



FOB USP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MANUAL DE CULTURA CELULAR: *SHED*

Ana Beatriz Vieira da Silveira
Mariel Tavares de Oliveira Prado Bergamo
Eloá Cristina Passucci Ambrósio
Luciana Lourenço Ribeiro Vitor
Natalino Lourenço Neto
Rodrigo Cardoso de Oliveira
Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado
Thais Marchini Oliveira

Vol. 3

Ana Beatriz Vieira da Silveira
Mariel Tavares de Oliveira Prado Bergamo
Eloá Cristina Passucci Ambrósio
Luciana Lourenço Ribeiro Vitor
Natalino Lourenço Neto
Rodrigo Cardoso de Oliveira
Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado
Thais Marchini Oliveira

Manual de Cultura Celular: SHED Vol. 3

Bauru

Faculdade de Odontologia de Bauru
Universidade de São Paulo

2025

2025 – Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de Bauru

Os autores são os detentores de direitos autorais de qualquer material utilizado nesta publicação, dispendo-se a possíveis acertos posteriores caso, inadvertidamente e involuntariamente, a identificação de alguns deles tenha sido omitida.

Manual de cultura celular : SHED [recurso eletrônico]
/ Ana Beatriz Vieira da Silveira ... [et al.]. -- Bauru:
Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de
São Paulo, 2025.
v.3, 25 p. : il. ; 31 cm.

Modo de acesso: <https://repositorio.usp.br/item/003248966>

ISBN 978-65-86349-26-9

1. Células. 2. Cultura de células. I. T. II. Silveira, Ana Beatriz
Vieira da. III. Bergamo, Mariel Tavares de Oliveira Prado. IV.
Ambrósio, Eloá Cristina Passucci. V. Vitor, Luciana Lourenço
Ribeiro. VI. Lourenço Neto, Natalino. VII. Oliveira, Rodrigo
Cardoso de. VIII. Machado, Maria Aparecida de Andrade
Moreira. IX. Oliveira, Thais Marchini.

CDD 574.87

Elaborada por: Maria Helena Souza Ronchesel CRB 8/4029

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75
17012-901 Bauru, SP
<http://www.fob.usp.br>
fob@usp.br

AUTORES

Ana Beatriz Vieira da Silveira

Graduada em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Alfenas da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS). Mestre e Doutoranda em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração Odontopediatria (FOB/USP).

Mariel Tavares de Oliveira Prado Bergamo

Professora assistente clínica adjunta da University of Michigan, UMICH, Estados Unidos. Graduada em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Mestre e Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração Odontopediatria (FOB/USP).

Eloá Cristina Passucci Ambrósio

Pós-doutoranda em Reabilitação pelo Hospital de Reabilitação das Anomalias Craniofaciais (HRAC/USP). Graduada em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Mestre e Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração Odontopediatria (FOB/USP).

Luciana Lourenço Ribeiro Vitor

Professora auxiliar I da Unisagrado (USC). Graduada em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Mestre em Ciências da Reabilitação pelo Hospital de Reabilitação das Anomalias Craniofaciais (HRAC/USP). Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração Odontopediatria pela (FOB/USP).

Natalino Lourenço Neto

Professor Doutor II (RDIDP) no departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP). Graduado em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Mestre e Doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração Odontopediatria (FOB/USP).

Rodrigo Cardoso de Oliveira

Professor Titular do departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Graduado em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração Endodontia (FOB/USP). Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na Área de Concentração Bioquímica (UNICAMP).

Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

Professora Titular no departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP). Graduada em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Mestre e Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração Odontopediatria (FOB/USP).

