

MANUAL DE CULTURA CELULAR:

Soluções, Contaminações e Recursos

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. 1

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: soluções, contaminações e recursos Vol. 1

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, dispondo-se a possíveis acertos posteriores caso, inadvertidamente e involuntariamente, a identificação de alguns deles tenha sido omitida.

Manual de cultura celular : soluções, contaminações e recursos [recurso eletrônico] / Ana Beatriz Vieira da Silveira ... [et al.]. -- Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo, 2025.
v.1, 31 p. : il. ; 31 cm.

Modo de acesso: <https://repositorio.usp.br/item/003248957>

ISBN 978-65-86349-27-6

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

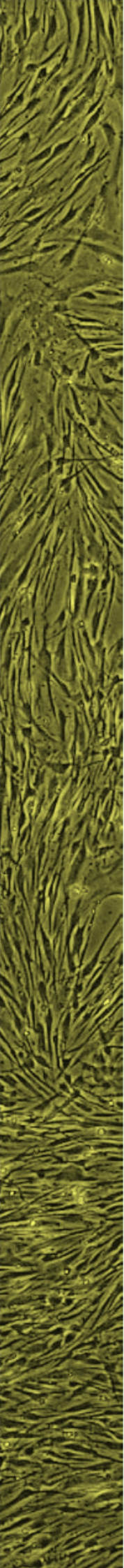
Professora Titular no departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP). Graduada em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Mestre e Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas,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

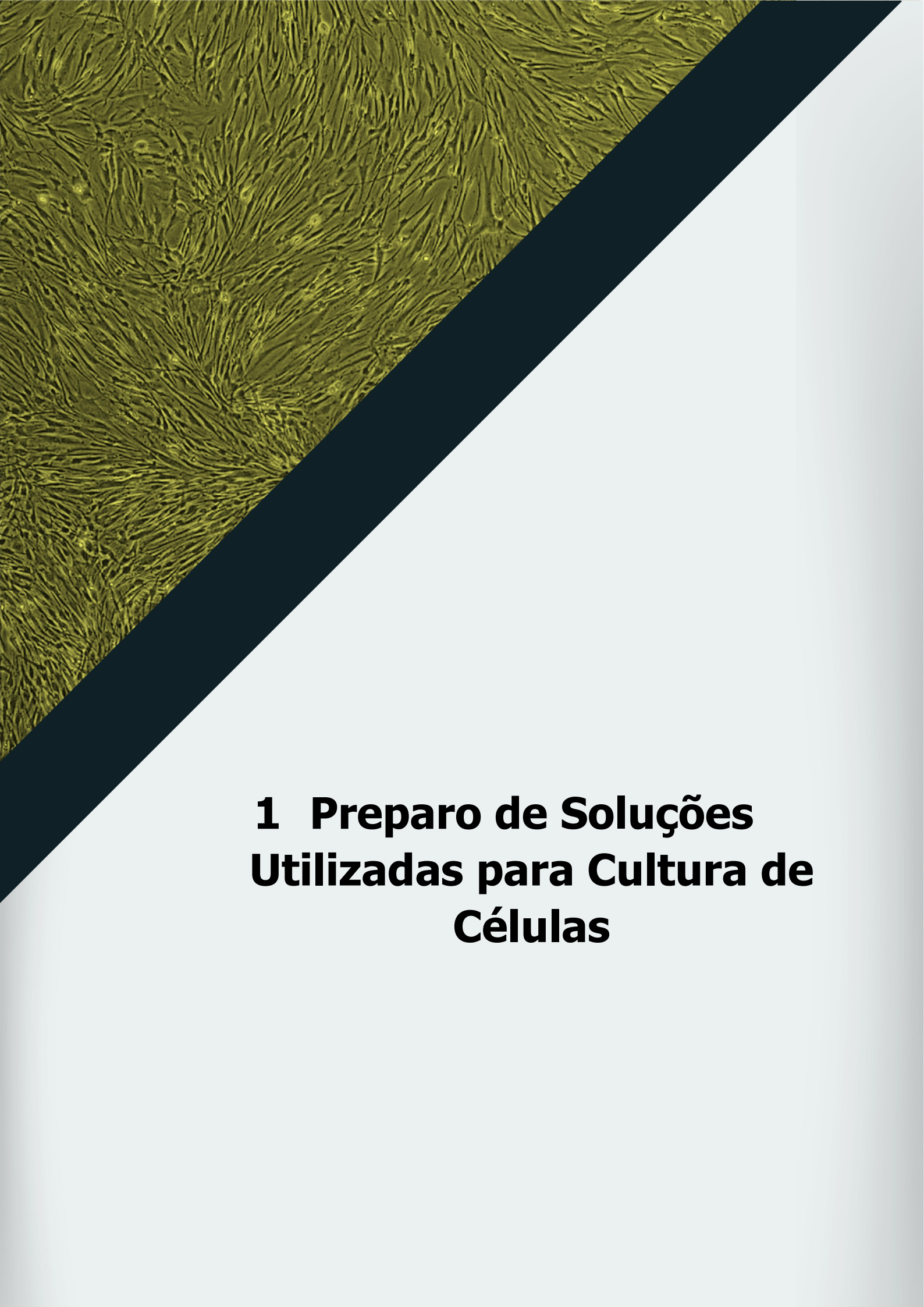
SUMÁRIO

Apresentação.....	5
1 Preparo de Soluções Utilizadas para Cultura de Células	7
1.1 Meio de Cultura – DMEM.....	7
1.2 Meio de Cultura – AMEM.....	10
1.3 Soro Fetal Bovino (SFB)	12
1.4 Meio de Cultura Suplementado	13
1.5 Meio de Transporte e Descontaminação.....	14
1.6 Tampão Fosfato-Salino (PBS)	15
1.7 Meio Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS).....	17
1.8 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	19
1.9 Collagenase.....	19
1.10 Dispase	21
2 Cuidados para Evitar a Contaminação de Células	24
3 Recursos.....	27
3.1 Equipamentos	27
3.2 Instrumentais.....	27
3.3 Plásticos.....	28
3.4 Materiais de Consumo Diversos	28
3.5 Soluções e Medicamentos	28
3.6 Limpeza	29
Bibliografia.....	31

A vertical strip on the left side of the page shows a microscopic image of cells, likely pulp cells, with a textured, fibrous appearance in shades of green and yellow.

