iodeto de propídeo ( $C_{27}H_{34}I_2N_4$ ) (Figura 1) é uma molécula fluorescente capaz de se ligar aos ácidos nucleicos (principalmente DNA), intercalando-se entre pequenas sequências de bases nucleotídicas (MULLEN, 2004).

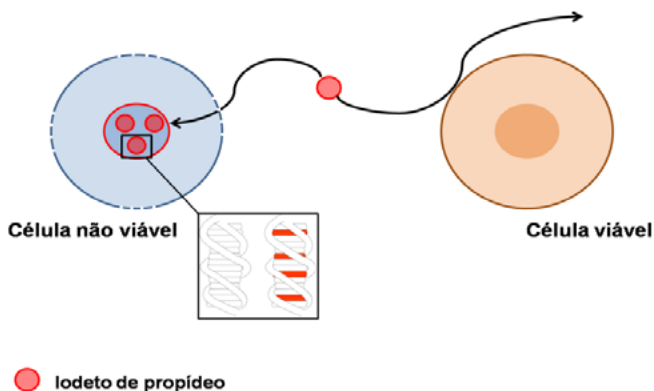
**Figura 1** – Estrutura química do iodeto de propídeo



**Fonte:** Acervo particular do autor.

De maneira similar à metodologia aplicada com o corante azul de Tripán (Capítulo 10), o ensaio de incorporação do iodeto de propídeo tem como fundamento a capacidade de células viáveis serem impermeáveis a esta sonda, que naturalmente é excluída quando em contato com a membrana plasmática íntegra. Em contrapartida, células não viáveis ou em processo de morte celular apresentam perda da integridade da membrana, permitindo a entrada do corante, que se intercala ao DNA marcando-o e emitindo alta fluorescência no espectro vermelho (617 nm) quando excitado por um laser (CROWLEY et al., 2016a; YANG; XIANG; XU, 2015). Portanto, com o uso desta molécula fluorescente é possível distinguir seletivamente as células mortas em amostras por meio do princípio de captação e exclusão do IP (Figura 2).

**Figura 2** – Fundamento do ensaio do iodeto de propídeo



**Fonte:** Autoria própria.

**Legenda:** O iodeto de propídeo é uma molécula fluorescente que permite avaliar a viabilidade a partir do princípio da integridade da membrana celular. Ele é excluído ao entrar em contato com a membrana plasmática intacta de células viáveis. Em contrapartida, transpõe a membrana rompida de células não viáveis ou em processo de morte celular, intercalando em seus ácidos nucleicos e emitindo alta fluorescência, o que permite distinguir seletivamente as células mortas.

A fluorescência emitida é avaliada por meio de diferentes técnicas, tais como microscopia de epifluorescência, microscopia confocal de varredura a laser, espectrofluorimetria ou por citometria de fluxo. Esta última técnica apresenta uma série de vantagens por fornecer uma análise precisa, automatizada, rápida e de um maior número de células por experimento. Dependendo do modelo do equipamento utilizado, os lasers e fotodetectores dos citômetros de fluxo permitem a leitura das células coradas com IP em comprimentos de onda que variam entre 300-600 nm de excitação e 600-700 nm de emissão (CROWLEY et al., 2016a; FRESHNEY, 2010).



O IP pode ser utilizado em associação com outros fluorocromos, o que permite mensurar parâmetros adicionais em uma população celular além da viabilidade celular, tais como a diferenciação entre os diferentes estágios da apoptose, um tipo de morte celular (CROWLEY et al., 2016b; PIETKIEWICZ; SCHMIDT; LAVRIK, 2015; RICCARDI; NICOLETTI, 2006).

Devido à propriedade de interagir com ácidos nucleicos o IP também é aplicado em análises do ciclo celular, permitindo diferenciar as fases do ciclo a partir da correlação entre a intensidade de fluorescência celular com a quantificação do conteúdo de DNA (KRISHAN, 1975; MULLEN, 2004; POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004; SANTOS et al., 2018; SILVA et al., 2019). Neste caso, as amostras celulares devem ser previamente preparadas com protocolos especiais, que incluem a utilização de agentes que permeabilizam a membrana celular (facilitando a entrada do IP na célula), além do tratamento com enzimas que degradam o RNA, permitindo que a marcação com o IP seja específica para o DNA (DARZYNKIEWICZ; BEDNER; SMOLEWSKI, 2001).

O IP é um composto potencialmente cancerígeno, portanto, deve ser manipulado cuidadosamente, utilizando-se medidas de biossegurança apropriadas descritas no Capítulo 4.