Thais Marchini de Olivera

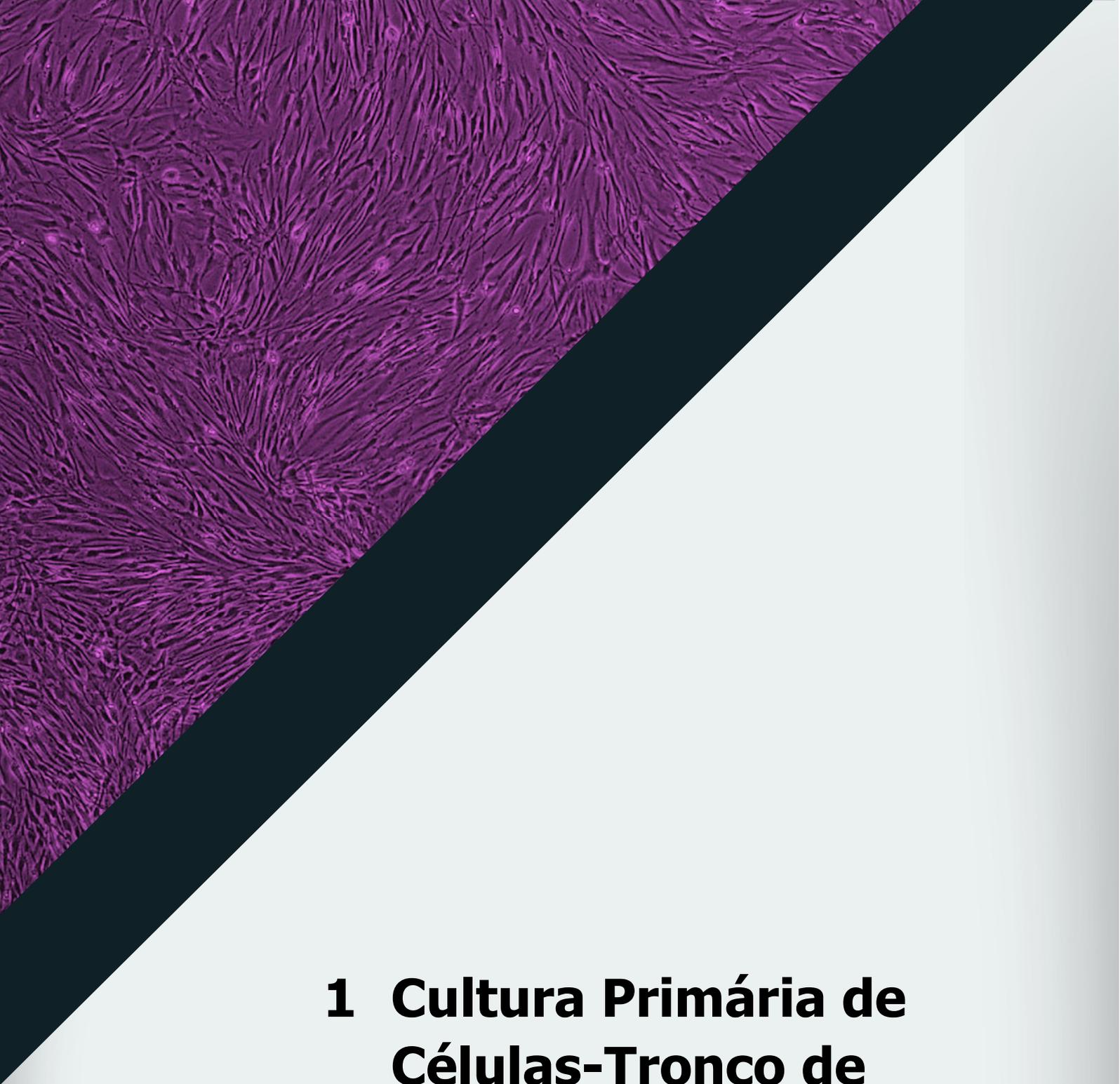
Professora Titular no departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP) e do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação - Fissuras Orofaciais e Anomalias relacionadas (HRAC/USP). Graduada em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Mestre e Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração Odontopediatria (FOB/USP).

SUMÁRIO

Apresentação	5
1 Cultura Primária de Células-Tronco de Dentes Decíduos: SHED	7
1.1 Exodontia, Coleta do Tecido Pulpar e Cultura Primária	7
1.2 Trocas do Meio de Cultura das Células em Primeira Passagem.....	10
1.3 Subcultivo e Tripsinização	11
1.4 Contagem de Células	13
1.5 Congelamento das Células	15
1.6 Descongelamento das Células	18
2 Caracterização de Células: SHED	21
2.1 Técnica Citometria de Fluxo	21
Bibliografia	25

APRESENTAÇÃO

Este Manual de Cultura Celular foi elaborado pelos professores e alunos de Pós-Graduação da Disciplina de Odontopediatria (Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva) e Disciplina de Bioquímica (Departamento de Ciências Biológicas) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), com o objetivo de auxiliar na padronização das técnicas de cultivo primário e manutenção das culturas de células pulparens provenientes de dentes decíduos humanos.



1 Cultura Primária de Células-Tronco de Dentes Decíduos:

SHED

1 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS: SHED

1.1 Exodontia, Coleta do Tecido Pulpar e Cultura Primária

No dia anterior:

Materiais necessários:

1. Instrumental completo para exodontia de dente decíduo;
2. Instrumental para processamento do explante em fluxo:
 - 2 fórceps de incisivos;
 - pinça Dietrich;
 - cabo de bisturi e lâmina de bisturi 15c;
 - tesoura para tecidos;
 - curetas de pulpotomia – longas e afiadas;
 - limas endodônticas;

Esterilizar em autoclave antes do procedimento.

3. Material plástico:
 - placa de Petri (90 x 15 mm);
 - tubo Falcon 15 e 50 mL;
 - filtro cell strainer 70 µm;
 - garrafa para cultura T25;
 - pipetas sorológicas de 5 e 10 mL e ponteiras de 1000 µl

Todo material plástico deve ser estéril.

