



MANUAL DE CULTURA CELULAR:

Fibroblastos

Ana Beatriz Vieira da Silveira
Marel 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. 2

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: Fibroblastos Vol. 2

Bauru

Faculdade de Odontologia de Bauru
Universidade de São Paulo

2025

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

Manual de cultura celular : fibroblastos [recurso eletrônico]
/ Ana Beatriz Vieira da Silveira ... [et al.]. -- Bauru:
Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de
São Paulo, 2025.
v.2, 30 p. : il. ; 31 cm.

Modo de acesso: <https://repositorio.usp.br/item/003248965>

ISBN 978-65-86349-28-3

1. Células. 2. Cultura de células. 3. Fibroblastos. 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

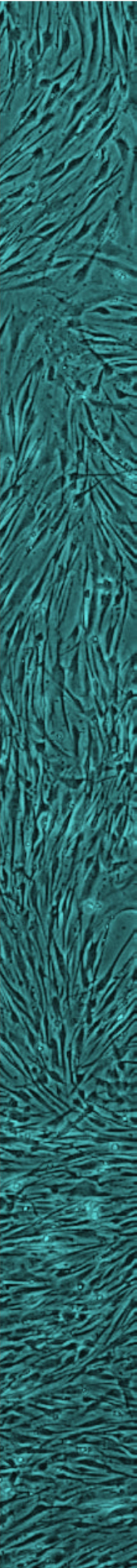
Professora Titular no departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP). Graduada em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Mestre e Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas, 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 Dentes Decíduos: Fibroblastos	7
1.1 Exodontia, Coleta do Tecido Pulpar e Cultura Primária.....	7
1.2 Trocas do Meio de Cultura das Células em Primeira Passagem.....	11
1.3 Subcultivo e Tripsinização	13
1.4 Contagem de Células	17
1.5 Congelamento das Células.....	20
1.6 Descongelamento das Células.....	23
2 Caracterização de Células: Fibroblastos	26
2.1 Técnica Imunofluorescência	26
Bibliografia	30

A vertical strip on the left side of the page shows a microscopic image of cells, likely pulp cells, with a teal/cyan color overlay. The cells are elongated and fibrous, typical of pulp tissue.

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 Dentes Decíduos:

Fibroblastos

1 CULTURA PRIMÁRIA DE DENTES DECÍDUOS: FIBROBLASTOS

1.1 Exodontia, Coleta do Tecido Pulpar e Cultura Primária

No dia anterior: Conferir materiais e soluções; e esterilizar instrumentais.

Soluções – *Descongelar:* medicamentos (Penicilina, Anfotericina B e Gentamicina);

Verificar: DMEM 20% SFB.

Materiais – *Clínica:* Anestésico Tópico; Anestésico Local; Agulha Curta/Extra-curta; Soro Fisiológico; Fio de sutura; Gaze; Alta rotação; Pontas diamantadas esféricas (1014/1015).

Transporte do dente para o laboratório: Isopor com gelo; Tubo Falcon de 15 mL contendo DMEM 20% SFB. *Laboratório:* Lâmina 15c; Pipetas (05 mL/10 mL); Pipetas Pasteur; Ponteiras; Placas de Petri; Tubo Falcon vazio; Garrafa de cultura pequena (T25).

Instrumentais – *Clínica:* Seringa Carpule; Descolador de Molt; Alavancas; Fórceps; Seringa para irrigação; Porta agulha; Tesoura. *Laboratório:* Pinça reta ou *dietrich*; Fórceps; Alveolótomo; Curetas nº 2; Limas (10, 15, 20 e 25); Cabo de bisturi; Porta agulha e Tesoura para tecido.