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.

A microscopic image of cells in culture, showing a dense, fibrous network of cells. The image is split diagonally by a dark blue line. The top-left portion shows the cell culture, while the bottom-right portion is a solid dark blue background.

1 Preparo de Soluções Utilizadas para Cultura de Células

1. PREPARO DE SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA CULTURA DE CÉLULAS

1.1 MEIO DE CULTURA - DMEM

Dulbecco's modified Eagle's medium (COD-31600-034) - Gibco, Thermo Fisher Scientific Brazil, São Paulo, Brasil.

No dia anterior: Conferir materiais e soluções; e esterilizar garrafa de vidro (para armazenamento do meio de cultura).

Soluções – *Descongelar:* medicamentos (Penicillin-Streptomycin, 10,000 U/mL, Thermo Fisher Scientific);
– *Verificar:* DMEM (Referência 31600-026, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO); ácido clorídrico (HCl); hidróxido de sódio (NaOH); bicarbonato de sódio (NaHCO₃).

Materiais – *Laboratório:* pipetas Pasteur; pipetas sorológicas (5 e 10 mL); balão; funil de vidro; Becker; garrafa de vidro; pHmêtro; barra magnética “peixinho”; agitador magnético; balança; sistema de filtração à vácuo descartável estéril.

Preparo:

1. No laboratório, para usar a balança de precisão é preciso limpá-la com o auxílio de um pincel (varrer a balança); em seguida pesar o recipiente onde será depositado o pó, fechar os vidros e apertar o botão *Tara*, para que o valor do recipiente seja desconsiderado do valor total e somente o peso do pó de bicarbonato de Sódio seja mensurado. Abrir o vidro e adicionar o pó de bicarbonato de sódio até completar 3,7 g. Para tanto, os vidros da balança de precisão precisam estar fechados. Reservar o bicarbonato de Sódio.
2. Em um Becker, adicionar aproximadamente 700-800 mL de água Milli-Q (ultrapura); e levar o recipiente ao agitador magnético, dentro do Becker adicionar a barra magnética “peixinho”.
3. Despejar o DMEM (pó) na água Milli-Q; adicionar um pouco de água Milli-Q no envelope para pegar o pó que restar. Manter o agitador ligado para dissolver a solução.
4. Adicionar 3,7 g de bicarbonato de sódio; deixar dissolver.

5. Transferir o conteúdo para uma proveta, adicionar água Milli-Q até completar $\approx 970-990$ mL. Pode utilizar o Balão, neste caso completar até próximo do "risco" (próximo de 1 L).
6. Retornar a solução para o Becker para o *ajuste do pH*, com o auxílio do pHmêtro.
7. É necessário padronizar o pHmêtro antes de usá-lo. Assim, ligar o pHmêtro (atenção na voltagem da tomada) – dados operacionais do pHmêtro da Farmacologia.
8. Deixar o descarte próximo, para lavar a ponta do pHmêtro (Becker pequeno).
9. Remover a borracha da ponta do pHmêtro (solução de descanso – KCl).
10. Lavar a ponta do pHmêtro com água Milli-Q, para fazer a calibração.
11. Apertar o botão "mode" para ir à opção pH e apertar "enter".
12. Então selecionar "set up" para ir no "clear" e apertar "enter".
13. Colocar a ponta do pHmêtro na solução de pH padrão 4. Apertar "standardize" e aguardar a calibração". Remover a ponta da solução e lavar novamente com água Milli-Q. Colocar a ponta no pH padrão 7 e apertar "standardize". Remover a ponta da solução e lavar novamente com água Milli-Q. As soluções de pH padrão (4 e 7) ficam nos tubos ao lado do pHmêtro. Agitar as soluções padrão antes de usar.
14. Em seguida, verificar o pH da solução que está sendo preparada no agitador. Para isto, colocar a ponta do pHmêtro no líquido DMEM, apertar "enter" e aguardar estabilizar o valor do pH (*exemplo*: pH=8,0).
15. O pH ideal é 7,4. Mas o *pH deve ser ajustado entre 6,8-7,0*, pois durante a filtração sobe para 7,4. Para ajustar o pH, gotejar a solução de HCl (10M) para tornar o meio ácido ou NaOH (10M) para tornar o meio mais básico. Gotejar aos poucos com o auxílio da pipeta de Pasteur e sempre esperar estabilizar o valor do pH no aparelho (aparece a letra S no painel do aparelho).
16. Após atingir o pH ideal, remover a ponta do pHmêtro da solução, lavar com água Milli-Q e cobrir a ponta do pHmêtro novamente com a borracha contendo solução de descanso.
17. Retornar a solução com o pH ajustado para a proveta ou balão e completar 1 L

com água Milli-Q.

18. Cobrir o vidro contendo a solução (papel alumínio) e levar para o *fluxo*, onde o meio será filtrado. Nunca esquecer de limpar o fluxo e a parte externa do balão previamente com álcool 70%.
19. Dentro do fluxo, abrir os pacotes da garrafa de vidro estéril e do filtro.
20. Conectar a mangueira da bomba a vácuo na lateral do filtro.
21. Despejar a solução do Becker aos poucos dentro da parte superior do filtro.
22. A solução filtrada que fica na parte inferior do filtro, deve ser levada a garrafa de vidro. Repetir o processo até filtrar todo líquido. Em seguida, descartar o filtro.
23. Na garrafa de vidro com meio filtrado adicionar Antibiótico: 1% - 10 mL de penicilina em 1 L de meio com a pipeta sorológica.
24. Tampar a garrafa de vidro, colocar fita para vedar ("parafilm"). Identificar a solução: DMEM 1% AB (DMEM puro com 1% de antibiótico). Data/ nome do pesquisador/ pH. Validade: 90 dias.
25. Em seguida, armazenar a garrafa contendo meio de cultura na geladeira.