4. Soluções (quantidades para processar um dente):
 - meio α MEN de transporte (suplementado com antibiótico e antifúngico) – 45 mL
 - meio α MEN 15% SFB – 50 mL
 - solução colagenase 3 mg/mL – 10 mL
 - solução de dispase 4 mg/mL – 10 mL

No laboratório, processamento do tecido:

Após os procedimentos clínicos de exodontia, assinatura do TCLE e dispensa do paciente:

1. Limpar o dente com soro e remover resíduos de sangue ou ligamento;
2. Colocar o dente no tubo Falcon de 15 mL contendo 5 mL de solução de transporte (α MEM suplementado com antibiótico e antifúngico), acondicionar no gelo e ir para

- o laboratório em até 2 horas após a exodontia;
3. Lavar o dente 2 vezes deixando o mesmo 10 min em 5 mL do meio de transporte (α MEM suplementado com antibiótico e antifúngico);
 4. Em uma placa de Petri colocar 10 mL de meio α MEM suplementado com antibiótico e antifúngico, acondicionar o dente na placa para clivagem do mesmo e obtenção dos tecidos pulpareis;
 5. Abrir OUTRA placa de Petri e despejar nela 5 mL de solução Dipase 4 mg/mL e 5 mL de solução Colagenase 3 mg/mL, reservar;
 6. Curetar a polpa do dente clivado, com curetas e limas, e colocar nesta NOVA placa de Petri contendo as soluções de Colagenase e Dispase, para digestão enzimática;
 7. Picotar a polpa com lâmina de bisturi e/ou tesoura para tecido dentro da placa de Petri em menores pedaços possíveis.
 8. Com uma pipeta sorológica de 10 mL transferir os fragmentos e o meio de digestão celular para um tubo Falcon de 50 mL, completar o mesmo com mais 5 mL da solução Dipase 4mg/mL e 5 mL de solução Colagenase 3 mg/mL;
 9. Fazer "up and down" vigoroso (3X) do conteúdo com pipeta de 10 mL e levar à estufa (37 °C; 5% CO₂) por 1 hora para início da "digestão tecidual", repetir o "up and down" (3X) a cada 15 minutos até o fim do período da digestão tecidual;
 10. Terminada a digestão tecidual, centrifugar o tubo Falcon 20 °C; 1200 rpm; 5 minutos; ~9 (accel/brake), após a centrifugação, será observado no fundo do tubo Falcon o pellet;
 11. Retornar ao fluxo e descartar o sobrenadante, virar imediatamente o tubo de uma só vez no descarte, o pellet ficará no fundo do tubo, ressuspender o *pellet* em 15 mL de α MEM 15% SFB;
 12. Com uma pipeta de 5 mL colher todo o conteúdo do tubo Falcon e transferir para um novo tubo Falcon de 50 mL passando o mesmo pelo filtro **Cell Strainer de 70 μ m** – observação, apoiar a ponta da pipeta no fundo do filtro e dispensar a solução, a pressão ajuda a passar mais rapidamente o conteúdo pelo filtro;
 13. Terminada a filtragem de todo o conteúdo, levar o tubo Falcon para centrifugar: 20 °C; 1200 rpm; 5 minutos; ~9 (accel/brake), após a centrifugação, será observado no fundo do tubo Falcon o *pellet*;
 14. Retornar ao fluxo e descartar todo o conteúdo do tubo Falcon, virar imediatamente o tubo de uma só vez no descarte, o pellet ficará no fundo do tubo, ressuspender o *pellet* com ponteiros de 1000 μ l em 3 mL de meio α MEM 15% SFB e dispensar o conteúdo em uma garrafa T25 para início do cultivo celular;

15. Mexer a garrafa com movimentos de "8 infinito" visando espalhar de forma uniforme em todo o fundo da garrafa T25 o meio, as células e os explantes se existirem;
16. Deixar por 48 horas na estufa (37 °C; 5% CO₂) para adesão celular e dos tecidos na garrafa. Fazer as tocas de meio a cada 48 horas.

1.2 Trocas do Meio de Cultura das Células em Primeira Passagem

1. Programar os dias que serão realizadas as trocas do meio.
2. Limpar o fluxo com álcool 70%, colocar o descarte dentro do fluxo.
3. Aquecer α MEM 15% SFB em banho-maria
4. Tirar a garrafa da incubadora e fotografar. Se a tampa da garrafa for sem filtro: não se esquecer de rosquear bem a tampa antes de tirá-la, caso contrário não precisa rosquear.
5. No microscópio, observar e fotografar.
6. Levar garrafa para o fluxo e retirar todo meio de cultura da garrafa com uma ponteira de 1000 μ L. Descartar a pipeta.
7. Com outra ponteira de 1000 μ L, adicionar 3 mL de α MEM 15% SFB na garrafa com cuidado. Colocar o meio com cuidado, de preferência no canto do frasco de cultura.
8. Fechar a garrafa, mexer com cuidado e com movimentos de "infinito" (8 deitado).
9. Levá-la para incubadora.

Observação: Para cultura primária, na primeira semana a troca do meio de cultura é feita com a ponteira de 1000 μ L, e após adesão das células, é feita com a pipeta de 5 mL para a garrafa T25 ou pipeta de 10 mL para a garrafa T75.

1.3 Subcultivo e Tripsinização

1ª passagem – Da garrafa T25 (pequena) para a garrafa T75 (média).

A partir da 2ª passagem – Da garrafa T75 (média) para garrafa T75 (média).

1ª passagem:

No dia anterior: Conferir soluções e materiais.

Soluções – Descongelar: Tripsina pura (A quantidade de uso é 2 mL/garrafa pequena T25 ou 3 mL/garrafa média T75).

