

|                                                                                   |                                         |                         |               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|---------------|
|  | DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS | NORMA N°<br>NIT-LABIO-  | REV. N°<br>01 |
|                                                                                   |                                         | PUBLICADO EM<br>00/2020 | PÁGINA<br>¼   |

## SUMÁRIO

- 1 Objetivo
- 2 Campo de Aplicação
- 3 Responsabilidade
- 4 Documentos de Referência
- 5 Documentos Complementares
- 6 Definições
- 7 Soluções
- 8 Materiais
- 9 Equipamentos
- 10 Descongelamento
- 11 Manutenção
- 12 Congelamento
- 13 Histórico de Revisão e Quadro de Aprovação

## 1 OBJETIVO

Esta norma estabelece os procedimentos para o correto descongelamento de células de mamíferos aderentes e em suspensão no Laboratório de Bioengenharia Tecidual.

## 2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Esta norma se aplica aos usuários do Labio / Dimav.

## 3 RESPONSABILIDADE

A responsabilidade pela emissão, cancelamento e revisão desta norma é do Labio.

## 4 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

|                                                  |                                                                                                             |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FRESHNEY, R. I.                                  | Culture of Animals Cells; 5ª ed.;2005                                                                       |
| Product Information Sheet for<br>ATCC®. CCL-163™ | <a href="https://www.atcc.org/products/all/CCL-163.aspx">https://www.atcc.org/products/all/CCL-163.aspx</a> |

## 5 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

|               |                                                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| FOR-Dimav-081 | Registro de Culturas de Células                                                       |
| FOR-Dimav-084 | Procedimento Diário de Culturas de Células                                            |
| NIT-LABIO-202 | Recebimento, Identificação e Controle da Qualidade de Cultura de Células de Mamíferos |

|                                                                                   |                   |                    |                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|
|  | <b>NIT-LABIO-</b> | <b>REV.<br/>00</b> | <b>PÁGINA<br/>2/4</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|

|               |                                                                                                     |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NIT-LABIO-201 | Identificação e Controle de Qualidade de Meios e Soluções                                           |
| NIT-LABIO-208 | Paramentação e Higienização de Usuários da Sala de Cultura de células                               |
| NIT-LABIO-XXX | Quantificação de Células de Mamíferos na Câmara de Neubauer                                         |
| NIT-LABIO-XXX | Operação e Utilização do Tanque de Nitrogênio Líquido                                               |
| NIT-DIBIO-XXX | Preparo de solução tampão fosfato-salino de Dulbecco - DPBS                                         |
| NIT-DIBIO-XXX | Preparo de meio Eagle modificado por Dulbecco com alta concentração de glicose - DMEN High          |
| NIT-DIBIO-XXX | Preparo de solução de tripsina-EDTA 0,125%                                                          |
| NIT-DIBIO-XXX | Preparo de solução de álcool etílico 77% (v/v)                                                      |
| NIT-DIBIO-XXX | Operação e higienização do banho maria modelo W1106                                                 |
| NIT-LABIO-236 | Operação e Higienização da Cabine de Segurança Biológica modelo THERMO SCIENTIFIC MODELO MODELO1385 |
| NIT-DIBIO-XXX | Operação e higienização da incubadora de CO2 thermo Scientific modelo 3121                          |
| NIT-DIBIO-XXX | Operação e higienização do microscópio invertido Primo Vert                                         |
| NIT-DIBIO-XXX | Quantificação de células de mamíferos na Câmara de Newbauer                                         |
| FOR-DIMAV-134 | Agenda das Cabines de Segurança Biológica da Sala de Cultura do Labio                               |

## 6 DEFINIÇÕES

### 6.1 Siglas

As siglas das UP/UO do Inmetro podem ser acessadas em: <http://intranet.inmetro.gov.br/tema/qualidade/docs/pdf/siglas-inmetro.pdf>.

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMEN High 10% soro – Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (Meio Eagle modificado por Dulbecco com alta concentração de glicose) com 10% de soro de bezerro.

DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino de Dulbecco).

EPIs - Equipamentos de Proteção Individual

ID - Identificação

SFB – Soro Fetal Bovino

|                                                                                   |                                         |                                                 |                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|  | <p align="center"><b>NIT-LABIO-</b></p> | <p align="center"><b>REV.</b><br/><b>00</b></p> | <p align="center"><b>PÁGINA</b><br/><b>3/4</b></p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|

## 6.2 Termos

Balb/c 3T3 clone A31 – Clone da linhagem celular aderente obtida de embriões de camundongo Balb/c pelo protocolo 3T3.

Confluência – Estimativa visual do espaço ocupado por células em cultivo.

Debri – Sujidade presente no meio de cultura, geralmente células soltas ou parte delas.

Solução de congelamento – Solução composta por Soro (fetal bovino ou de Bezerro) e 5% de DMSO.

