

### **3. Manutenção de células**

1. Cada cultivo celular tem uma taxa de crescimento e multiplicação, que varia de acordo com a densidade inicial da cultura e com a quantidade de soro usada.
2. Quando a monocamada atingir um estágio de confluência total, esta deverá ser “passada” para contínua manutenção. Cultivos muito confluentes ou velhos tendem a tornarem-se morfológicamente alterados (ex. presença de vacúolos), desprenderem-se da garrafa de cultivo e ou simplesmente morrem.
3. Antes de iniciar o processo deve-se aquecer o meio de cultivo, o soro e a tripsina no banho à 37°C, evitando-se que este tempo seja muito prolongado.
4. Remover o meio de cultivo da garrafa de célula desprezando-o em um frasco contendo uma solução de hipoclorito 0,2%. Cuidar para não respingar a solução de hipoclorito para dentro da garrafa de cultivo.
5. Lavar a monocamada de células com tripsina (utilize a tabela que está localizada no final desta técnica como referência), desprezando esta ao final. Opcionalmente pode-se utilizar PBS estéril.
6. Adicionar tripsina novamente e incubar na estufa à 37°C durante alguns minutos, até o desprendimento e individualização total das células.
7. Ressuspender as células com um volume pequeno de meio, pipetar e desprezar várias vezes para total individualização das células. Opcionalmente pode-se realizar a contagem das células.
8. Dividir o volume de células em garrafas ou placas conforme a necessidade de utilização. Normalmente quando não se está necessitando de células e deseja-se somente manter os cultivos pode-se passar 1:4 ou até 1:10, ou seja utilizar somente  $\frac{1}{4}$  ou  $\frac{1}{10}$  do volume final do passo 7. Quando há a necessidade de expansão dos cultivos pode-se usar uma concentração maior e a frequência mínima de passagem a cada 48 horas. Não é recomendado repicar as células a cada 24 horas.
9. Adicionar meio de cultivo suplementado com 5 a 10% soro para manutenção.

Pode-se utilizar o soro fetal bovino (SFB) ou soro equino, dependendo da célula a ser cultivada.

10. Sempre identificar o frasco de cultivo com o NOME DA CÉLULA, PASSAGEM, DATA, % DE SORO e NOME DA PESSOA RESPONSÁVEL.

11. Manter os cultivos em estufa à 37°C e monitorar diariamente.

Tabela - Quantidades utilizadas de tripsina para placas e garrafas.

<b>Garrafas/placas</b>	<b>Tripsina para lavar</b>	<b>Tripsinizar</b>
T-25 (plástico pequena)	1mL	500µL
T-75 (plástico média)	3mL	2mL
T-150 (plástico grande)	5mL	3mL
Garrafa de vidro	2mL	2mL
Placa de 6 poços	1mL/poço	500µL/poço
Placa de 24 poços	500µL/poço	300µL
Placa de 96 poços	150µL/poço	50µL/poço

#### **4. Congelamento de células**

1. Antes de iniciar o procedimento, certifique-se de estar com todo o material a ser utilizado em mãos: tubos de cultivo celular, suporte, ampolas identificadas, caixa de isopor com algodão para envolver as ampolas, frasco para preparar a suspensão de congelamento, MEM, soro, DMSO e tripsina.
2. As células a serem congeladas não podem estar vacuolizadas ou com o tapete mal-formado, pois essas condições interferem na viabilidade celular. Utilize células saudáveis, geralmente com 24 horas de cultivo.
3. Remova o meio de cultivo, lave o tapete com tripsina ou MEM e adicione tripsina para individualizar as células, colocando as garrafas na estufa a 37°C.
4. Prepare a solução de congelamento de células. Para cada ampola, prepara-se 1 a 1,5mL de solução.
5. Para células de cultivo primário, utilize a solução de congelamento para cultivo primário (ver abaixo).
6. Homogeneíze e ressuspensa as células tripsinizadas com MEM e transfira para tubos de cultivo celular ou tubos de centrifugação (tipo falcon). Tampe e centrifugue por 3 minutos a 3.000 rpm à temperatura ambiente.
7. Despreze o sobrenadante e ressuspensa o pellet de células na solução de congelamento; cuidado para não formar bolhas.
8. Transfira em seguida para as ampolas de congelamento identificadas com a **LINHAGEM CELULAR, NÚMERO DA PASSAGEM, DATA, TIPO DE SORO UTILIZADO E IDENTIFICAÇÃO PESSOAL DO RESPONSÁVEL**.
9. Acondicione as ampolas em caixa de isopor, envoltas pelo algodão. Note que o DMSO é tóxico para as células à temperatura ambiente. Seja rápido. A caixa de isopor sem tampa deve ser mantida a 4°C por 60 minutos. E após, mais 1 hora no freezer -20°C.
10. Em seguida, tampe a caixa e transfira para o freezer -70°C, onde deve permanecer por 24 horas.
11. **APÓS AS 24 HORAS**, as ampolas devem ser transferidas para o nitrogênio, a -196°C.

Antes da transferência, certifique-se em qual botijão e canister há espaço, identifique a vareta, anote no controle do botijão (computador > Dropbox > botijões de nitrogênio) os dados da célula (tipo, data, passagem, nome e número de ampolas). Só então retire sua caixa de isopor do freezer e faça a transferência.

**Proporções para o Congelamento:**

<b>Garrafa</b>	<b>Número de Ampola</b>
Garrafa de vidro (T-50)	1 a 2 ampolas
Garrafa média de plástico (T-75)	2 a 3 ampolas
Garrafa grande de plástico (T-150)	4 a 6 ampolas

**Reagentes e Soluções:****1. Solução de Congelamento:**

50% de SFB ou soro equino

40% de MEM

10% de DMSO

**2. Solução de Congelamento para Cultivo Primário:**

90% de SBF ou Soro equino

10% DMSO

## 5. Descongelamento de células

1. Verifique nas fichas de controle do botijão (computador > Dropbox > botijões de nitrogênio) de qual canister você vai retirar ampolas, anote a quantidade que você removeu e a localização.
2. A ampola deve ser descongelada rapidamente (já que o DMSO é tóxico à temperatura ambiente). Utilize o banho-maria a 37°C, certifique-se que a ampola está fechada e agite levemente.
3. Em seguida centrifugue as ampolas por 2 minutos a 3.000 rpm à temperatura ambiente.
4. Despreze o sobrenadante.
5. Ressuspenda o *pellet* de células em meio de cultivo próprio para as células (1mL).
6. Transfira as células para uma garrafa ou placa, complete o volume de meio e adicione 20% de SBF ou soro equino.

### OBS.:

- Opcional: 2 ou 3 horas depois do descongelamento, remover o meio com as células não aderidas e transferir para um novo frasco. Repor meio e soro (pré-aquecidos) na garrafa original.