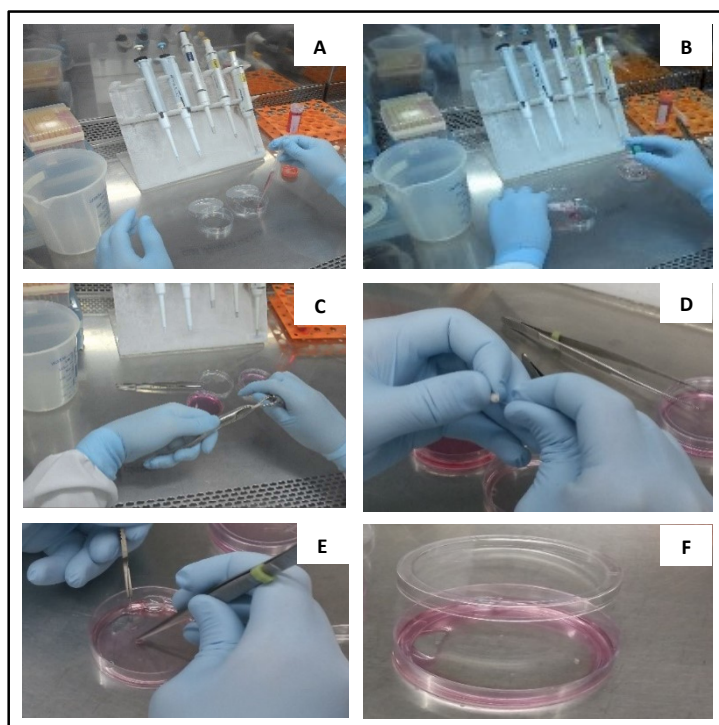
No laboratório

1. Limpar o fluxo com álcool 70%, colocar o descarte dentro do fluxo.
2. Aliquotar com pipeta de 10 mL o PBS em um tubo Falcon de 50 mL e escrever no tubo PBS/Nome do Pesquisador/Data. Assim torna mais fácil o manuseio da solução e evita a contaminação da garrafa de cultura. Fazer o mesmo procedimento para o DMEM 20% SFB, porém em um novo tubo Falcon de 50 mL, adicionar 40 mL de DMEM sem soro + 10 mL Soro Fetal Bovino, nomear e datar o frasco.
3. Colocar a solução de DMEM 20% SFB para aquecer em banho-maria.
4. Levar para a Clínica um tubo Falcon contendo DMEM 20% SFB e um isopor com gelo para transportar o dente da clínica até o laboratório.
5. Na clínica, recolher a assinatura do responsável no TCLE e no Termo de doação de dentes e só após realizar a exodontia do dente doador do tecido pulpar.
6. Limpar o dente com soro e remover resíduos de sangue ou ligamento periodontal.

7. Realizar uma canaleta na junção cimento-esmalte com alta rotação e ponta diamantada esférica.
8. Colocar o dente no tubo Falcon contendo DMEM 20% SFB – acondicionar o tubo no gelo e ir para o laboratório.
9. Lavar as mãos com sabão de Clorexidina, calçar as luvas e trazer o DMEM 20% SFB aquecido para o fluxo laminar.
10. Dentro do Fluxo, abrir uma placa de Petri e despejar nela DMEM 20% SFB (Figura 1-A). Sempre antes de usar uma solução é necessário fazer up-down. Fechar a placa e reservar. Em uma segunda placa de Petri, abrir o tubo Falcon que contém o dente e o meio e despejar um pouco de meio sobre a placa de Petri (Figura 1-B).
11. Clivar o dente na junção cimento-esmalte sobre esta placa – com o auxílio de alveolótomo e fórceps, apoiados na canaleta anteriormente criada (Figura 1-C).
12. Curetar a polpa do dente clivado, com curetas e limas, e colocar na primeira placa de Petri (Figura 1-D).
13. Picotar a polpa com lâmina 15C e tesoura para tecido até atingir os menores pedaços de tecido possíveis (Figura 1-E, F).
14. Nesta placa de Petri, despejar os medicamentos (Figura 2) com o auxílio de uma pipeta e ponteira de 1000 µL, seguindo as seguintes quantidades:
 - 100 µL Anfotericina B;
 - 300 µL Gentamicina;
 - 600 µL Penicilina.
15. Agitar e fechar a placa de Petri para misturar os medicamentos.
16. Levar para incubadora (37 °C; 5% CO₂) por 40 minutos, com a finalidade de deixar os medicamentos agirem.
17. Descartar a primeira placa de Petri contendo o dente clivado ou limpar o dente e armazenar em um novo tubo Falcon para devolver o dente para o responsável/criança, conforme combinado anteriormente.
18. Enquanto a placa está na incubadora, nomear a garrafa pequena de cultura (T25):
 - HPF (nome do paciente); data; nome do pesquisador.
19. Após os 40 minutos, tirar a placa de Petri da incubadora e retornar ao fluxo.
20. Colher todo conteúdo de meio de cultura mais células da placa de Petri e despejar em um tubo Falcon de 15 mL utilizando pipeta Pasteur ou um pipetador automático e pipeta de 5 mL.
21. Colocar um pouco mais de DMEM 20% SFB na placa de Petri, colher o restante de tecido e despejar no tubo Falcon de 15 mL.