1.2 MEIO DE CULTURA - AMEM

αMEM com L glutamina e nucleosídeos em pó (Código 11900024) - Life Technologies

Soluções – *Descongelar:* medicamentos (Penicilina);

– *Verificar:* αMEM (pó); NaHCO₃ (sal).

Materiais – Recipiente para pesagem dos sais; pipetas Pasteur; ponteiras; balão; funil de vidro; Becker; garrafa de vidro estéril; pHmêtro; barra magnética “peixinho”; agitador magnético; balança; sistema de filtração a vácuo descartável.

Preparo

Para 1 litro de meio de cultura:

1. Pesar 2,2 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) na balança de precisão;
2. Antes de utilizar a balança, limpar com o pincel (varrer a balança); colocar o recipiente onde será depositado o pó, fechar os vidros (inclusive em cima) e apertar o botão *Tara*. Abrir o vidro e adicionar pó de bicarbonato de sódio até completar 2,2 g (vidros fechados);
3. Adicionar aproximadamente 700-800 mL de água Milli-Q (ultrapura) no Becker; e levar o recipiente ao agitador magnético com a barra magnética “peixinho” dentro do Becker;
4. Despejar o αMEM (pó) na água Milli-Q; adicionar um pouco de água Milli-Q no envelope para pegar o pó que restar. Manter o agitador ligado para dissolver a solução;
5. Adicionar 2,2 g de bicarbonato de sódio; deixar dissolver;
6. Transferir o conteúdo para uma proveta, adicionar água Milli-Q até completar ≈970-990 mL. Pode utilizar o Balão, neste caso completar até próximo do “risco” (próximo de 1 L);
7. Retornar a solução para o Becker para o *ajuste do pH* com o pHmêtro;
8. Ajustar o pHmêtro, colocar a ponta do pHmêtro na solução de pH padrão 4 e 7, apertar “standardize” e aguardar a calibração;

9. Remover a ponta da solução e lavar com água Milli-Q;
10. Em seguida, verificar o pH da solução que está sendo preparada no agitador. Para isto, colocar a ponta do pHmêtro no líquido αMEM, apertar "enter" e aguardar estabilizar o valor do pH;
11. O pH ideal é 7,4. Mas o *pH deve ser ajustado entre 6,8-7,0*, pois durante a filtração sobe para 7,4. Para ajustar o pH, gotejar a solução de HCl (10M) para tornar o meio ácido ou NaOH (10M) para tornar o meio mais básico;
12. Após atingir o pH ideal, remover a ponta do pHmêtro da solução, lavar com água Milli-Q e cobrir a ponta do pHmêtro novamente com a borracha contendo solução de descanso;
13. Retornar a solução (pH ajustado) para a proveta ou balão e completar 1 L com água Milli-Q;
14. Cobrir a boca do vidro contendo a solução com papel alumínio e levar para o *fluxo*, onde o meio será filtrado;
15. Dentro do fluxo, abrir os pacotes da garrafa de vidro estéril e do filtro;
16. Conectar a mangueira da bomba a vácuo na lateral do filtro;
17. Despejar a solução do Becker aos poucos dentro do filtro;
18. Colocar a solução filtrada na garrafa de vidro. Repetir o processo até filtrar todo líquido. Em seguida, descartar o filtro;
19. No frasco de vidro com meio filtrado adicionar antibiótico (1% - 10 mL de penicilina em 1 L de meio);
20. Tampar o vidro, colocar fita para vedar. Identificar a solução: αMEM 1% AB (*αMEM puro com 1% de antibiótico*). Data/ nome do pesquisador/ pH. Validade: 90 dias. Em seguida, armazenar na geladeira.

1.3 SORO FETAL BOVINO (SFB)

Soro Fetal Bovino América do Sul (Código 12657029) - Thermo Fisher Technologies

Soluções – Soro fetal bovino congelado estéril no frasco do fabricante (lacrado).

Materiais – Laboratório: pipetas sorológicas (5 mL/10 mL); banho-maria; tubos Falcon (50 e 15 mL).

O SFB é fornecido pelo fabricante ativo e congelado, em frascos estéreis de 500 mL, devemos inativar o mesmo até o seu uso e fazer pequenas alíquotas para uso em tubos Falcon de 50 mL, evitando a contaminação.

Preparo:

1. Inativar: SFB em banho-maria a 57 °C por 30 minutos, esperar esfriar por mais 40 minutos.
2. Limpar o fluxo com álcool 70% em todas as superfícies. Dentro do fluxo aliquotar o SFB inativado.
3. Serão utilizadas alíquotas de 50 mL em tubos Falcon; Nomear – “SFB inativado” (data/lote)
4. Congelar novamente (utilizar o rack bandeja para congelar os tubos Falcon “na posição vertical” para que o soro não encoste na tampa).
5. Armazenamento: após congelados podem ser armazenados em outros recipientes.

1.4 MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO

Soluções – *Descongelar:* soro fetal bovino inativo.

– *Verificar:* DMEM sem soro.

Materiais – *Laboratório:* pipetas sorológicas (5 mL/10 mL); ponteiros; tubos Falcon (50 e 15 mL).

A suplementação do meio é feita com a adição de Soro Fetal Bovino (SFB) na solução de meio de cultura sem soro. A porcentagem de suplementação é calculada com base no volume total da solução.

Exemplos:

- MEIO 20%: 50 mL – 40 mL DMEM/aMEM sem soro + 10 mL Soro Fetal Bovino.
- MEIO 10%: 50 mL – 45 mL DMEM/aMEM sem soro + 5 mL Soro Fetal Bovino.
- MEIO 15%: 50 mL – 42,5 mL de DMEM/aMEM + 7,5 mL Soro Fetal Bovino
- MEIO 5%: 50 mL – 47,5 mL DMEM/aMEM sem soro + 2,5 mL Soro Fetal Bovino.
- MEIO 1%: 50 mL – 49,5 mL DMEM/aMEM sem soro + 0,5 mL Soro Fetal Bovino.