## **3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.1 Material**

A seguir, estão elencados os materiais necessários para realização do ensaio do IP:

- Cabine de fluxo laminar ou de segurança biológica;
- Centrífuga refrigerada;
- Solução de PBS estéril;

- Meio de cultura suplementado;
- Iodeto de Propídeo (solução estoque à 1 mg/mL, protocolo descrito no apêndice);
- Microplaca de 24 poços;
- Tubos para citometria;
- Micropipetas e ponteiras de diferentes volumes;
- Citômetro de fluxo (ou microscópio de fluorescência/confocal ou fluorímetro).

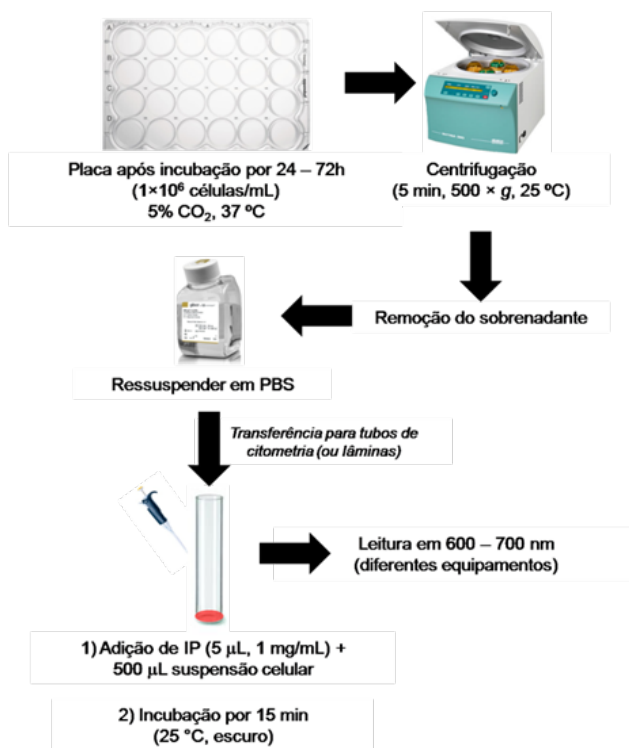
### 3.2 Protocolo

A seguir, detalha-se o protocolo para a realização do ensaio do IP (Figura 3):

- Proceder com o protocolo de “preparo e tratamento das células para ensaios de citotoxicidade”, conforme descrito no Capítulo 10.
- *Obs.: Para este ensaio recomenda-se utilizar uma concentração de plaqueamento ( $1 \times 10^6$  células/mL) e volume final da suspensão celular (500  $\mu$ L/poço) distintos.*
- Decorrido o período de incubação com as amostras teste (24 – 72h), centrifugar a placa (5 min, 500  $\times$  g, 25 °C) e descartar o sobrenadante.
- Lavar e ressuspender as células em PBS estéril. Transferir o conteúdo para tubos de citometria (ou lâminas de microscopia).
- *Obs.: A incubação das células em PBS + albumina sérica bovina (0,5%) por 30 min pode ser utilizada na recuperação da integridade de membrana.*
- Adicionar 5  $\mu$ L da solução estoque de IP (1 mg/mL) em 500  $\mu$ L da suspensão celular (a concentração final será de 10  $\mu$ g/mL).

- Incubar as amostras por 15 min, a 25 °C, protegidas da luz.
- *Obs.: O IP é fotossensível e o contato com a luz poderá inviabilizar a leitura.*
- Realizar a leitura em 600-700 nm utilizando-se filtros adequados.

**Figura 3** – Metodologia do ensaio do iodeto de propídeo



**Fonte:** Acervo particular do autor.

**Legenda:** Após incubação com a substância teste, a placa deve ser centrifugada e o sobrenadante removido. Em seguida, ressuspender as células em PBS e transferir a suspensão para tubos de citometria ou lâminas de microscopia. Adicionar o iodeto de propídeo (IP) e incubar as amostras por 15 min, à 25 °C, no escuro. A leitura deve ser realizada em 600 – 700 nm, utilizando filtros/equipamentos adequados.

## REFERÊNCIAS

- CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 11, p. 953-957, 2016b.
- CROWLEY, L. C.; SCOTT, A. P.; MARFELL, B. J.; BOUGHABA, J. A.; CHOJNOWSKI, G. Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, p. 647-651, 2016a.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; BEDNER, E.; SMOLEWSKI, P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. **Seminars in Hematology**, v. 38, n. 2, p. 179-193, 2001.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; LI, X.; GONG, J. Assays of Cell Viability: Discrimination of Cells Dying by Apoptosis. **Methods in Cell Biology**, v. 41, n. C, p. 15-38, 1994.
- DENGLER, W.A.; SCHULTE, J.; BERGER, D. P.; MERTEISMANN, R.; FIEBIG, H. H. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. **Anti-cancer drugs**, v. 6, p. 522-532, 1995.
- FRESHNEY, R.I. Quantitation. In: FRESHNEY, R. Ian. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. Sixth Edition. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010. p. 335-363.
- HORAN, P. K.; KAPPLER, J. W. **Cell preparation Antiserum and complement Treatment with antiserum and complement**. v. 18, p. 309-316, 1977.
- KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **The Journal of cell biology**, v. 66, n. 1, p. 188-193, 1975.