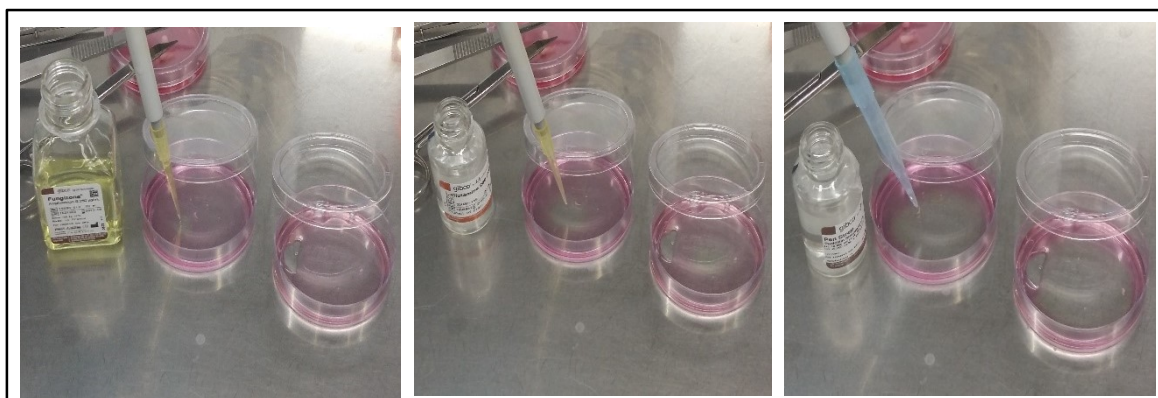
22. Completar este tubo Falcon de 15 mL até 12 mL com DMEM 20% SFB.
23. Levar para centrifugar: 20 °C; 1200 rpm; 5 minutos; ~9 (accel/brake).
24. Após a centrifugação, será observado no fundo do tubo Falcon o pellet (massa de células concentradas no fundo do tubo Falcon após centrifugação).
25. Retornar ao fluxo e descartar o sobrenadante (meio) com uma virada rápida e cuidadosa do tubo Falcon, sem descolar o pellet do tubo, que ficará aderido ao fundo do tubo Falcon.
26. Fazer a ressuspensão do Pellet em um novo meio, para tanto adicionar, com auxílio de uma pipeta, 1000 µL de DMEM 20% SFB neste tubo Falcon contendo o pellet. Fazer up-down na solução com a pipeta para que todo o pellet se desprenda do tubo Falcon e seja ressuspendido no meio de cultura adicionado.
27. Colher todo conteúdo ressuspendido (meio de cultura + tecido) e colocar no fundo da garrafa T25.
28. Adicionar, novamente, mais 1000 µL de DMEM 20% SFB no tubo Falcon e colher o conteúdo restante, e despejar no fundo da garrafa T25. Na garrafa pode ter de 1 a 3 mL de meio de cultura.
29. Mexer a garrafa com movimentos de "infinito" (8 deitado) para espalhar o meio e os pedaços de tecido.
30. Levar a garrafa com a tampa rosqueada completamente para incubadora se for garrafa com filtro (Código: 430639; CORNING - frasco para cultura celular com filtro, área 25 cm²), porém se o frasco de cultura for sem filtro, então é necessário dentro da incubadora desrosquear a tampa até o 1º "click" para que ocorra troca de ar (Código: 430168; CORNING; frasco para cultura celular sem filtro, área 25 cm²).
31. Deixar por 48 horas na incubadora para adesão dos tecidos na garrafa, mas observar, e caso o meio esteja raso ou em véspera do fim de semana, completar com 100-200 µL DMEM 20% SFB.
32. Após esse período, o meio deve ser trocado 2 vezes por semana, ou seja, de 3 em 3 dias.

Figura 1 – Cultura Primária de Células – Obtenção e preparo do tecido pulpar



Fonte: Elaborada pelos autores

Figura 2 – Cultura Primária de Células – Adição dos medicamentos ao meio de cultura com os fragmentos de tecido

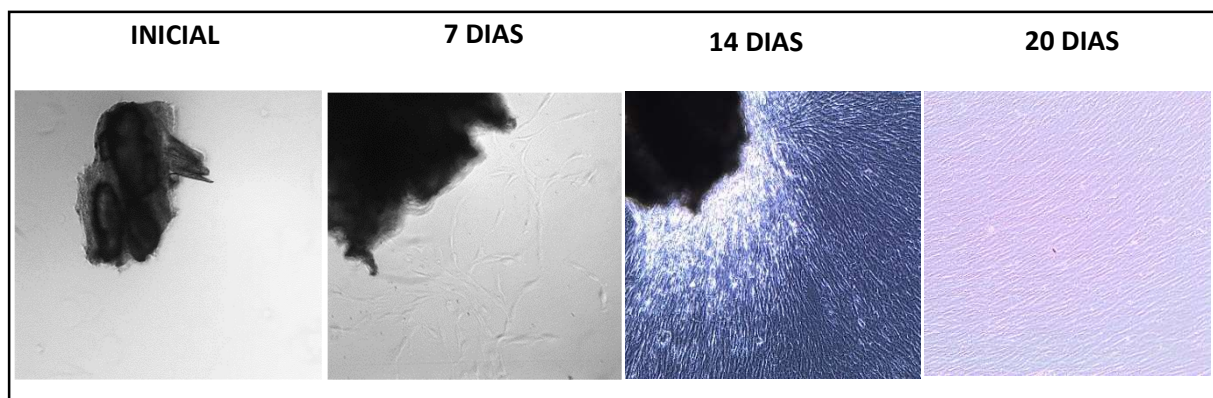


Fonte: Elaborada pelos autores

1.2 Trocas do Meio de Cultura das Células em Primeira Passagem

1. Programar os dias em que serão realizadas as trocas do meio, sempre de 3 em 3 dias.
2. Limpar o fluxo com álcool 70%, colocar o descarte dentro do fluxo.
3. Colocar o tubo Falcon de DMEM 20% SFB para aquecer em banho-maria.
4. Tirar a garrafa da incubadora. Se a tampa da garrafa for sem filtro: não esquecer de rosquear bem a tampa antes de tirá-la, caso contrário não precisa rosquear.
5. No microscópio, observar a adesão dos pedaços de tecido a garrafa.
6. Levar o tubo Falcon com DMEM 20% SFB aquecido e a garrafa para o fluxo.
7. Abrir o tubo Falcon com DMEM 20% SFB e a garrafa de células.
8. Retirar o meio da garrafa com a pipeta de 1000 μ L ou pipeta de 5 mL: inclinar um pouco a garrafa e remover o máximo possível de meio antigo, sem encostar nos tecidos, tomando cuidado para não os remover; não é possível remover todo meio nesta etapa.
9. Com outra pipeta de 1000 μ L ou outra pipeta de 5 mL, pegar 1-3 mL de DMEM 20% SFB e despejar na garrafa vagorosamente. Colocar o meio com cuidado, de preferência no canto da garrafa.
10. Fechar a tampa da garrafa, mexer com cuidado com movimentos de "infinito" (8 deitado).
11. Levar a garrafa com a tampa rosqueada completamente para incubadora se for garrafa com filtro, porém se o frasco de cultura for sem filtro, então é necessário desrosquear a tampa, dentro da incubadora até o 1º "click", para que ocorra troca de ar.
12. Durante as trocas do meio de cultura, acompanhar a garrafa para observar a liberação de células a partir do tecido. O acompanhamento da técnica de explante foi feito por 20 dias (Figura 3).