Verificar: tubo Falcon com α MEM 15% SFB; tubo Falcon com PBS 1x (Quantidade de uso é 5 mL).

Materiais – Laboratório: pipetas de 5 mL/10 mL; pipetas Pasteur; ponteiros; tubo Falcon vazio; garrafa T75 para cultura.

1. Colocar tubo Falcon de α MEM 15% SFB, tubo Falcon de PBS 1x, e tubo Falcon com a Tripsina para aquecer em banho-maria.
2. Tirar a garrafa da incubadora.
3. Observar a garrafa no microscópio invertido e fotografar – conferir se as células estão em subconfluência (com pouco espaço para proliferação) ou confluência.
4. Levar as soluções aquecidas e a garrafa para o fluxo.
5. Retirar o meio da garrafa com a pipeta de 5 mL: inclinar um pouco a garrafa e remover o máximo possível de meio antigo.
6. Colocar 5 mL de PBS 1 x no fundo da garrafa com outra pipeta de 5 mL, mexer delicadamente a garrafa para lavar, e já colher todo PBS com a mesma pipeta. Descartar o líquido e a pipeta.
7. Em seguida, com uma nova pipeta adicionar 2 mL ou 2000 μ L de Tripsina pura se for na garrafa T25, se for na T75 adicionar 3 mL ou 3000 μ L de Tripsina pura.
8. Tampar a garrafa e levar à incubadora por 5 a 8 minutos.
9. Enquanto a garrafa está na incubadora, pegar a garrafa média de cultura (T75) e nomear: SHED (nome do paciente); 1ª passagem; data da passagem; nome do pesquisador.
10. Adicionar mais 10 mL de α MEM 10% SFB na garrafa T75.

11. Após este período, tirar a garrafa da incubadora e observar no microscópio se as células desgrudaram do fundo do frasco de cultura celular. Visualmente, o líquido do meio de cultura estará turvo e microscopicamente notamos que as células ficam esféricas (aspecto de "areia", de "bolinhas").
12. Podemos bater na lateral da garrafa para desprender células que ainda estejam aderidas.
13. Conferir no microscópio se as células estão completamente desprendidas da garrafa.
14. Adicionar Meio de cultura correspondente ao dobro da quantidade que você colocou de tripsina (2 mL de tripsina então 4 mL de α MEM 15% SFB) para inativar a tripsina.
15. Colher todo conteúdo da garrafa com a pipeta de 5 mL, varrendo o fundo dela cerca de 2-3 vezes previamente.
16. Transfere todo conteúdo para um tubo Falcon 15 mL;
17. Levar para centrifugar: 20 °C; 1200 rpm; 5 minutos; ~9 (accel/brake).
18. Após a centrifugação, será observado no fundo do tubo Falcon o pellet.
19. Retornar ao fluxo e descartar o sobrenadante (meio), sem descolar o pellet do tubo. Ao virar imediatamente o tubo de uma só vez no descarte, o pellet ficará no fundo do tubo.
20. Adicionar, com auxílio da pipeta, 1000 μ L de α MEM 15% SFB neste tubo Falcon contendo o pellet.
21. Ressuspender o pellet e fazer up-down na solução com a pipeta. Caso as células estejam muito aderidas e difícil de desprender, faça up and down com a pipeta Pasteur.
22. Colher todo conteúdo ressuspendido (meio+tecido) e colocar no fundo da garrafa média.
23. Mexer a garrafa com movimentos de "infinito" (8 deitado) para espalhar o meio e as células.
24. Levar a garrafa para a incubadora.
25. Após o processo de tripsinização, essa nova garrafa deverá ter a troca do meio de cultura mantida em 3 vezes por semana.

1.4 Contagem de Células

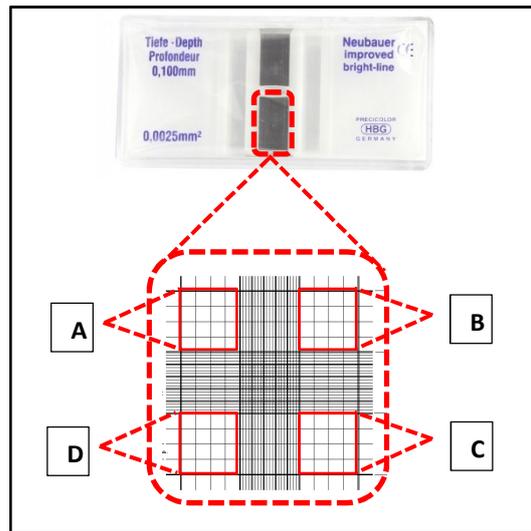
Soluções – Turk - azul de tripan

Materiais – *Laboratório*: ponteiras; Eppendorf; câmara de Neubauer; lamínula; contador de células manual.