MULLEN, P. Flow Cytometric DNA Analysis of Human Cancer Cell Lines. In: LANGDON, Simon, P. **Methods in Molecular Medicine**, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2004, p. 247-255.

PIETKIEWICZ, S.; SCHMIDT, J. H.; LAVRIK, I. N. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. **Journal of Immunological Methods**, v. 423, p. 99-103, 2015.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. In: SCHÖNTHAL, Alex. H. **Methods in Molecular Biology**, vol. 281: Checkpoint Controls and Cancer, Volume 2: Activation and Regulation Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. p. 301-311.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

SANTOS, J.; BRITO, M.; FERREIRA, R.; MOURA, A. P.; SOUSA, T.; BATISTA, T.; MANGUEIRA, V.; LEITE, F.; CRUZ, R.; VIEIRA, G.; LIRA, B.; ATHAYDE-FILHO, P.; SOUZA, H.; COSTA, N.; VERAS, R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAGALHÃES, H.; SOBRAL, M. Th1-biased immunomodulation and *in vivo* antitumor effect of a novel piperine analogue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, 2594, 2018.

SILVA, D. K. F.; DUARTE, S. S.; LISBOA, T. M. H.; FERREIRA, R. C.; LOPES, A. L. O.; CARVALHO, D. C. M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DA SILVA, P. M.; SEGUNDO, M. A. S. P.; MOURA, R. O.; MEDEIROS, K. C. P.; SOBRAL, M.V. Antitumor effect of a novel spiro-acridine compound is associated with up-regulation of Th1-type responses and antiangiogenic action. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2019.

WROBEL, K.; CLAUDIO, E.; SEGADE, F.; RAMOS, S.; LAZO, P.S. Measurement of cytotoxicity by propidium iodide staining of target

cell DNA application to the quantification of murine TNF- $\alpha$ . *Journal of Immunological Methods*, v. 189, n. 2, p. 243-249, 1996.

YANG, Y.; XIANG, Y.; XU, M. From red to green: The propidium iodide-permeable membrane of *Shewanella decoloration* is S12 is repairable. **Scientific Reports**, v. 5, n. November, p. 2-6, 2015.

# APÊNDICE

## 1 PREPARAÇÃO DE TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS)

### *Material*

1. 8 g de Cloreto de Sódio (NaCl)
2. 0,2 g de Cloreto de Potássio (KCl)
3. 1,44 g de Fosfato Dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
4. 0,24 g de Fosfato Monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

### *Procedimento*

1. Pesar todos os produtos
2. Dissolver em 800 mL de água destilada
3. Ajustar o pH para 7,4
4. Completar 1 L com água destilada
5. Filtrar e autoclavar

## 2 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE AZUL DE TRIPAN (4%)

### *Material*

1. Azul de Tripán
2. PBS

### *Procedimento*

1. Pesar 0,4g de Azul de Tripán
2. Diluir em 10 mL de PBS
3. Filtrar a solução

### 3 SOLUÇÃO ESTOQUE DO VERMELHO NEUTRO (4 MG ML<sup>-1</sup>)

#### *Material*

1. Corante vermelho neutro;
2. Solução tampão fosfato (PBS) estéril;
3. Papel alumínio.

#### *Procedimento*

1. Pesar 40 mg de corante vermelho neutro;
2. Em fluxo laminar, dissolver o corante vermelho neutro pesado em 10 mL de PBS autoclavado;
3. Armazenar até 2 meses em temperatura ambiente (20-30 °C) protegida da luz por papel alumínio.

### 4 SOLUÇÃO DE VERMELHO NEUTRO (40 G ML<sup>-1</sup>)

#### *Material*

1. Solução de estoque do vermelho neutro (4 mg mL<sup>-1</sup>);
2. Meio de cultura suplementado;
3. Tubo de centrifugação tipo falcon estéril.

#### *Procedimento*

1. Em tubos de centrifugação e em condições estéreis, diluir 1:100 da solução estoque de vermelho neutro com meio de cultura, ou seja, 12 mL de meio mais 0,12 mL da solução estoque por placa;
2. Incubar durante a noite à 37 °C.

OBS.: O meio vermelho neutro deve ser preparado no dia anterior ao uso.



