

2. Cultivo celular primário

1. Os tecidos devem ser coletados de fetos ou animais jovens (devido a maior taxa de células em mitose), e acondicionados para transporte em solução salina (NaCl a 0,9%) estéril. Quanto menor for o período de tempo entre a coleta e a realização do cultivo primário, maior será a probabilidade de sucesso no cultivo.
2. Com o auxílio de material cirúrgico estéril (bisturi, lâminas e pinças) e placas de Petri (estéreis), sob condições de anti-sepsia, os tecidos devem ser picados e lavados em solução salina para remover gordura e hemácias.
3. Em seguida, a solução salina é desprezada e o material acondicionado em frascos com tripsina 0,25%, e levado ao banho-maria a 37°C por 30 minutos.
4. Remover o sobrenadante através de filtragem em gaze estéril, e adicionar novamente tripsina a 0,25% em abundância ao tecido macerado.
5. Após, colocar o tecido macerado em suspensão de tripsina por 30 minutos em agitador magnético, preferencialmente a 4°C.
6. Em seguida, filtrar o material em gaze estéril. Nesse passo observa-se o desprendimento do parênquima glandular. A porção sólida (não desintegrada) é desprezada e a porção líquida, contendo a tripsina e as células individualizadas, é acondicionada em tubos de cultivo, centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos.
7. O sobrenadante é desprezado e o *pellet* ressuspenso em 5mL de MEM suplementado com 5X de antibiótico (MEM 5X).
8. Após nova centrifugação, troca-se o meio por 2 a 4 vezes, ressuspendendo o *pellet* de células com MEM 5X. Esse passo tem como objetivo remover sujidades, principalmente hemácias, que são tóxicas às células quando essas são transferidas para as placas ou garrafas de cultivo.
9. Em seguida, ressuspender o *pellet* em MEM contendo 1X de antibiótico, adicionando-se 20% de soro fetal bovino (SBF). As células são transferidas para garrafas de cultivo (T-25) ou placas de poliestireno de 6 cavidades.

10. Mantêm-se as células em estufa a 37°C. A manutenção em estufa de CO₂, principalmente nas primeiras horas após a realização do cultivo primário, parece permitir a sobrevivência de um número maior de células.