1. Dentro do fluxo laminar preparar um microtubo com 180 μL de azul de Tripan.
2. No microtubo preparado com 180 μL da solução de Turk (azul de tripan) adicionar 20 μL da solução de células ressuspendidas (Diluídas 10x – 200 μL solução = 20 μL células + 180 μL azul de tripan). Fazer up-down leve para que as soluções se misturem (Figura 7-A)
3. Colocar uma lamínula sobre a câmara de Neubauer e pressioná-la levemente sobre a câmara, enquanto aos poucos com uma pipeta de 20 μL , adiciona-se 10 μL da solução de células + azul de tripan (Figura 7-B)
4. Fazer a contagem no microscópio invertido com o dispositivo “counter-cell” ou contador de células manual (Figura 7-C, D).
5. As áreas contadas são A, B, C e D da câmara. Obtém-se um total de células. De preferência não contar as células que estiverem sob os limites da câmara, apenas as que estiverem dentro dos quadrados menores.
6. A contagem deve ser feita por duas pessoas e com os resultados em mãos das duas contagens faz-se uma média.
7. Com essa média em mãos, essa quantidade obtida é colocada em uma fórmula para obtenção do valor mais aproximado de células, levando se em conta a diluição e o volume da ressuspensão.

Câmara Neubauer

Figura 1 – Esquema da Câmara de Neubauer com os campos necessários para realizar a contagem de células



Fonte: Elaborada pelos autores.

FÓRMULA: $\frac{A+B+C+D}{4} \times 10 \times 10^4 \times 1 \text{ mL}$ (diluição/fórmula/vol. res)

4

Ex.: $\frac{293 \text{ células}}{4} \times 10 \times 10^4 \times 1 \text{ mL}$ (ou seja, 1 mL ressuspensão)

4

$73,25 \times 10^5$ --- 1000 μL (1 mL ressuspensão)

2×10^5 ---- x = 27 μL /garrafa

1.5 Congelamento das Células

No dia anterior: Conferir materiais e soluções.

Soluções: – *Descongelar:* Tripsina pura (3 mL/garrafa média T75).

Verificar: αMEM 15%; PBS 1x (5-10 mL); Meio de Congelamento (DMSO; SFB; αMEM 1%AB); azul de tripan.

Materiais – *Laboratório:* Pipetas (5 e 10 mL); Ponteiras; Tubo Falcon vazio (15 mL); Garrafas médias para cultura (T75); câmara de Neubauer; "conter-cell" ou contador de células; vials.

Preparo do meio de congelamento

1. Fazer o cálculo conforme a quantidade que você quer preparar de solução, respeitando os seguintes constituintes e porcentagens: αMEM 1%AB (75%), Soro Fetal Bovino (20%) e DMSO estéril (5%).
2. Dentro do Fluxo separar as ponteiras de 1000 µL e a pipeta de 10 mL e o tubo Falcon de 50 mL e tubos Falcon de 15 mL
3. No tubo Falcon de 50 mL adicionar: Meio de cultura puro, Soro Fetal Bovino e DMSO estéril. Fazer up and down.
4. Escrever nos tubos Falcon de 15 mL : Solução de Congelamento SHED, colocar a data e nome do operador.
5. Aliquotar a solução preparada nesses tubos Falcon de 15 mL.
6. Congelar as soluções

Congelamento das células

1. Limpar o fluxo com álcool 70%, colocar o descarte dentro do fluxo.
2. Tirar a garrafa da incubadora.
3. Observar a garrafa no microscópio, quanto a coloração do meio de cultura (pH) e quanto a quantidade de células (conferir se as células estão em estado de subconfluência na garrafa, que quando 90% da garrafa está preenchida).
4. Levantar as soluções aquecidas e a garrafa para o fluxo. Sempre fazer up-down nas soluções, antes de usá-las.
5. Retirar todo meio da garrafa com a pipeta de 10 mL. Descartar a pipeta.
6. Com outra pipeta de 10 mL, adicionar 5-10 mL de PBS 1 x no fundo da garrafa,

movimentar a garrafa no movimento de infinito e remover todo PBS com a mesma pipeta. Se perceber que o PBS ficou rosado, melhor lavar novamente. Descartar a pipeta.

7. Com uma pipeta de 5 mL, adicionar 3 mL de Tripsina pura na garrafa (T75).
8. Tampar a garrafa, mexer delicadamente, e levar à incubadora por 3-5 minutos.
9. Enquanto a garrafa está na incubadora, separar tubo Falcon de 15 mL ou 50 mL para coletar a solução de células.
10. Após o período de 3-5 minutos, tirar a garrafa da incubadora e observar no microscópio se as células desgrudaram do fundo. Macroscopicamente: o líquido da garrafa T75 se tornará turvo e microscopicamente notamos que as células ficam esféricas (aspecto de "areia", de "bolinhas").
11. Bater na lateral da garrafa para desprender células que ainda estejam aderidas ao frasco de cultura.
12. Conferir novamente no microscópio se as células estão completamente desprendidas da garrafa.
13. Retornar ao fluxo e adicionar o dobro da quantidade de meio que foi adicionada de Tripsina. Assim, adicionar 3 mL de α MEM 15% SFB para inativar a tripsina.
14. Com uma nova pipeta de 10 mL, colher todo conteúdo da garrafa e despejar novamente fazendo o movimento de varredura, cerca de 2-3 vezes, depois recolher todo o conteúdo e transferir para um tubo Falcon 15 mL (ou 50 mL – dependendo da quantidade de garrafas) e completar com α MEM 15% SFB.
15. Levar para centrifugar: 20 °C; 1200 rpm; 5 minutos. Lembrando de fazer o balanceamento da centrifuga, colocando um tubo Falcon com água do outro lado da centrifuga, contendo a mesma quantidade de mL que tem no tubo Falcon com a solução de células.
16. Enquanto o tubo Falcon está centrifugando, preparar os instrumentos para realizar a Contagem das células.
17. No fluxo, preparar: microtubo 180 μ L Turk-azul de tripan e separar câmara de Neubauer.
18. Após a centrifugação, será observado o pellet no fundo do tubo Falcon.
19. Retornar ao fluxo e descartar o sobrenadante (meio), sem descolar o pellet do tubo. Deve-se virar imediatamente o tubo de uma só vez no descarte, o pellet ficará no fundo do tubo.
20. Fazer a ressuspensão das células, conforme o tamanho do pellet. Quanto maior o pellet maior o volume de meio para ressuspensão. Assim, se o pellet for pequeno,