Figura 3 – Cultura Primária de Células – Técnica Explante Primário



Fonte: Elaborada pelos autores

Observação:

- A cada troca de meio **observar as garrafas no microscópio invertido**; a fim de notar se os pedaços de tecido começaram a soltar células, e se há ou não contaminação.
- As células têm formato de “agulhas brilhantes” e são observadas próximas aos pedaços de tecido, que tem cor marrom e extremidades brilhantes.
- Manter a troca do meio de cultura das garrafas *2 vezes por semana* até obter subconfluência da garrafa (grande quantidade de células aderidas ao fundo da garrafa).
- Quando não houver mais espaço para a proliferação das células dentro da garrafa pequena, deverá ser feita a passagem para a garrafa média T75 (Código: 430641; CORNING; frasco para cultura celular com filtro, área 75 cm²) - Essa ação corresponde a 1ª passagem das células.
- Todas as vezes que as células passam de uma garrafa para outra, visando sua expansão e proliferação, mantendo a linhagem celular, chama-se passagem.

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 materiais e soluções.

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

Verificar: tubo Falcon com DMEM 20% SFB e DMEM 10% SFB; Falcon com PBS 1x (Quantidade de uso é 5 mL).

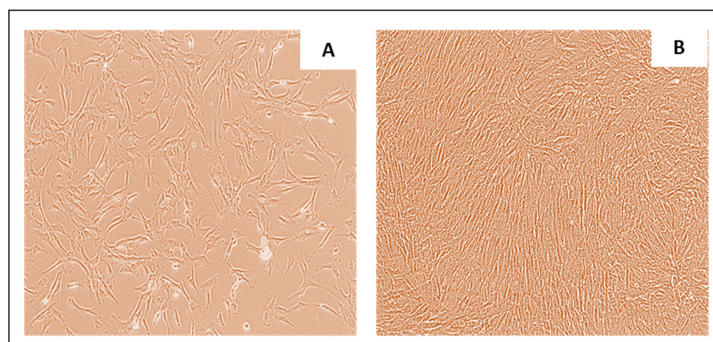
Materiais – *Laboratório:* Pipetas de 0,5 mL/10 mL; pipetas Pasteur; Ponteiras; Tubo Falcon vazio; Garrafa T75 para cultura.

1. Limpar o fluxo com álcool 70%, colocar o descarte dentro do fluxo.
2. Colocar tubo Falcon de DMEM 20% SFB, tubo Falcon de DMEM 10% SFB, tubo Falcon de PBS 1x, e tubo Falcon com a Tripsina para aquecer em banho-maria.
3. Tirar a garrafa da incubadora.
4. Observar a garrafa no microscópio invertido e fotografar – conferir se as células estão em subconfluência (com pouco espaço para proliferação) ou confluência (Figura 4).
5. Levar as soluções aquecidas e a garrafa para o fluxo.
6. Retirar o meio da garrafa com a pipeta de 1000 µL ou pipeta de 5 mL: inclinar um pouco a garrafa e remover o máximo possível de meio antigo.
7. Colocar 2-3 mL de PBS 1 x no fundo da garrafa com outra pipeta de 1000 µL ou 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.
8. Em seguida, com uma nova pipeta adicionar 2 mL ou 2000 µL de Tripsina pura se for na garrafa T25, se for na T75 adicionar 3 mL ou 3000 µL de Tripsina pura.
9. Tampar a garrafa e levar à incubadora por 20 minutos.
10. Enquanto a garrafa está na incubadora, pegar a garrafa média de cultura (T75) e nomear: HPF (nome do paciente); **1ª passagem**; data da passagem; nome do pesquisador.
11. Adicionar mais 10 mL de DMEM 10% SFB na garrafa T75.
12. 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").

13. Podemos bater na lateral da garrafa para desprender células que ainda estejam aderidas.
14. Conferir no microscópio se as células estão completamente desprendidas da garrafa.
15. Adicionar 2-3 mL de DMEM 20% SFB para inativar a tripsina – sempre a mesma quantidade de tripsina adicionada anteriormente.
16. Colher todo conteúdo da garrafa com a pipeta de 5 mL ou pipeta Pasteur, varrendo o fundo dela cerca de 2-3 vezes previamente.
17. Transferir todo conteúdo para um tubo Falcon 15 mL; completar com DMEM 20% SFB até completar 12 mL.
18. Levar para centrifugar: 20 °C; 1200 rpm; 5 minutos; ~9 (accel/brake).
19. Após a centrifugação, será observado no fundo do tubo Falcon o pellet.
20. 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.
21. Adicionar, com auxílio da pipeta, 1000 µL de **DMEM 10% SFB** neste tubo Falcon contendo o pellet.
22. Ressuspender o pellet – batendo com o dedo na extremidade do tubo e fazer up-down na solução com a pipeta.
23. Colher todo conteúdo ressuspendido (meio+tecido) e colocar no fundo da garrafa *média*.
24. Mexer a garrafa com movimentos de "infinito" (8 deitado) para espalhar o meio e as células.
25. Levar a garrafa para a incubadora.
26. Após o processo de tripsinização, essa nova garrafa deverá ter a troca do meio de cultura no dia seguinte, a fim de remover células mortas; e a troca deve ser mantida em 2 vezes por semana. Se no dia seguinte à tripsinização houver muitas células mortas pode lavar a garrafa com PBS previamente à troca do meio.