## **5 SOLUÇÃO DESCORANTE PARA O TESTE DO VERMELHO NEUTRO (50% DE ETANOL 96%, 49% DE ÁGUA DEIONIZADA E 1% ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL)**

### *Material*

1. Água deionizada;
2. Ácido acético glacial;
3. Etanol a 96%;

### *Procedimento*

1. Preparar 10 mL de água, 10 mL de etanol 96% e 0,2 mL de ácido acético glacial.

## **6 SOLUÇÃO DE MTT (5 MG/ML)**

### *Material*

1. Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT);
2. Solução tampão fosfato (PBS) estéril;
3. Papel alumínio.

### *Procedimento*

1. Pesar 50 mg de MTT;
2. Em fluxo laminar, dissolver o MTT pesado em 10 mL de PBS autoclavado;
3. Homogenizar bem;
4. Sugestão: Aliquotar o volume preparado em alíquotas de 1 mL em eppendorfs, envolvidos em papel alumínio para evitar a incidência de luz (o MTT é fotossensível).
5. Congelar.

## 7 PREPARAÇÃO SDS/HCL 0,01 N

### *Material*

1. Água destilada;
2. Ácido clorídrico (HCl) a 37%;
3. Dodecil sulfato de sódio (SDS);

### *Procedimento*

1. Adicionar 200  $\mu$ L de HCl a 37% a 180 mL de água destilada, sob agitação;
2. Para evitar a formação de espuma, adicionar lentamente 20 g de SDS a preparação de água destilada/HCl;
3. Após total dissolução do SDS, adicionar água q.s.p 200 mL.

## 8 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TRIPSINA - EDTA (0,25%)

### *Material*

1. Tripsina (0,25 %);
2. EDTA (0,04 %);
3. Solução tampão fosfato (PBS) estéril;

### *Procedimento*

1. Pesar a tripsina (0,25 g) e o EDTA (0,04 g);
2. Em fluxo laminar, dissolver os reagentes pesados em 100 mL de PBS estéril (OBS.: o volume final pode ser alterado conforme as necessidades experimentais, seguindo a proporção anteriormente indicada);

3. Homogeneizar bem;
4. Filtrar a solução através de um filtro (0,22 µm) acoplado à seringa;
5. Sugestão: *A solução deve ser aliqotada em pequenos volumes (exemplo: 1 mL), em microtubos do tipo eppendorf. Preferencialmente, este reagente não deve ser descongelado e congelado novamente, pois este processo pode alterar sua atividade;*
6. Armazenar no freezer (-20 °C).

## 9 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE IODETO DE PROPÍDEO (1 MG/ML)

### Material

1. Iodeto de propídeo (IP);
2. Água destilada ou milli-Q;
3. Papel alumínio

### Procedimento

6. Pesar 10 mg de IP;
7. Em fluxo laminar, acrescentar 10 mL de água destilada ou milli-Q (concentração final: 1 mg/mL);
8. Homogeneizar bem e aliqotar em pequenos volumes, em microtubos tipo eppendorf envolvidos com papel alumínio (aproximadamente 100 µL/eppendorf);

*Obs.: Preferencialmente, este reagente não deve ser descongelado e congelado novamente, pois este processo pode alterar sua atividade. Proteger da luz envolvendo os eppendorfs com papel alumínio, pois o IP é fotossensível.*

9. Armazenar no freezer (-20 °C).

## GLOSSÁRIO

**Absorbância** – Também chamada de absorvância, é a capacidade intrínseca dos materiais em absorver radiações em frequência específica, usualmente empregada na análise da concentração de soluções.

**Autoclavação** – Processo de esterilização feita por vapor saturado sob pressão de 1 ATM, a 121 °C, destinado a esterilização de materiais termorresistentes.

**Azul de Tripán** – Corante diazoderivado da toluidinae solúvel em água, utilizado em ensaios de avaliação da viabilidade de células.

**Biossegurança** – Conjunto de ações voltadas para a prevenção e minimização de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem, dos animais, à preservação do meio ambiente e à qualidade dos resultados.

**Cabine de segurança biológica** – Equipamento que promove um ambiente asséptico promovendo a proteção tanto dos usuários quanto das amostras manipuladas e do meio externo, de forma a renovar 100% do ar, por operar em pressão negativa.

**Cabines de fluxo laminar** – Equipamento promove um ambiente asséptico, por recirculação de 100% do ar, criando áreas de trabalho estéreis para o manuseio de materiais biológicos que não podem sofrer contaminação do meio externo, garantindo a proteção das amostras manipuladas.

**Câmara de Neubauer** – Também conhecida como hemocitômetro, trata-se uma lâmina de microscopia que contém uma câmara padronizada para a contagem manual de células.

**Células aderentes** – Crescem em monocamadas de na superfície do local de cultivo, dependentes de ancoragem para se proliferarem.