Preparo:

1. Após limpar o fluxo com álcool 70% e colocar as soluções em banho-maria, dentro do fluxo: com uma pipeta, colocar MEIO puro dentro de um tubo Falcon, e em seguida, com uma ponteira adicionar soro fetal bovino inativado de acordo com a concentração desejada.
2. O ideal é armazenar MEIO suplementado em alíquotas (tubos Falcon), de acordo com a quantidade que irá usar. Nas alíquotas anotar MEIO + suplementação (1, 5, 10, 15 ou 20%) + data + nome do pesquisador. De preferência anotar na lateral do frasco e na tampa.

1.5 MEIO DE TRANSPORTE E DESCONTAMINAÇÃO

Penicilina Estreptomicina (Código 15140148) - Life Technologies

Solução Anfotericina B (Código 15290018) - Life Technologies

Gentamicina (Código 15750060) - Life Technologies

Soluções – *Descongelar:* Penicilina e Anfotericina B.

– *Verificar:* αMEM ou DMEM sem soro e Gentamicina.

Materiais – pipetas (5 mL e 10 mL); ponteiras; tubos Falcon.

O meio de transporte é feito com o intuito de levar o dente extraído até o laboratório, lavá-lo com os medicamentos antibióticos e antifúngicos, evitando-se assim que agentes contaminantes cheguem à cultura celular. A quantidade de suplementação é calculada com base no volume total da solução:

- Penicilina/Estreptomicina (10,000IU/mL) – 60 µL/mL
- Gentamicina (10 mg/mL) – 30 µL/mL
- Anfotericina B (250 µg/mL) – 10 µL/mL

Preparo:

1. Colocar as soluções em banho-maria a 37 °C;
2. Dentro do fluxo: com uma pipeta, colocar a quantidade de αMEM puro a ser suplementada dentro de um tubo Falcon, e em seguida, com uma ponteira adicionar os medicamentos da suplementação de acordo com a concentração descrita acima.

O ideal é suplementar apenas a quantidade necessária para utilização no dia do experimento/ transporte do dente e para seu armazenamento durante a extração do tecido pulpar

1.6 TAMPÃO FOSFATO-SALINO (PBS)

Phosphate Buffered Saline - PBS (10X), pH 7.4 (Código 12657029) Gibco, Thermo Fisher Technologies Brazil, São Paulo, Brasil

A solução tampão fosfato-salina (Phosphate Buffered Saline – PBS) é utilizada para a lavagem das células, especialmente antes da troca do meio de cultura, com o objetivo de remover células mortas não aderentes e resíduos do meio anterior.

OBS.: Geralmente é utilizado PBS diluído.

Exemplo: Solução PBS 10x → PBS 1x (1 L): 100 mL PBS 10x + 900 mL água Milli-Q.

No dia anterior:

Conferir materiais e soluções; e esterilizar garrafa de vidro (para armazenamento do PBS)

Soluções – *Verificar:* PBS 10x; ácido clorídrico (HCl); hidróxido de sódio (NaOH);

Materiais – *Verificar:* pipetas Pasteur; pipetas sorológicas (5 e 10 mL); balão; funil de vidro; Becker; garrafa de vidro; pHmêtro; barra magnética “peixinho”; agitador magnético; sistema de filtração à vácuo descartável (estéril).

Preparo:

1. Dentro do fluxo, colocar a quantidade de PBS 10x necessária em um Becker, para a dissolução. Ex: se for fazer 1 L, então adicionar 100 mL de PBS 10X no Becker.
2. No laboratório, próximo ao pHmêtro, em um novo Becker adicionar aproximadamente 800-850 mL de água Milli-Q (ultrapura) e levar o recipiente ao agitador magnético (barra magnética “peixinho” dentro do Becker).
3. Despejar o PBS 10x na água Milli-Q; manter o agitador ligado para misturar a solução.
4. Transferir o conteúdo para uma proveta, adicionar água Milli-Q até completar ≈1000 mL ou 1 L. Pode utilizar o Balão, neste caso completar até próximo do “risco” (próximo de 1 L).
5. Retornar a solução para o Becker para o *ajuste do pH*, com o pHmêtro.
6. Ligar o pHmêtro (atenção na voltagem da tomada) – observar dados operacionais do pHmêtro.
7. Deixar o descarte próximo, para lavar a ponta do pHmêtro (Becker pequeno).

8. Remover a borracha da ponta do pHmêtro (solução de descanso – KCl).
9. Lavar a ponta do pHmêtro com água Milli-Q, para fazer a calibração.
10. Apertar o botão "mode" para ir à opção pH e apertar "enter".
11. Então selecionar "set up" para ir no "clear" e apertar "enter".
12. Colocar a ponta do pHmêtro na solução de pH padrão 4. Apertar "standardize" e aguardar a calibração". As soluções de pH padrão (4 e 7) ficam nos tubos ao lado do pHmêtro. Agitar as soluções padrão antes de usar.
13. Remover a ponta da solução e lavar novamente com água Milli-Q.
14. Colocar a ponta no pH padrão 7 e apertar "standardize".
15. Remover a ponta da solução e lavar novamente com água Milli-Q.
16. Em seguida, verificar o pH da solução que está sendo preparada no agitador. Para isto, colocar a ponta do pHmêtro no líquido contendo PBS 1x, apertar "enter" e aguardar estabilizar o valor do pH (*exemplo*: pH=8,0).
17. O pH ideal é 7,4. Mas o *pH deve ser ajustado entre 6,8-7,0*, pois durante a filtração sobe para 7,4. Para ajustar o pH, gotejar a solução de HCl (10M) com uma pipeta Pasteur para tornar o meio ácido ou NaOH (10M) para tornar o meio mais básico. Gotejar aos poucos e sempre esperar estabilizar o valor do pH no aparelho.
18. Após atingir o pH ideal, remover a ponta do pHmêtro da solução, lavar com água Milli-Q e cobrir a ponta do pHmêtro novamente com a borracha contendo solução de descanso (KCl).
19. Cobrir o vidro com a solução de PBS 1X com papel alumínio e levar para o *fluxo*, onde o meio será filtrado. Nunca esquecer de limpar o fluxo e a parte externa do balão previamente com álcool 70%.
20. Dentro do fluxo, abrir os pacotes da garrafa de vidro estéril e do filtro.
21. Conectar a mangueira da bomba a vácuo na lateral do filtro.
22. Despejar a solução do Becker aos poucos dentro da parte superior do filtro.
23. A solução filtrada que fica na parte inferior do filtro, deve ser levada a garrafa de vidro. Repetir o processo até filtrar todo líquido. Em seguida, descartar o filtro.
24. Tampar a garrafa, colocar fita para vedar ("parafilm"). Identificar a solução: **PBS**

1X

Data/ nome do pesquisador/ pH. Validade: 90 dias. Em seguida, armazenar na geladeira.