Figura 4 – Células em Subconfluência (A) e Confluência (B) na garrafa T75



Fonte: Elaborada pelos autores

Trocas do Meio de cultura após a 1ª passagem

1. Limpar o fluxo com álcool 70%, colocar o descarte da cultura dentro do fluxo.
2. Aliquotar DMEM 10% SFB em tubo Falcon de 50 mL, sendo 45 mL de DMEM e 5 mL de SFB. Em seguida pôr o tubo Falcon para aquecer em banho-maria.
3. Tirar a garrafa da incubadora e se necessário fotografar.
4. Observar a garrafa no microscópio: conferir a morfologia das células, se estão em proliferação e se não há contaminação.
5. Levar o DMEM 10% SFB aquecido e a garrafa para o fluxo.
6. Retirar todo meio de cultura da garrafa com uma pipeta de 10 mL. Descartar a pipeta (Figura 5).
7. Com outra pipeta de 10 mL, adicionar 10 mL de DMEM 10% SFB na garrafa com cuidado. Colocar o meio com cuidado, de preferência no canto do frasco de cultura (Figura 5).
8. Fechar a garrafa, mexer com cuidado e com movimentos de “infinito” (8 deitado).
9. Levá-la para incubadora.

Figura 5 – Troca do Meio de Cultura na garrafa T75



Fonte: Elaborada pelos autores

MUITO IMPORTANTE:

- A cada troca de meio observar e/ou fotografar as garrafas no microscópio invertido para notar se estão em proliferação e se há contaminação.
- Manter a troca de meio de cultura das garrafas *2 vezes por semana ou no máximo 3*, até obter subconfluência da garrafa.
- Quando não houver mais espaço para a proliferação das células dentro da garrafa média, deverá ser feita a passagem para outras garrafas médias.
- O ideal para o experimento é que as células estejam entre a 4ª e 8ª passagem, se for cultura primária.

1.4 Contagem de Células

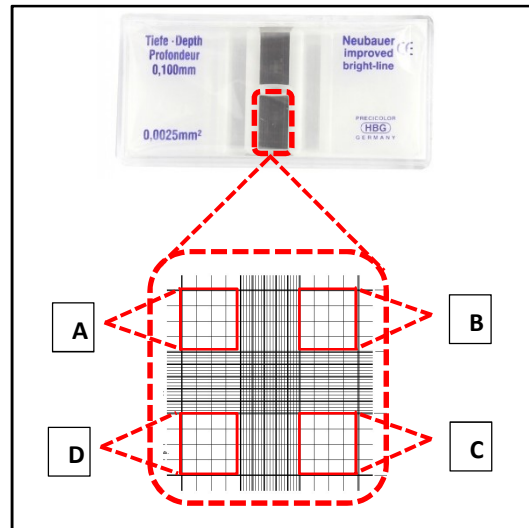
Soluções – Turk - azul de tripan

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



Fonte: Elaborada pelos autores

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

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

$73,25 \times 10^5 \text{ --- } 1000 \text{ } \mu\text{L (1 mL ressuspensão)}$

$2 \times 10^5 \text{ ---- } x = 27 \text{ } \mu\text{L/garrafa}$

Figura 7 – Contagem de células usando a solução de Azul de Tripan



Fonte: Elaborada pelos autores

1.5 Congelamento das Células

No dia anterior: Conferir soluções e materiais.

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

Verificar: DMEM 10% e 20% SFB; PBS 1x (5-10 mL); Meio de Congelamento (DMSO; SFB; DMEM 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: DMEM 1%AB (65%); 2º - SFB (30%); 3º - DMSO (5%).
2. Dentro do Fluxo separar as ponteiras de 1000µL e a pipeta de 10 mL e o tubo Falcon de 50 mL e tubos Falcon de 15 mL
3. Em um tubo Falcon de 50 mL, adicionar: 32500 µL DMEM 1%AB + 15000 µL SFB + 2500 µL DMSO. Fazer up and down.
4. Aliquotar em 2 tubos Falcon de 15 mL: Solução de Congelamento fibroblasto, colocar a data e nome do operador.
5. 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 a mesma quantidade de meio que foi adicionada de Tripsina. Assim, adicionar 6 mL de DMEM 10% 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 DMEM 10% 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 µL 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 µL de **DMEM 10% SFB** neste tubo Falcon contendo o pellet. Porém, se for maior adicionar de 2 – 3 mL.