**Células em suspensão** – Geralmente derivadas de células hematopoiéticas, crescem em suspensão no meio de cultivo.

**Células imortalizadas** – Células derivadas da linhagem contínua que podem se dividir por um grande número de vezes sem perder as suas características.

**Células primárias** – Células derivadas da cultura primária com crescimento finito.

**Células transformadas** – Células com características tumorais, devido a transformação de genes que controlam a divisão celular, provocando a proliferação descontrolada. São morfologicamente diferentes do tecido original.

**Citometria de fluxo** – Técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo.

**Confluência** – Quantidade de células em crescimento, também conhecido como densidade celular. Geralmente expresso em %.

**Criopreservação** – Técnica empregada no cultivo celular que utiliza baixas temperaturas (menor que -130 °C) visando o armazenamento e estoque de linhagens celulares.

**Crioprotetor** – Substância que protege a membrana das células dos cristais formados durante o processo de congelamento. Geralmente utiliza-se DMSO ou glicerol.

**Criotubo** – Tubo descartável de plástico especializado para o congelamento de células.

**Cultura em 2D** – Cultura em que o crescimento das células ocorre em superfícies planas e sólidas, formando monocamadas em formato bidimensional (2D).

**Cultura em 3D** – São modelos de cultura *in vitro* em que as células são inseridas em uma matriz de hidrogel, formando multicamadas tridimensionais, mimetizando o ambiente *in vivo*.

**Cultura primária** – Tipo de cultivo celular obtido a partir da fragmentação ou dissociação mecânica e/ou enzimática de tecidos.

**DMEM** – Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*).

**DMSO** – Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo. É um solvente aprótico e polar bastante utilizado em laboratório e na indústria.

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético, é um composto orgânico quelante que forma complexos estáveis com diversos íons metálicos, como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ .

**Espectrofluorometria** – Também conhecida por fluorometria, é um tipo de espectroscopia eletromagnética a qual analisa a fluorescência de uma amostra.

**Esterilização** – Processo de destruição ou eliminação total de todos os microrganismos na forma vegetativa e esporulada, por meio do uso de agentes físicos ou químicos.

**Fase de declínio** – Fase do crescimento celular caracterizada pela redução do número de células viáveis e predominância de células mortas.

**Fase de Plateau** – Fase do crescimento celular estacionária onde a cultura se torna mais densa, diminuindo ou interrompendo seu crescimento.

**Fase Lag** – Fase do crescimento celular em que as células se encontram em período de adaptação e de disseminação celular.

**Fase Log** – Fase do crescimento celular também conhecida como fase logarítmica ou exponencial, caracterizada pela proliferação celular exponencial.

**Fluorescência** – Fenômeno pelo qual uma substância emite luz quando exposta a radiações, transformam-se em luz visível.

**Hemocitômetro** – Também conhecido como Câmara de Neubauer, trata-se uma lâmina de microscopia que contém uma câmara padronizada para a contagem manual de células.

**HEPES** – Tampão orgânico, ácido etanosulfônico 4-(2-hidroxietil)piperazina-1).

**Incubadora de CO<sub>2</sub>** – Equipamento essencial da cultura de células, por permitir o controle da temperatura e tensão de CO<sub>2</sub> no ambiente.

**Iodeto de propídeo** – Molécula fluorescente capaz de se ligar aos ácidos nucleicos de células com baixa viabilidade celular e assim utilizado em ensaios de citotoxicidade.

**Linhagem celular contínua ou imortalizada** – Tipo de cultivo celular com alta capacidade proliferativa e poucas características do seu tecido de origem.

**Meio completo** – Meio de cultura suplementado por soro, geralmente SBF.

**Meio de cultura** – Veículo líquido que contém os nutrientes necessários para o crescimento, divisão e multiplicação celular.

**Meio incompleto** – Meio de cultura desprovido de suplementação.

**MEM** – Meio essencial de Eagle (*Minimum Essential Medium Eagle*).

**Microplaca** – Placa descartável de plástico de fundo plano, cônico ou côncavo, que permite a divisão de soluções ou células em cultura em poços de número variado.

**Microscopia confocal** – Técnica utilizada para aumentar o contraste da imagem microscópica e construir imagens tridimensionais através da utilização de um orifício de abertura, *pinhole*, que permite uma grande definição de imagem em amostras mais espessas que o plano focal.

**Microtubo** – Tubo descartável de plástico utilizado no transporte e armazenamento de soluções em pequeno volume, conhecido como tubo “tipo” Eppendorf.

**MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), reagente utilizado em ensaios de avaliação da viabilidade celular.