1.7 MEIO DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE (DPBS)

DPBS, no calcium, no magnesium – (Código: 14190) - Thermo Fisher Scientific

Solução “Tampão”, usada na dissolução de outras soluções base para uso na cultura de células.

Soluções: *Verificar os sais:* cloreto de potássio (KCl); fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4); cloreto de sódio (NaCl); fostafo de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Materiais: Recipiente para pesagem dos sais; pipetas Pasteur; ponteiras; balão; funil de vidro; Becker; garrafa de vidro estéril; pHmêtro; barra magnética “peixinho”; agitador magnético; balança; sistema de filtração a vácuo descartável filtro descartável.

Concentração dos Sais:

- Cloreto de potássio (KCl) – 200 mg/L
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) – 200 mg/L
- Cloreto de sódio (NaCl) – 800 mg/L
- Fostafo de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 2160 mg/L

Preparo:

Para 1 L de solução DPBS:

1. Pesar os sais na balança de precisão;
2. Antes de utilizar a balança, limpar com o pincel (varrer a balança); colocar o recipiente onde será depositado o pó, fechar os vidros (inclusive em cima) e apertar o botão Tara. Abrir o vidro e adicionar os sais, obter a quantidade desejada (vidros fechados);
3. Adicionar aproximadamente 800-900 mL de água Milli-Q (ultrapura) no Becker; e levar o recipiente ao agitador magnético com a barra magnética “peixinho” dentro do Becker;
4. Despejar os sais um a um vagarosamente, mantendo o agitador ligado para dissolver os sais;

5. Transferir o conteúdo para uma proveta, adicionar água Milli-Q até completar ≈ 970 - 990 mL. Pode utilizar o Balão, neste caso completar até próximo do "risco" (próximo de 1 L);
6. Retornar a solução para o Becker para o ajuste do pH com o pHmêtro;
7. Ajustar o pHmêtro, colocar a ponta do pHmêtro na solução de pH padrão 4 e 7, apertar "standardize" e aguardar a calibração;
8. Remover a ponta da solução e lavar com água Milli-Q;
9. Em seguida, verificar o pH da solução que está sendo preparada no agitador. Para isto, colocar a ponta do pHmêtro no líquido, apertar "enter" e aguardar estabilizar o valor do pH;
10. O pH ideal é 7,3. Mas o pH deve ser ajustado entre 6,8-7,0, pois durante a filtração sobe para 7,3. Para ajustar o pH, gotejar a solução de HCl (10M) para tornar o meio ácido ou NaOH (10M) para tornar o meio mais básico;
11. Após atingir o pH ideal, remover a ponta do pHmêtro da solução, lavar com água Milli-Q e cobrir a ponta do pHmêtro novamente com a borracha contendo solução de descanso;
12. Retornar a solução (pH ajustado) para a proveta ou balão e completar 1 L com água Milli-Q;
13. Cobrir a boca do vidro contendo a solução com papel alumínio e levar para o fluxo, onde o DPBS será filtrado;
14. Dentro do fluxo, abrir os pacotes da garrafa de vidro estéril e do filtro;
15. Conectar a mangueira da bomba a vácuo na lateral do filtro;
16. Despejar a solução do Becker aos poucos dentro do filtro;
17. Colocar a solução filtrada na garrafa de vidro. Repetir o processo até filtrar todo líquido. Em seguida, descartar o filtro;
18. Tampar o vidro, colocar fita para vedar. Identificar a solução: DPBS Data/ nome do pesquisador/ pH. Validade: 90 dias. Em seguida, armazenar na geladeira.

1.8 HANK'S BALANCED SALT SOLUTION (HBSS)

HBSS, calcium, magnesium, no phenol red (Código 14025) - Life Technologies

Solução "Tampão Fisiológica", usada na dissolução de outras soluções base para uso na cultura de células. Geralmente comprada pronta segundo a referência do fabricante.

1.9 COLLAGENASE

Colagenase tipo I (Código 17100017) - Life Technologies

Soluções – *Verificar:* Colagenase (pó); HBSS com cálcio e magnésio.

Materiais – Pipetas Pasteur; Ponteiras; Eppendorfs; Tubos Falcon de 50 e 15 mL; sistema de filtração a vácuo descartável, seringa e filtro de seringa 0,22 µm.

Trata-se de uma enzima utilizada na digestão de tecidos para obtenção de células para cultura a partir de explantes teciduais, após o preparo teremos soluções estoque concentradas e a concentração de uso segundo a literatura é de 3 mg/mL.

Preparo:

1. Fazer o cálculo da Quantidade necessária segundo a concentração desejada:

Ex: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$1000 \text{ mg} \times V_1 = 3 \text{ mg} \times 50 \text{ mL}$

Onde C_1 é 1000 mg (1 g) da solução em 1 mL, e V_1 sua incógnita. E onde C_2 é a concentração desejada e V_2 o volume final desejado de solução preparada.

Assim serão necessários 150 µL de solução estoque na concentração 1 g/mL para ter 50 mL de solução na concentração 3 mg/mL.