adicionar 1000 μ L de α MEM 15% SFB neste tubo Falcon contendo o pellet. Porém, se for maior adicionar de 2 – 3 mL.

21. Ressuspender o pellet –fazer up-down na solução com a pipeta de 1000 μ L.
22. No microtubo preparado com 180 μ L Turk – azul de tripan adicionar 20 μ L células ressuspendidas (diluídas 10x – 200 μ L solução= 20 μ L células + 180 μ L azul de tripan).
23. Coletar 10 μ L desta solução (células + azul de tripan) e colocar na câmara de Neubauer.
24. Fazer a contagem no microscópio com o dispositivo “counter-cell”.
25. Ver esquema de contagem celular (Figuras 6 e 7)
26. Retornar ao fluxo – preparar para Congelamento.
27. Nomear vials no fluxo (Linhagem+ Passagem+ data + nome de quem congela).
28. Após centrifugação, descartar sobrenadante e ressuspender o pellet em meio de congelamento.
29. A quantidade da solução de congelamento adicionada ao pellet é de 1 mL para cada 1×10^6 células
Ex: 4 garrafas = $73,25 \times 10^5 = 7,325 \times 10^6$ células $\sim 7 \times 10^6$ células = 7 vials com 1×10^6 /vail
30. Seguindo o exemplo acima, centrifugar as células novamente, descartar sobrenadante e ressuspender o pellet em 7 mL de solução de congelamento
31. Colocar 1 mL desta solução de células nos microtubos de congelamento previamente identificados.
32. Armazenar os vials no freezer -80 °C na caixa de plástico/papelão identificada com o nome do pesquisador e a linhagem de células. E quando for passagens mais baixas pode armazenar os vials em canisters no tambor de nitrogênio líquido. Anotar a alça do tambor que está guardado cada canister, contendo os vials.

1.6 Descongelamento das Células

No dia anterior: Conferir materiais e soluções.

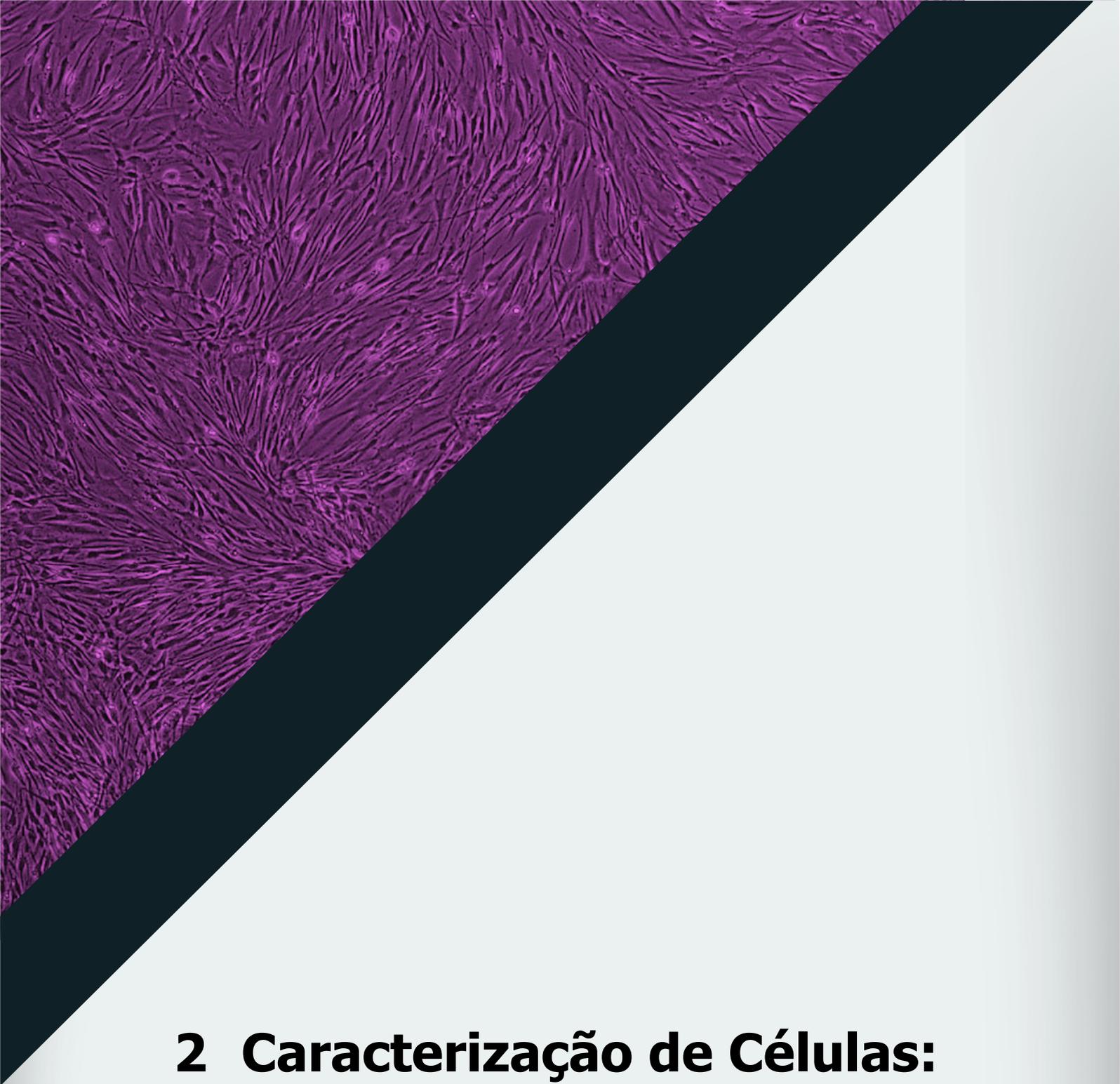
Soluções – Verificar: α MEM 15%; PBS 1X (5-10 mL);