**NaHCO<sub>3</sub>** – Sal inorgânico bicarbonato de sódio, utilizado como tampão em cultura.

**Passagem** – Processo de renovação de uma cultura celular, ao passá-las de uma garrafa para outra. Também conhecida como repique.

**PBS** – Solução tampão fosfato, bastante utilizada em procedimentos de cultivo de células.

**Plaqueamento** – Técnica de transferência de células ou soluções em microplacas.

**Repique** – Processo de renovação de uma cultura celular, ao passá-las de uma garrafa para outra. Também conhecida como passagem.

**Ressuspender** – Método de suspender o *pellet* de células após centrifugação.

**RPMI 1640** – Meio de cultivo elaborado no *Roswell Park Memorial Institute*, rico em vitaminas e glutatona.

**Soro bovino fetal (SBF)** – Soro utilizado na complementação dos meios de cultivo, rico em fatores de crescimento e de adesão celular.

**Sulforodamina B** – Também conhecida por vermelho Kiton 620, trata-se de um corante aminoxanteno aniônico capaz de se ligar a proteínas intracelulares e assim utilizado na determinação da viabilidade celular.

**Tampões** – Substâncias orgânicas ou inorgânicas com a finalidade de evitar a variação significativa do pH em uma determinada solução.



**Tripsina** – Enzima proteolítica inespecífica utilizada na dissociação celular, por meio de hidrólise de cadeias polipeptídicas, desestruturando a matriz e impossibilitando a ligação dos receptores da superfície celular.

**Tripsinizar** – Prática de uso de tripsina para a colheita de células aderentes em uma garrafa ou placa de cultura.

**Tubo “tipo” Falcon** – Tubo descartável de plástico de fundo cônico, utilizado no transporte e armazenamento de soluções.

**Vermelho neutro** – Corante vital bastante utilizado na avaliação da viabilidade celular.

## SOBRE OS ORGANIZADORES



### **JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES**

<http://lattes.cnpq.br/0104934558803330>

Professor Doutor da Universidade Federal da Paraíba.

E-mail: [goncalvesjcr@ccs.ufpb.br](mailto:goncalvesjcr@ccs.ufpb.br)

Doutor em Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) pela UFPB com período sanduíche na UWO/Canadá (Robarts Reserch Institute) (2011). Possui título de Mestre pelo PgPNSB (2008) e Graduação em Farmácia – Bioquímica pela UFPB (2006). Atualmente é Professor Adjunto do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF/ CCS) da UFPB, ministrando as disciplinas Citologia Clínica, Imunologia Clínica e Virologia. Realiza atividades de pesquisa junto ao Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFarM/UFPB), atuando em projetos envolvendo a prospecção de novas drogas antitumorais derivadas de plantas e seus derivados sintéticos. Tem experiência nas seguintes áreas: Farmacologia, Biologia Celular e Molecular, e Biotecnologia.



### **MARIANNA VIEIRA SOBRAL**

<http://lattes.cnpq.br/1036684849301560>

Professora Doutora da Universidade Federal da Paraíba.

E-mail: [mariannavbs@gmail.com](mailto:mariannavbs@gmail.com)

Graduada em Farmácia pela Universidade Federal da Paraíba/UFPB (2003). Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela UFPB na área de concentração Farmacologia (2007). Professora associada da UFPB, vinculada ao Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), atualmente responsável pelas disciplinas Farmacoterapia, Estágio de Vivência em Farmácia Hospitalar e Estágio

Supervisor em Farmácia. Docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/CCS/UFPB) na área de concentração Farmacologia. Atualmente coordena o Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), onde desenvolve atividades de pesquisa nos seguintes temas: farmacologia e toxicologia não clínica, produtos naturais e sintéticos com potencial antitumoral, modelo *in vitro* e *in vivo* na prospecção de drogas antitumorais.

## SOBRE OS AUTORES

### **Ana Luiza de Oliveira Lopes**

ana.lopes0407@gmail.com

Farmacêutica pela Universidade Federal da Paraíba (2018) atualmente Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde/UFPB, onde atua desde à iniciação científica nas áreas de farmacologia de produtos naturais e sintéticos bioativos, com foco na avaliação da toxicidade não-clínica, citotoxicidade e atividade antitumoral desenvolvidas no laboratório de OncoFarmacologia/ UFPB.

### **Ana Paula Gomes Moura Farias**

anapaulagomesm@hotmail.com

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal da Paraíba (2007), habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Federal da Paraíba (2009), Especialização em Farmacologia e Dispensação Farmacêutica (2012), Especialização em Gestão da Assistência Farmacêutica pela Universidade Federal de Santa Catarina (2012), Mestrado (2012) e Doutorado (2017) em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba, tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Farmacologia, Toxicologia, Oncologia e Biossegurança.