21. Ressuspender o pellet – batendo com o dedo na extremidade do tubo e fazer up-down na solução com a pipeta de 1000 µL.
22. No microtubo preparado com 180 µL Turk – azul de tripan adicionar 20 µL células ressuspensas (diluídas 10x – 200 µL solução= 20 µL células + 180 µL azul de tripan).
23. Coletar 10 µL 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 $\rightarrow 73,25 \times 10^5 = 7,325 \times 10^6$ células $\sim 7 \times 10^6$ células = 7 vials com 1×10^6 /vial
30. Seguindo o exemplo acima, ressuspender o pellet em 7 mL de solução de congelamento
31. Colocar 1 mL desta solução de células nos microtubos de congelamento
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:* DMEM 10%; PBS 1X (5-10 mL);

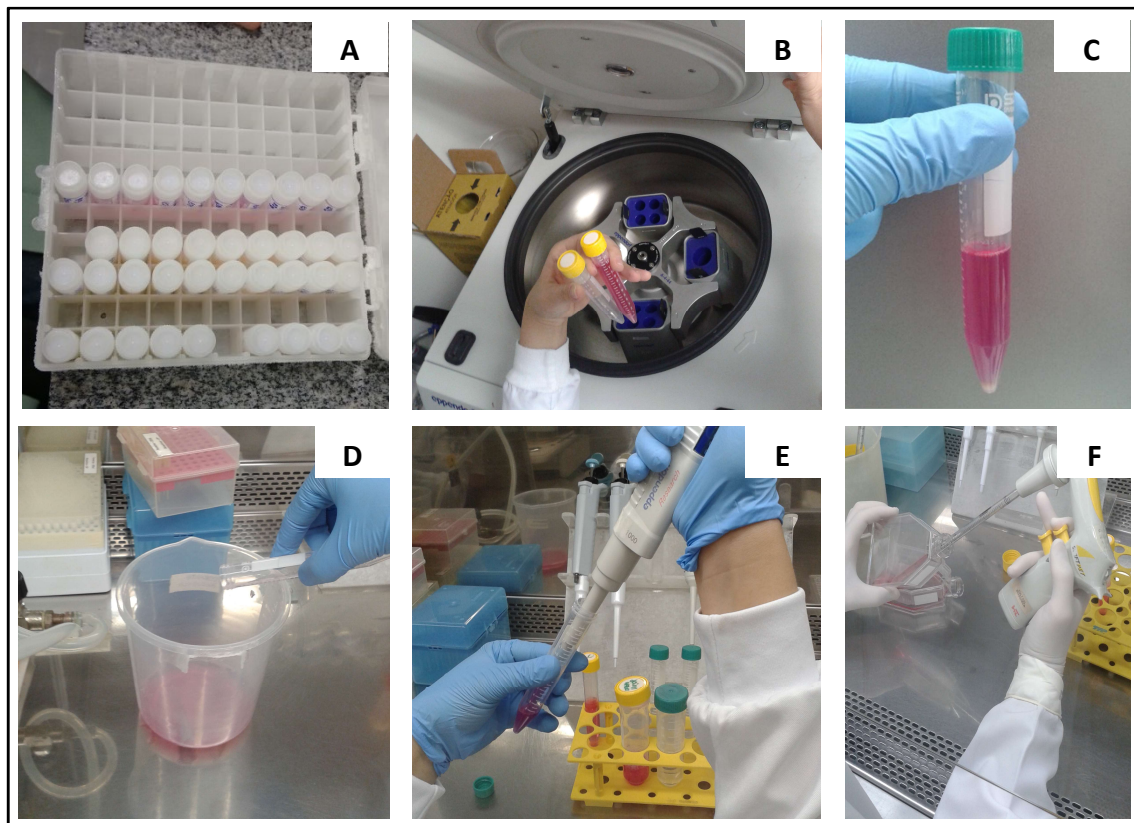
Materiais– *Laboratório:* Pipetas (10 mL); Ponteiras; Tubo Falcon vazio; Garrafas médias para cultura (T75).