Sobrenadante – Refere-se ao meio de cultura acima do pellet;

Ressuspender – O ato de voltar a suspender, com objetivo de homogeneizar as células junto ao meio.

## 7 SOLUÇÕES

7.1 DMSO;

7.2 Meio Eagle modificado por Dulbecco com alta concentração de glicose – DMEN High, preparado conforme **NIT-Díbio-202**;

7.3 Solução de tripsina-EDTA 0,125%, preparada conforme **NIT-Díbio-203**;

7.4 Solução tampão fosfato-salino de Dulbecco – DPBS, preparada conforme **NIT-Díbio-200**;

7.5 Soro de Bezerro;

7.6 Soro fetal bovino.

## 8 MATERIAIS

8.1 Linhagem Balb/c 3T3 clone A31;

8.2 Recipiente para descarte de resíduos biológicos líquidos;

8.3 Pipetas sorológicas graduadas;

8.4 Tubos Falcon 15 mL ou 50 mL;

8.5 Ponteiras estéreis para Micropipetas de 20 µL e 1000 µL;

8.6 Garrafas de Cultura.

|                                                                                   |                   |                          |                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|
|  | <b>NIT-LABIO-</b> | <b>REV.</b><br><b>00</b> | <b>PÁGINA</b><br><b>4/4</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|

## **9 EQUIPAMENTOS**

**9.1** Banho-maria, operando conforme NIT-Dibio-207.

**9.2** Cabine de segurança biológica, operando conforme NIT-Dibio-208.

**9.3** Centrífuga.

**9.4** Estufa incubadora de CO<sub>2</sub>, operando conforme NIT-Dibio-209.

**9.5** Microscópio óptico invertido, operando conforme NIT-Dibio-211.

## **10 DESCONGELAMENTO**

### **10.1 Procedimento**

**10.1.1** Reservar em tubo de centrífuga, 9 mL do meio de cultivo.

**10.1.2** Em banho-maria ou similar a 37° C ± 0,5°C, descongelar rapidamente o criotubo.

**10.1.3** Limpar o criotubo com solução de álcool etílico 77% (v/v).

**10.1.4** Diluir, lentamente, as células recém-descongeladas nos 9 mL de meio de cultivo anteriormente reservados.

**10.1.5** Centrifugar entre 300 G e 400 G por 5 min.

**10.1.6** Ressuspender em volume adequado para contagem a ser realizada conforme a NIT-Dibio-217.

**10.1.7** Plaquear cerca de 6,0 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> em garrafa de cultivo.

**10.1.8** Registrar a linhagem celular em FOR-Dimav-081.

## **11 MANUTENÇÃO**

**11.1** As células devem ser cultivadas em DMEM HIGH 10% e mantidas em incubadora com 5% ± 0,5% de CO<sub>2</sub> a 37°C ± 0,5°C e 90% de umidade.

**11.2** Caso necessário deve-se adicionar o antibiótico adequado.

**11.3** Deve-se observar ao microscópio óptico invertido nas objetivas de 10x e 40x a confluência, morfologia, presença de contaminantes e outras características da célula e do meio de cultivo.

**11.4** Registre qualquer procedimento realizado com a linhagem celular em FOR-Dimav-084.

|                                                                                                     |                   |                          |                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <br><b>INMETRO</b> | <b>NIT-LABIO-</b> | <b>REV.</b><br><b>00</b> | <b>PÁGINA</b><br><b>5/4</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|

## **11.5 Troca de meio de cultivo**

**11.5.1** Deve ser realizada a cada três dias, caso não haja necessidade de tripsinização.

**11.5.2** Seguir as seguintes etapas para troca de meio de cultivo:

- a) Aquecer antes do uso a tripsina 0,125%, o meio de cultivo e o DPBS, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ;
- b) Retirar as garrafas da incubadora;
- c) Em cabine de segurança biológica, verter em recipiente de descarte o meio de cultura antigo;
- d) Caso haja muito debri, lavar até duas vezes com PBS;
- e) Adicionar meio de cultivo novo;
- f) Retornar as garrafas à incubadora.

## **11.6 Tripsinização**

**11.6.1** As células devem ser tripsinizadas a partir de 50% (ver figura) de confluência não devendo ultrapassar 80%, caso não atinjam esta confluência em 3 dias é preferível a troca do meio de cultivo, sendo também recomendável a investigação da causa do crescimento lento.