Materiais– Laboratório: Pipetas (10 mL); Ponteiras; tubo Falcon vazio; Garrafas médias para cultura (T75).

Experimento

1. Limpar o fluxo com álcool 70%, colocar o descarte dentro do fluxo.
2. Colocar PBS 1X, para aquecer em banho-maria.
3. NÃO aquecer DMEM 10% SFB – será usado gelado para o descongelamento
4. Tirar vial congelado do tambor de nitrogênio ou do freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Verificar a identificação e passagem das células (Figura 8 – A)
5. Ir adicionando meio DMEM 10% SFB gelado no vial para descongelar.
6. Posteriormente dentro do fluxo: adicionar dentro de um tubo Falcon 4 mL de α MEM 15% SFB e 1 mL da solução contendo células que estava no vial. Se ainda não estiver totalmente descongelado o vial, pode-se optar por fazer o descongelamento do vial usando meio de cultura gelado e fazendo levemente up-down.
7. Levar o tubo Falcon com a solução de células para centrifugar a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$; 1200 rpm; 5 minutos; ~ 9 (accel/brake). Lembrar de fazer o balanceamento da centrifuga, colocando um tubo Falcon com água do outro lado da centrifuga, contendo a mesma quantidade de mL que tem no tubo Falcon com a solução de células (Figura 8 – B)
8. Enquanto isso no fluxo, preparar a(s) garrafa(s): identificar a linhagem celular, a passagem (mesma passagem vial descongelado) e o nome do pesquisador.
9. Retirar o tubo Falcon da centrífuga, observar a formação do pellet (Figura 8 – C) e retornar para o fluxo.

10. Descartar todo meio do tubo que contém o pellet (Figura 8 – D), e ressuspender o pellet em α MEM 15% SFB (Figura 8 – E); sendo necessário 1 mL de meio para cada garrafa; por exemplo, se irá expandir em 2 garrafas, o pellet deverá ser ressuspensionado em 2 mL.
11. Adicionar 9 mL de α MEM 15% SFB em cada garrafa. Colocar 1 mL da solução com células ressuspensas em cada garrafa e movimentá-la levemente.
12. Levar a(s) garrafa(s) para estufa para adesão e posterior expansão.
13. Após 24 horas: remover todo o meio e lavar com PBS 1x; em seguida trocar o meio α MEM 15% SFB a cada 48 horas. Até a garrafa entrar em subconfluência e ter a quantidade de células necessárias para fazer o experimento.



2 Caracterização de Células:

SHED

2 CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS: SHED

2.1 Técnica Citometria de Fluxo

Soluções – Accutase; Azul de Tripan; Kit hMSC – BD 56224; Meio αMEM 15% SFB; Meio de congelamento SHED; PBS; Stain Buffer - BD 554656 (Frio)

Materiais – Separar: Isopor; Gelo; Câmara de Neubauer; Lamínula; Contador de células manual; Papel alumínio; Tubo Falcon 15 e 50 mL; Pipetas sorológicas de 5 e 10 mL; Ponteiras de 10 µl, 20-200 µl e 1000 µl; Tubos para Citometria; Microtubo; Criotubo

Todo material plástico deve ser estéril.