Experimento

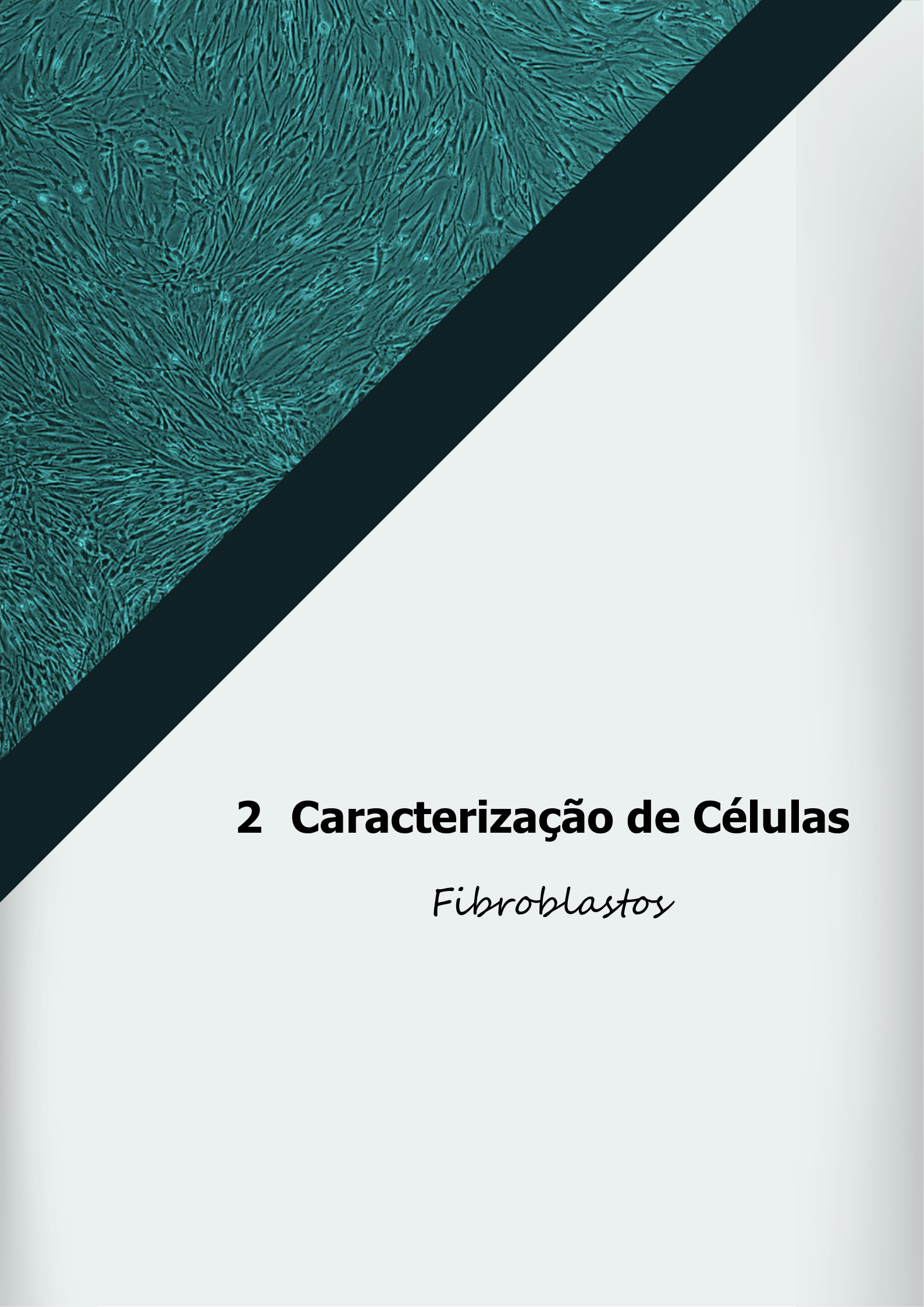
1. Limpar o fluxo com álcool 70%, colocar o descarte dentro do fluxo.
2. Colocar PBS 1X, para aquecer em banho-maria.
3. NÃO aquecer DMEM 10% SFB – será usado gelado para o descongelamento
4. Tirar vial congelado do tambor de nitrogênio ou do freezer -80°C. Verificar a identificação e passagem das células (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 DMEM 10% 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.
33. Levar o tubo Falcon com a solução de células para centrifugar à 20 °C; 1200 rpm; 5 minutos; ~9 (accel/brake). Realizar 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)
7. Enquanto isso no fluxo, preparar a(s) garrafa(s): identificar a linhagem celular, a passagem (mesma passagem vial descongelado) e o nome do pesquisador.
8. Retirar o tubo Falcon da centrífuga, observar a formação do pellet (Figura 8-C) e retornar para o fluxo.
9. Descartar todo meio do tubo que contém o pellet (Figura 8-D), e ressuspender o pellet em DMEM 10% 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 ressuspendido em 2 mL.
10. Adicionar 9 mL de DMEM 10% SFB em cada garrafa. Colocar 1 mL da solução com células ressuspendidas em cada garrafa e movimentá-la levemente (Figura 8-F).
11. Levar a(s) garrafa(s) para estufa para adesão e posterior expansão.
12. Após 24 horas: remover todo o meio e lavar com PBS 1x; em seguida trocar o meio

DMEM 10% SFB a cada 48 horas. Até a garrafa entrar em subconfluência e ter a quantidade de células necessárias para fazer o experimento.

Figura 8 – Descongelamento, Centrifugação e Expansão das Células



Fonte: Elaborada pelos autores



2 Caracterização de Células

Fibroblastos

2 CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS: FIBROBLASTOS

2.1 Técnica Imunofluorescência

Soluções:

Preparar no dia:

Paraformaldeído 4% em PBS 4X – solução para fixar as células.

- Comprado como Paraformaldeído 16% congelado a -20°C, descongelar e diluir para 4% em PBS 4x fresco.

OBS.: Após descongelar não recongelar.

Solução Paraformaldeído 4% (10 mL): 2,5 mL Paraformaldeído 16% + 7,5 mL PBS 4x.

Preparar na semana:

Cloreto de amônio (NH₄Cl) 50 mmol – solução neutralizadora da autofluorescência do paraformaldeído.

PBS BSA 0,2% (Albumina de soro bovino) – solução incubadora/diluição do anticorpo.

PBS BSA 3% – solução de bloqueio. *Exemplo: 3 g/100 mL - 50 mL/1,5 g.*

Solução Álcool absoluto/éter 1:1 – solução para lavar as lamínulas:

Exemplo: 25/25= 50 mL.

Soluções em uso no laboratório:

PBS 1x – solução tampão para lavagem./

PBS 4x – solução para diluição do Paraformaldeído 4%.

A) Anticorpo primário (Anti-FSP) – não colocar nos poços controles negativos.