2. Reconstituição da colagenase: Adicione 1 mL de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) com Cálcio e Magnésio diretamente no frasco com 1 g de Colagenase. Leve ao Vortex gentilmente até completa dissolução.
3. Acople a seringa no filtro de seringa sobre um tubo Falcon de 50 mL e esterilize a solução, passando o conteúdo do frasco através do filtro de seringa. Se necessário, dilua a solução de colagenase (1 g/mL – Total 1 mL e diminua sua

concentração para tornar a solução menos viscosa e melhorar a filtragem. Se necessário diluir mais a solução use a fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$. C1

4. Nomeei microtubos com a concentração estoque das células e a data. Ex: Colagenase [50 mg/mL] 02/04/18.
5. Dispense o conteúdo filtrado em alíquotas nos microtubos e armazene de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegido da luz.
6. Separe e nomeie um tubo Falcon de 50 mL para preparar a solução na concentração 3 mg/mL. Adicione 50 mL de HBSS com cálcio no tubo Falcon e descarte 150 μL da solução. Em seguida adicione 150 μL de colagenase na concentração 1 g/mL faça up and down.
7. Separe o conteúdo em alíquotas de 10 mL nos tubos Falcon de 15 mL, nomeados com a concentração e a data de preparo.
8. Armazene em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o seu uso.
9. Descongele no gelo antes de usar.
10. Evite vários ciclos de congelamento/descongelamento.

1.10 DISPASE

Dispase (Código 17105041) - Life Technologies

Soluções – *Verificar*: Dispase (pó); DPBS.

Materiais – Pipetas Pasteur; Ponteiras; Eppendorfs; Tubos Falcon de 50 e 15 mL; sistema de filtração a vácuo descartável, seringa e filtro de seringa 0,22 µm.

Trata-se de uma enzima utilizada na digestão de tecidos para obtenção de células para cultura a partir de explantes teciduais, após o preparo teremos soluções estoque concentradas e a concentração de uso segundo a literatura é de 4 mg/mL.

Preparo:

1. Cálculo da Quantidade necessária segunda a concentração desejada:

$$\text{Ex: } C1 \times V1 = C2 \times V2$$

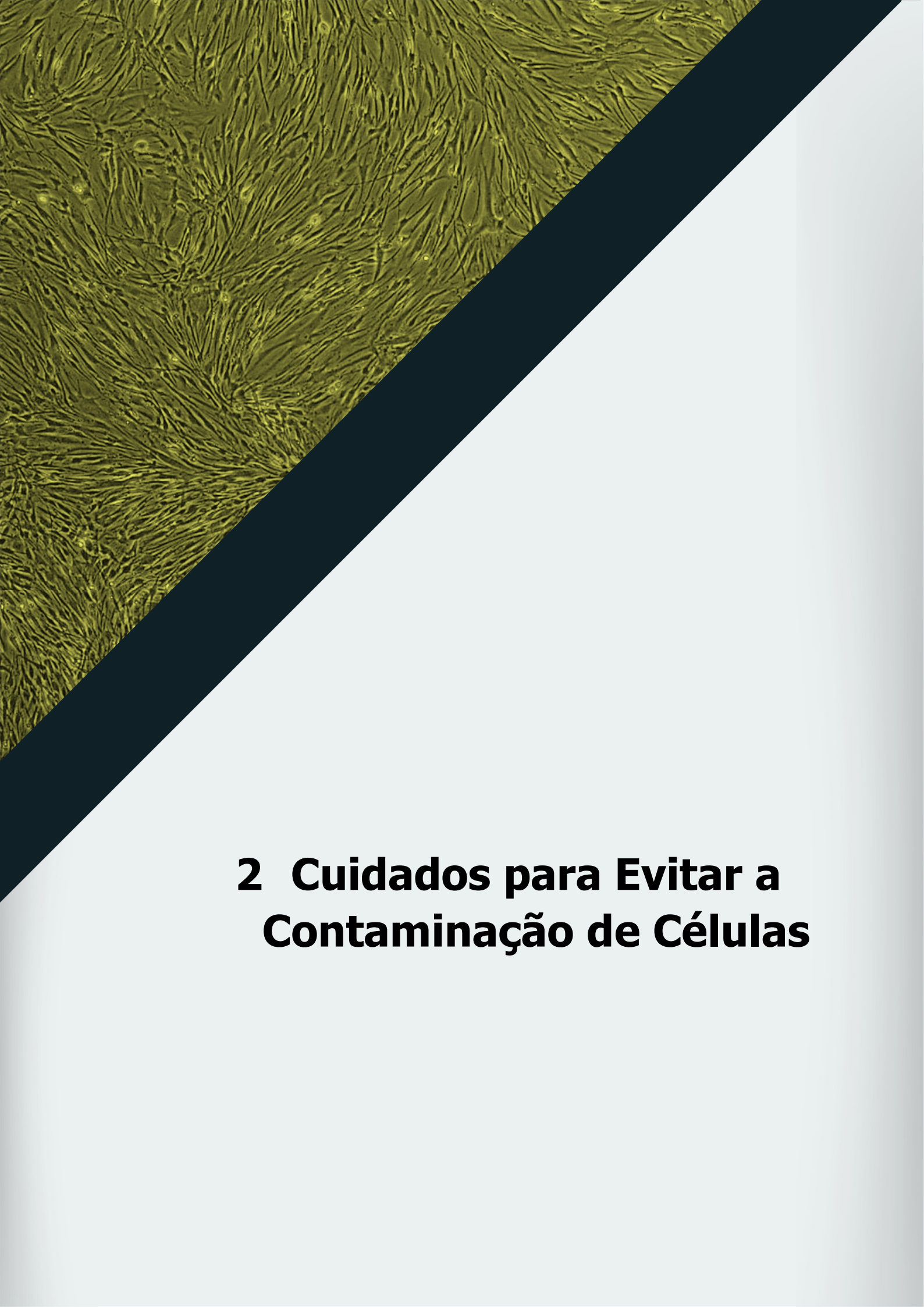
$$1000 \text{ mg} \times V1 = 4 \text{ mg} \times 50 \text{ mL}$$

Onde C1 é 1000 mg (1 g) da solução em 1 mL, e V1 sua incógnita. E onde C2 é a concentração desejada e V2 o volume final desejado de solução Preparada.