### **Camyla Caroliny Neves de Andrade**

camyla.andrade03@gmail.com

Farmacêutica pela Universidade Federal da Paraíba (2018). Atualmente Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde/UFPB, área de concentração Farmacologia, com ênfase nos seguintes temas: produtos naturais e sintéticos bioativos, citotoxicidade e atividade antitumoral, realizados no Laboratório

de OncoFarmacologia (OncoFar), do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). Tem experiência nas áreas de farmacologia de produtos naturais e sintéticos bioativos, avaliação da toxicidade não-clínica, citotoxicidade e atividade antitumoral.

### **Daiana Karla Frade Silva**

daiana.frade@gmail.com

Graduada em Ciências Biológicas (licenciatura) pela Universidade Federal da Paraíba (2014), com Mestrado em Biologia Celular e Molecular (2016) e Doutorado em Farmacologia (2020) pela mesma instituição. Tem experiência em Biologia e Fisiologia Celular, Parasitologia e Oncofarmacologia.

### **Juan Carlos Ramos Gonçalves**

goncalvesjcr@ccs.ufpb.br

Doutor em Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e Graduação em Farmácia – Bioquímica pela UFPB. Atualmente é Professor Adjunto do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF/CCS) da UFPB onde realiza pesquisa na área de Oncofarmacologia.

### **Marianna Vieira Sobral**

mariannavbs@gmail.com

Graduada em Farmácia pela Universidade Federal da Paraíba/ UFPB (2003), Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela UFPB (2007), na área de concentração Farmacologia. Atualmente professora associada do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF/CCS), membro do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) e coordenador do Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar).

### **Micheline Freire Donato**

micheline.donato@gmail.com

Bióloga, licenciada e bacharel pela UFPB. Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Farmacologia pela PGPNSB/ CCS/UFPB. Doutora em

Ciências-Fisiologia pela PGFisFar/ UFMG). Pós-doutora em Drug Discovery pela University of Nottingham-UK. Atualmente é Professora Visitante da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos DCF-UFPB. Atuou como Pesquisadora Visitante da Fundação Ezequiel Dias (FUNED/MG) e como analista de Propriedade Intelectual no Núcleo de Inovação Tecnológica CTIT/UFMG. Trabalha com farmacologia de produtos naturais desde 2002. Atualmente suas linhas de pesquisa estão focadas em Toxicologia não-clínica in vitro e in vivo, Toxinologia e Farmacologia Molecular de produtos naturais de plantas, toxinas e derivados na bioprospecção de fármacos com alvo nos sistemas glutamatérgico e canabinoide.

### **Rafael Carlos Ferreira**

rafaelcarlos@ltf.ufpb.br

Farmacêutico pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (2017). Mestre (2019) e doutorando em farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Centro de Ciências da Saúde/UFPB). Tem experiência no estudo da toxicidade e potencial antitumoral de produtos naturais e sintéticos.

### **Rawny Galdino Gouveia**

rawny\_gg@hotmail.com

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Estadual da Paraíba (2015), é Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba com ênfase na área de Síntese e Planejamento de Fármacos (2017). Desenvolveu pesquisa nos seguintes temas: Câncer, derivados de acridina com atividade antiproliferativa, intercaladores do DNA, inibidores das enzimas topoisomerases. Atualmente é Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba na área de Farmacologia com ênfase em Oncofarmacologia.

### **Sâmia Sousa Duarte**

samiasduarte@gmail.com

Possui graduação em Ciências Biológicas, na habilitação bacharelado (2013) e Mestrado em Biologia Celular e Molecular (2016), ambos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Atualmente é doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde/UFPB, na área de concentração Farmacologia, onde atua na avaliação da atividade citotóxica e antitumoral de novas moléculas sintéticas. Tem experiência nas áreas de biologia celular, parasitologia e farmacologia de produtos naturais e sintéticos (com ênfase nos seguintes temas: avaliação da toxicidade não-clínica, citotoxicidade e atividade antitumoral).

### **Thaís Mangeon Honorato Lisboa**

thaismangeon@gmail.com

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Paraíba (2014), mestrado em Biologia Celular e Molecular (2016) e Doutorado em Farmacologia (2020) pela mesma instituição. Tem experiência na área de Biologia Celular e Oncofarmacologia.