- Comprado a 4°C; mas para estocar além de 2 semanas indica-se guardar a -20°C.
- Centrifugar para não precipitar.
- Fazer up-down antes de aliquotar o anticorpo.
- Não colocar nos poços controles.

- Fazer a diluição do anticorpo em 100x PBS BSA 0,2%:

1500 µL de PBS BSA 0,2% + 15 µL de anticorpo.

Exemplo: 6 poços + (2 controles) – 250 µL da solução PBS BSA 0,2% + anticorpo 100x → 1500 µL (250 µL/poço) da solução PBS BSA 0,2% + 15 µL de anticorpo + (250 µL da solução PBS BSA 0,2%/poço controle).

B) Anticorpo Secundário – Todos os poços.

- diluição em 1:500 PBS BSA 0,2%:

2000 µL (2 mL) da solução PBS BSA 0,2% + 4 µL de anticorpo.

6 poços + 2 controles: **8 poços** – 250 µL/poço da solução PBS BSA 0,2% .

2000 µL da solução PBS BSA 0,2% → diluição 1:500 → $2000 \mu\text{L}/500 = 4 \mu\text{L}$.

Anticorpos: 1 - Vórtex.

2 - Centrífuga por 1 minuto.

3 - Fazer up-down para aliquotar o anticorpo.

4 - Preparar diluição em PBS BSA 0,2%.

1500 µL PBS BSA 0,2% + 15 µL anticorpo primário – diluição 100x

2000 µL PBS BSA 0,2% + 4 µL anticorpo secundário – diluição 1:500

5 - Vórtex.

Microscópio de fluorescência: Laser vermelho 635 nm/ infravermelho 656-765 nm.

Experimento Caracterização:

Dia 1

Plaqueamento das células

- chamber slide 1×10^3 célula/poço + 200 µL DMEM 10%.

- “Overnight” para adesão celular.

Dia 2

Fixação das células para marcação – Anticorpo primário

1 - Remover todo meio de cultura e lavar com *PBS 1x (gelado)* – Volume suficiente para cobrir as células no poço. Aspirar todo PBS.

2 - Acrescentar *Paraformaldeído 4%* $\approx 250 \mu\text{L/poço}$. Não jogar diretamente nas células. Jogar na parede do poço. Aguardar 15 minutos para fixação das células.

3 - Remover Paraformaldeído. Colocar *cloreto de amônio* (250 µL/poço) - 15 minutos.

- 4 - Remover todo cloreto de amônio. Acrescentar *PBS BSA 3%* - Volume suficiente para cobrir as células no poço. Lavar 3 vezes por 5 minutos.
- 5 - Remover todo PBS BSA 3%. Acrescentar solução 250 µL da solução *PBS BSA 0,2% + anticorpo primário diluído 100x* nos poços da "chamber slide", exceto nos poços controle.
- 6 - Armazenar "overnight" na geladeira. Colocar em um recipiente com gaze úmida para evitar o ressecamento.

Dia 3

Fixação das células para marcação – Anticorpo secundário

- 1 - Lavar poços com PBS 1x 3 vezes por 5 minutos – Volume suficiente para cobrir as células no poço.
- 2 - Enquanto isso, lavar as lamínulas que irão cobrir a lâmina na *solução álcool/éter* e deixar secando no papel toalha. OBS.: Dividir a lamínula em 2 partes (20 x 20 mm) para evitar a formação de bolhas.
- 3 - Remover todo PBS 1x. Acrescentar PBS BSA 3% por 5 minutos (solução de bloqueio) – Volume suficiente para cobrir as células no poço.
- 4 - Preparar o anticorpo secundário: *PBS BSA 0,2% + anticorpo secundário diluído 1:500*.
- 5 - Remover PBS BSA 3% de todos os poços e acrescentar 250 ul/poço da solução de anticorpo secundário.
- 6 - Armazenar no papel alumínio por $\approx$ 1 hora (máximo 2 horas).
- 7 - Após 1 hora/1:30 hora, remover a solução contendo o anticorpo secundário.
- 8 - Lavar com PSB BSA 1x 3 vezes por 5 minutos. Remover todo PBS 1x.
- 9 - Retirar a lâmina.
- 10 - Retirar o excesso das soluções com papel toalha (úmido).
- 11 - Pingar uma gota ($\approx$ 5 µL) do meio de montagem com DAPI (*VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI*).
- 12 - Encaixar lamínulas (divididas em 2 partes para evitar bolhas).
- 13 - Após encaixar colocar 1 gota de *base de unhas (esmalte)* em cada extremidade.
- 14 - Aguardar secar o esmalte e, em seguida, selar toda lamínula. Não deixar extremidade sem esmalte, mas sem excesso.
- 15 - Deixar secar bem ($\approx$ 2 horas). Dura $\approx$ 1 semana.
- 16 - Armazenar na geladeira protegido da luz (papel alumínio). Cuidado para não virar.



Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

BERGAMO, M. T. O. P. *et al.* Angiogenic protein synthesis after photobiomodulation therapy on SHED: a preliminary study. **Lasers in Medical Science**, 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. **Analytical Biochemistry**, 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. **Brazilian Dental Science**, São José dos Campos, v. 20, n. 3, p. 126–131, Sept. 2017.

ISBN 978-65-86349-28-3

FOB USP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