Assim serão necessários 200 µL de solução estoque na concentração 1 g/mL para ter 50 mL de solução na concentração 4 mg/mL.

2. Reconstituição da Dispase: adicione 5 mL de Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) sem cálcio e magnésio diretamente no frasco com 5 g de Dispase. Leve ao Vortex gentilmente até completa dissolução.
3. Acople a seringa no filtro de seringa sobre um tubo Falcon de 50 mL e esterilize a solução, passando o conteúdo do frasco através do filtro de seringa. Se necessário, dilua a solução de Dispase (1 g/mL – Total 5 mL) e diminua sua concentração para tornar a solução menos viscosa e melhorar a filtragem. Se necessário diluir mais a solução use a fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$. C1
4. Nomeei microtubos com a concentração estoque das células e a data. Ex: Dispase [1 g/mL] 02/04/18.
5. Envolve os microtubos com papel alumínio.
6. Dispense o conteúdo filtrado em alíquotas nos microtubos e armazene de -20 °C a -5 °C protegido da luz.

7. Separe e nomeie um tubo Falcon de 50 mL para realizar sua solução na concentração 4 mg/mL. Adicione 50 mL de DPBS sem cálcio e magnésio no tubo Falcon e descarte 200 μ L dessa solução. Em seguida adicione 200 μ L de Dispase na concentração 1 g/mL faça up and down. Feche o tubo com parafilm e armazene em geladeira.
8. Separe o conteúdo em alíquotas de 10 mL nos tubos Falcon de 15 mL, nomeados com a concentração e a data de preparo. Envolve os tubos com alumínio.
9. Armazene em freezer -20°C até o seu uso.
10. Descongele no gelo antes de usar.
11. Evite vários ciclos de congelamento/descongelamento.

The image features a microscopic view of cells, likely fibroblasts, in the top-left corner. The cells are elongated and spindle-shaped, with visible nuclei. This image is separated from the rest of the page by a thick, dark blue diagonal line that runs from the top-left towards the bottom-right. The background of the entire page is a light gray gradient.

2 Cuidados para Evitar a Contaminação de Células

2 CUIDADOS PARA EVITAR A CONTAMINAÇÃO DE CÉLULAS

1. Trabalhar com cultura de células exige cuidados a fim de evitar contaminação por micro-organismos, que pode ocorrer em diversas etapas do experimento. Por isso é importante sempre observar as células no microscópio previamente e após retirar da incubadora. Indica-se fotografar as células sempre que possível.
2. Em casos de contaminação, o meio de cultura fica turvo e com aspecto de grânulos na solução. Normalmente o meio de cultura apresenta-se róseo, com pequenas alterações de cor devido ao pH.
3. Algumas soluções podem formar precipitados, mas estas permanecem límpidas. Ao microscópio, o precipitado não está aderido, mas é imóvel; por exemplo, o precipitado de Soro Fetal Bovino.
4. Fungos e bactérias tem aspecto de grânulos com refringência e apresentam movimentação. Outra observação é a alteração no padrão de adesão e crescimento celular, quando ocorre contaminação. As atividades celulares diminuem e o número de células mortas parece aumentado.
5. Contaminou. O que fazer? O primeiro passo é tentar descobrir a origem da contaminação. É fundamental saber se esta foi causada por alguma das soluções, que devem ser descartadas, ou manipulação ou algum outro fator externo. Para tanto alíquotar aproximadamente 1000 µL das soluções em placas de Petri identificadas ou em uma placa de 6 poços. Armazenar em incubadora por 24 horas; Observar ao microscópio. Em casos de contaminações leves, apenas poucas alterações podem ser notadas nas soluções. Manter na incubadora até completar 48 horas e observar novamente.
6. Se houver contaminação, descartar as soluções comprometidas e o material biológico. Previamente ao descarte, fazer desinfecção com hipoclorito de sódio.
7. Cuidados como lavar as mãos com sabão bactericida, usar luvas sem talco, vestir jaleco exclusivo para a atividade no laboratório, e promover desinfecção de superfícies e mãos com álcool 70% colaboram com a manutenção da cadeia

asséptica. O álcool 70% apresenta propriedades desidratante e desnaturante de proteínas, proporcionando ação antimicrobiana.

8. Borrifar álcool 70% em todas as soluções antes de colocar no banho-maria.
9. Após o uso do fluxo laminar fazer desinfecção com álcool 70%. O último usuário do dia, deixar a luz ultravioleta (UV) ligada "over-night", exceto às 6ª feira e feriados. O primeiro usuário da 2ª feira deixar a luz UV por 30 minutos antes de iniciar as atividades.



3 Recursos

3 RECURSOS

3.1 Equipamentos

1. Autoclave
2. Agitador Magnético
3. Balança analítica.
4. Banho-maria
5. Bomba de sucção à vácuo
6. Centrífuga
7. Deionizador de água
8. Espectrofotômetro
9. Estufa incubadora de com CO₂
10. Estufa para secagem de material
11. Fluxo laminar
12. Freezer -20 °C
13. Freezer -80 °C
14. Geladeira
15. Microscópio invertido
16. pHmetro
17. Vórtex

3.2 Instrumentais

1. Alveolótomo
2. Balão
3. Becker
4. Cabo de bisturi
5. Câmara para contagem celular (Neubauer).
6. Canaletas para Solução
7. Counter-cells
8. Cronômetro
9. Curetas nº 2
10. Descarte Específico
11. Fórceps
12. Funil de Vidro
13. Garrafa de vidro estéril.
14. Isopor
15. Lamínula de vidro
16. Limas (10, 15, 20 e 25)
17. Pinça reta
18. Placa de Petri
19. Pipetador automático.
20. Pipetador manual
21. Pipeta Pasteur

22. Ponteiras
23. Porta agulha
24. Sistema de filtração a vácuo.
25. Tesoura para tecido

3.3 Plásticos

1. Frascos/Garrafas de cultura (T75 e T25)
2. microtubos Eppendorf
3. Placas para cultura (6 poços, 96 poços, 24 poços)
4. Pipetas sorológicas 5 e 10 mL
5. Tubos Falcon (15 e 50 mL).