No dia anterior: Descongelar a Accutase

1. Adicionar gelo no isopor e levar para o laboratório.
2. Retirar as garrafas da estufa e fotografar
3. Dentro do fluxo: remover meio de cultura e lavar as células com 10 mL de PBS.
4. Adicionar 3 mL da Accutase (cobrir adequadamente toda a área do recipiente de cultura) e deixar incubando por 5 minutos em estufa a 37 ° C.
5. Dar leves tapinhas com pequena força nos cantos da garrafa para auxiliar no descolamento das células.
6. Adicionar 6 mL de αMEM 15% SFB para neutralizar a accutase.
7. Recolher todo o conteúdo da garrafa e adicionar num tubo Falcon de 50 mL.
8. Centrifugar o tubo Falcon de 50 mL a 1200 rpm, 5 minutos, 20 °C.
9. Revisar a garrafa no microscópio, observar se desprende todas as células.
10. Enquanto centrifuga, pegar 1 microtubo e adicionar 180 µL de azul de tripan. Preparar a câmara de Neubauer, a lamínula e o contador de células manual.
11. Após centrifugar, descartar o sobrenadante e ressuspender em 2 ou 3 mL de meio de cultura αMEM 15% SFB.
12. No mesmo microtubo com azul de tripan, adicionar 20 µL da solução de células ressuspendidas, fazer up and down e adicionar conteúdo na câmara de Neubauer.
13. Contar as células em microscópio.

$$\text{Fórmula: } \frac{\text{Número de Células}}{4} \times 10 \times 10^4 \times \text{volume de ressuspensão}$$

Fazer o cálculo da quantidade de microlitros daquela solução necessária para obter

5x10⁵ células por tubo (sendo que a concentração de células necessária em 1 mL é de 50 x10⁵ para 10 tubos).

14. Se houver mais células do que o necessário, transferir a quantidade excedente para um novo tubo Falcon de 15 mL e posteriormente centrifugar (1200 rpm, 5 minutos, 20 °C), descartar sobrenadante e ressuspender em meio de congelamento SHED. Outras opções são descartar as células ou adicionar o conteúdo restante na garrafa T75 e continuar a expansão.
15. No tubo Falcon só ficará a quantidade de células necessárias para o experimento. Adicionar mais 3 mL de meio de cultura e centrifugar o tubo Falcon (1200 rpm, 5 minutos, 20 °C).
16. Enquanto Centrifuga, nomear tubos para citometria de 1 a 9, lembrando-se de fazer 2 tubos com o número 5 (padrão sem anticorpo).
17. Descartar sobrenadante e ressuspender em 1 mL de Stain Buffer frio centrifugar 1200 rpm, 5 minutos, 4 °C. Descartar sobrenadante e adicionar novamente 1 mL de Stain Buffer frio, centrifugar novamente 1200 rpm, 5 minutos, 4 °C, descartar e ressuspender em 1 mL de Stain Buffer frio.
18. Adicionar 100 µL da solução de células ressuspendidas em cada tubo nomeado.
19. Adicionar nos tubos – **a partir de agora sempre com as luzes apagadas, os anticorpos são fotossensíveis.**

Tubo	Add (1 Test size)
1	FITC Mouse Anti-Human CD90 (5 µL)
2	PE Mouse Anti-Human CD44 (5 µL)
3	PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD105 (5 µL)
4	APC Mouse Anti-Human CD73 (5 µL)
5	Nothing (Somente Células)
6	hMSC Positive Isotype Control Cocktail (20 µL) PE hMSC Negative Isotype Control Cocktail (20 µL)
7	hMSC Positive Cocktail (20 µL) E/OU PE hMSC Negative Cocktail (20 µL)
8	hMSC Positive Isotype Control Cocktail (20 µL) Drop in isotype control (i.e. PE Mouse IgG2b, κ) (5 µL)
9	hMSC Positive Cocktail (20 µL) PE Drop in (i.e. PE Mouse Anti-Human CD44) (5 µL)

20. Incubar os tubos no isopor com gelo e deixar por 30 minutos.

21. Após o 30 minutos, adicionar 1 mL de Stain Buffer em cada tubo e centrifugar a 1200 rpm, 5 minutos, 4°C.
22. Descartar sobrenadante e adicionar novamente 1 mL de Stain Buffer em cada tubo e centrifugar a 1200 rpm, 5 minutos, 20 °C.
23. Descartar sobrenadante e ressuspender as células em 500 µL de Stain Buffer.
24. Encapar todos os tubos com papel alumínio
25. Colocar os tubos no isopor com gelo. Se possível, já fazer a leitura ou se não, as células podem ficar 1 hora armazenada no isopor com gelo.
26. Analisar as células no citômetro de fluxo.



Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

BERGAMO, M. T. O. P. *et al.* Angiogenic protein synthesis after photobiomodulation therapy on SHED: a preliminary study. **Lasers Med Sci**, London, v. 35, n. 9, p. 1909–1918, dez. 2020.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. Hoboken: Willey-Blackwell, 2010.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Anal Biochem**, Orlando, v. 159, n. 1, p. 109–113, 1986.

LOURENÇO NETO, N. *et al.* Storage protocol of dental pulp cells from human exfoliated deciduous teeth. **Braz Dent Sci**, São José dos Campos, v. 20, n. 3, p. 126–131, Sept. 2017.



ISBN 978-65-86349-26-9