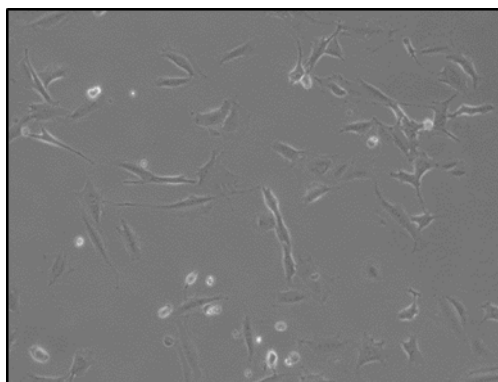


Figura – Cultura apresentando entre 50% e 60% de confluência

**11.6.2** Para tripsinizar as células, siga as seguintes etapas:

- a) Aquecer antes do uso a tripsina 0,125%, o meio de cultivo e o DPBS, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ;
- b) Retirar as garrafas da incubadora;
- c) Em cabine de segurança biológica, verter em recipiente de descarte o meio de cultivo antigo;
- d) Lavar entre 2 e 3 vezes com DPBS;
- e) Adicionar para cada  $25\text{ cm}^2$ , 1 mL de Tripsina 0,125%;

|                                                                                                     |                   |                          |                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <br><b>INMETRO</b> | <b>NIT-LABIO-</b> | <b>REV.</b><br><b>00</b> | <b>PÁGINA</b><br><b>6/4</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|

- f) Deixar na incubadora aproximadamente 5 min, ou assim que as células soltarem da garrafa;
- g) Constatar ao microscópio óptico invertido que as células soltaram;
- h) Diluir a solução de células e Tripsina em volume igual de DMEM HIGH 10%;
- i) Centrifugar entre 300 G e 400 G por 5min;
- j) Ressuspender em volume adequado para contagem a ser realizada conforme a NIT-Dibio-217;
- k) Plaquear em concentração entre  $3,0 \times 10^3$  e  $4,0 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> em garrafa de cultivo ou utilizar para outros fins, conforme o protocolo desejado, e descartar o restante em recipiente adequado.

## 12 CONGELAMENTO

**12.1** A concentração de células congeladas deve ser de aproximadamente 10<sup>6</sup> células por criotubo.

**12.2** Registre o congelamento em FOR-Dimav-084.

**12.3** Siga as etapas seguintes para congelamento das células:

- a) Realizar a tripsinização conforme o item 11.5, separar a quantidade necessária de criotubos e identificá-los, no mínimo, com os seguintes campos: nome da célula, data de congelamento e responsável pelo congelamento.
- b) Caso haja, deve ser identificado a passagem e o número de células congeladas;
- c) Ressuspender as células a serem congeladas em 1 mL de solução de congelamento para cada criotubo a ser feito;
- d) Adicionar a solução com células nos criotubos;
- e) Transportar rapidamente, sob refrigeração, os criotubos para a modalidade de congelamento escolhida: curva de congelamento manual, cooler, decaimento programado, etc.;
- f) Após 1 dia estocar em nitrogênio líquido (preferencialmente na fase vapor).

**NOTA 1:** Para a realização dos procedimentos descritos nesta NIT, o responsável deve organizar-se com antecedência, separando todo o material que será utilizado, bem como, reservando os equipamentos necessários para o procedimento, conforme FOR DIMAV 134 - Agenda das cabines de segurança biológica da sala de cultura do labio;

**NOTA 2:** O operador responsável pelo procedimento deve estar utilizando os EPIs necessários para o procedimento, conforme NIT LABIO 208 – Paramentação e Higienização para uso da Sala de Cultura de Células.

|                                                                                   |                                         |                                                 |                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|  | <p align="center"><b>NIT-LABIO-</b></p> | <p align="center"><b>REV.</b><br/><b>00</b></p> | <p align="center"><b>PÁGINA</b><br/><b>7/4</b></p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|

**NOTA 3:** Os reagentes utilizados deverão dar entrada, através do formulário FOR DIMAV 091 – Registro de Meios e Soluções, e passar pelo controle de qualidade do laboratório, conforme NIT LABIO 201 – Identificação e Controle de Qualidade de Meios e Soluções Utilizados;

**NOTA 4:** As células utilizadas no ensaio deverão dar entrada, através dos formulários FOR DIMAV 081 – Registro de Cultura de Células e FOR DIMAV 084 – Procedimento Diário de Cultura de Células, conforme NIT LABIO 202 – Recebimento, Identificação e Controle de Qualidade de Cultura de Células de Mamíferos.

**NOTA 5:** É necessário que todo material plástico e soluções/reagentes utilizados sejam estéreis.

## 11 HISTÓRICO DE REVISÃO E QUADRO DE APROVAÇÃO

| Revisão | Data       | Itens Revisados    |
|---------|------------|--------------------|
| 00      | Julho/2015 | ▪ Emissão inicial. |
| 01      | Março/2020 | ▪ Revisão          |

| Quadro de Aprovação    |                                                                           |                                            |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                        | Nome                                                                      | Atribuição                                 |
| <b>Elaborado por:</b>  | Ítalo da Cruz Pacheco                                                     | Técnico Dimav                              |
| <b>Verificado por:</b> | Josemar Vinicius Maiworm Abreu Silva<br>Priscila Grion de Miranda Borchio | Técnico Dimav<br>Técnica Bolsista da Dimav |
| <b>Aprovado por:</b>   | Leonardo Boldrini                                                         | Chefe da UO                                |