3.4 Materiais de consumo diversos

1. Filtro de Seringa
2. Lâmina 15 C
3. Luva sem talco
4. Papel Alumínio
5. Papel de Bancada

3.5 Soluções e Medicamentos

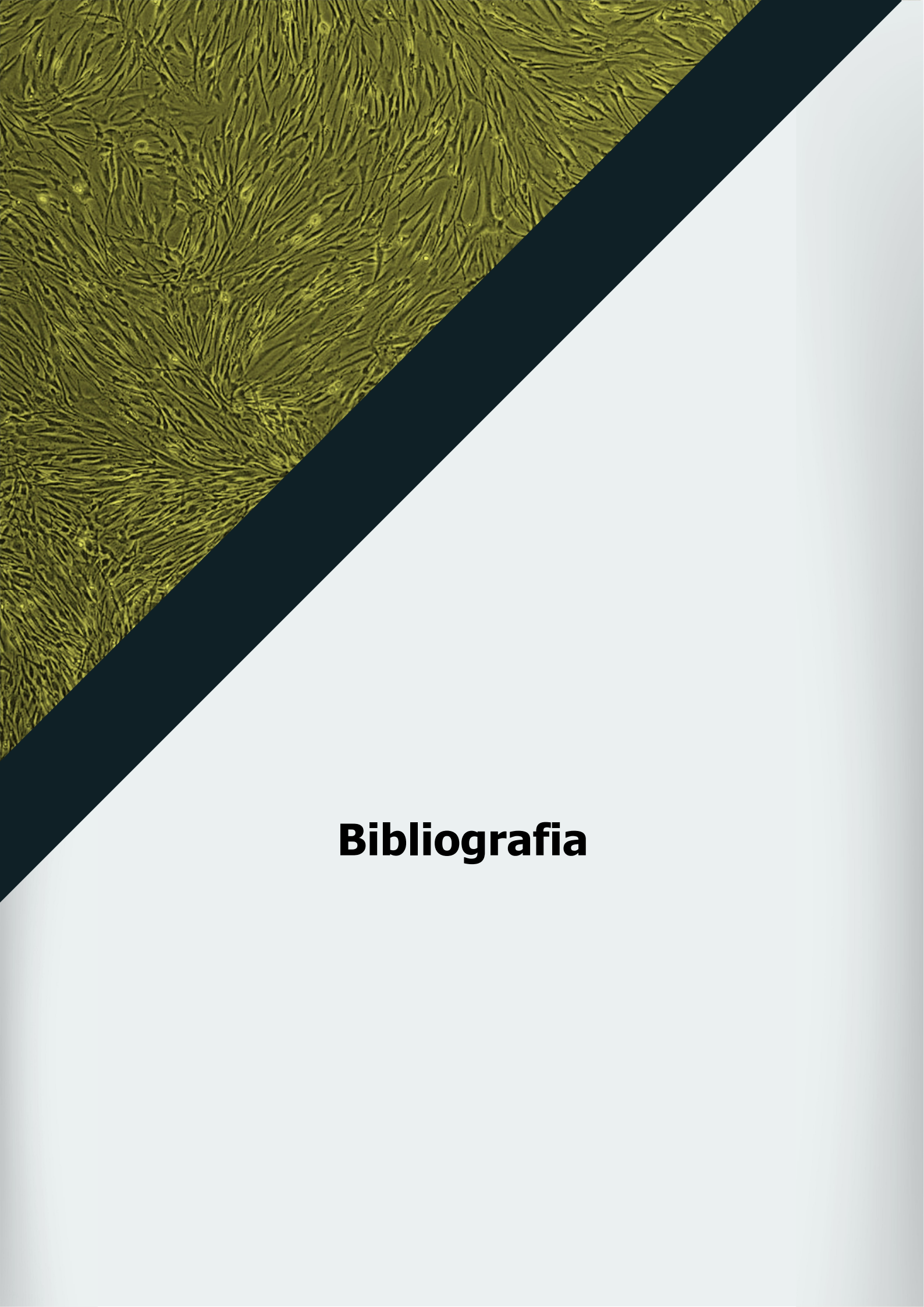
1. αMEM (Referência)
2. Ácido Clorídrico (HCl)
3. Accutase
4. Álcool absoluto/éter 1:1
5. Anfotericina B, Thermo Fisher Scientific
6. Anticorpo Primário
7. Anticorpo Secundário
8. Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3)
9. Citrato de sódio 0,05 mol.L.
10. Cloreto de amônio (NH_4Cl) 50 mmol
11. Cristal Violeta 0,2% em etanol 2%
12. DMEM (Referência 31600-026, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO)
13. DMSO
14. DPBS
15. Gelo
16. Gentamicina, Thermo Fisher Scientific
17. HBSS
18. Hidróxido de sódio (NaOH)
19. Kit Human MSC
20. Metanol 100%
21. MTT
22. Paraformaldeído 4% em PBS 4X
23. Penicillin-Streptomycin, 10,000 U/mL

24. PBS - Phosphate Buffered Saline - PBS (10X)
25. PBS BSA 0,2% (Albumina de soro bovino)
26. PBS BSA 3% (Albumina de soro bovino)
27. SFB – Soro Fetal Bovino
28. Stain Buffer
29. Tripsina
30. Turk – Azul de Tripan

3.6 Limpeza

1. Álcool 70%
2. Bucha
3. Gaze
4. Hipoclorito de Sódio
5. Papel Toalha
6. Solução de Extran 10%

Observação: Dependendo da solução ou material é necessário fazer a importação, assim é preciso planejamento para que os experimentos sejam realizados dentro dos prazos estabelecidos. A encomenda de materiais pode ser feita por importação direta, com algum representante comercial de uma empresa estrangeira ou diretamente pelo site da empresa.



Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

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 978-65-86349-27-6

FOB USP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