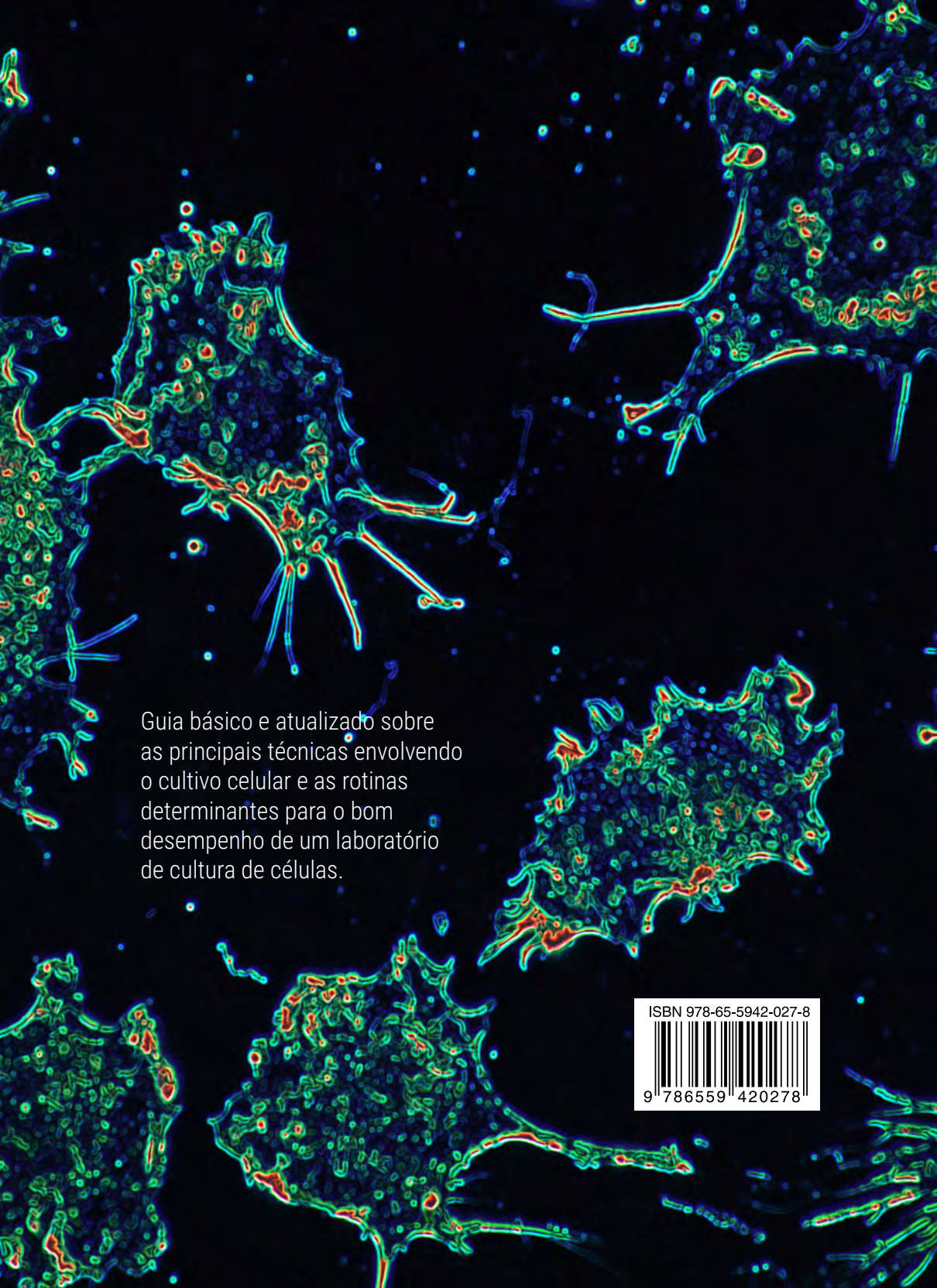
### **Valgrícia Matias de Sousa**

valgricia\_@hotmail.com

Farmacêutica pela Universidade Federal da Paraíba (2017), Mestra em Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) pela UFPB (2020) com ênfase nas áreas de Farmacologia e Toxicologia. Atualmente Doutoranda no PgPNSB na mesma instituição, atuando nos seguintes temas: produtos naturais e sintéticos bioativos, citotoxicidade e atividade antitumoral, realizando pesquisa no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar), do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). Tem experiência em Farmacologia, Biologia Celular e Bioquímica.

**EJ** Este livro foi diagramado pela Editora  
UFPB em 2020, utilizando as fontes  
D-DIN, DINPro e D-DIN Condensed.



A fluorescence microscopy image showing several large, irregularly shaped cells. The cells are stained with multiple dyes, resulting in a complex pattern of colors: bright green outlines and internal structures, red/orange spots and lines, and blue/cyan highlights. The background is dark, with some smaller, faintly stained cells scattered throughout. The overall appearance is that of a cell culture or tissue section under high-magnification fluorescence microscopy.

Guia básico e atualizado sobre  
as principais técnicas envolvendo  
o cultivo celular e as rotinas  
determinantes para o bom  
desempenho de um laboratório  
de cultura de células.

ISBN 978-65-5942-027-8



9 786559 420278