

AULAS PRÁTICAS VIROLOGIA

Parte I - Técnicas de cultura de células animais

- 1 – Observação, manuseamento e obtenção de sub-culturas de células animais.
- 2 – Determinação da concentração e da taxa de inviabilidade de uma suspensão celular.
- 3 – Obtenção de sub-culturas de células VERO.

Parte II - Técnicas de Virologia

- 1 – Produção de vírus (EMCV, FV3 e outros iridovírus) em células Vero
- 2 – Titulação dos vírus produzidos

Parte III - Técnicas de Virologia molecular

- 1 – Extracção e caracterização dos genomas virais
 - 1.1 - Extracção dos genomas dos vírus produzidos
 - 1.2 - Caracterização dos genomas virais
 - 1.2.1 - Análise electroforética
 - 1.2.2 - Tradução *in vitro* (apenas para o genoma do EMCV)
- 2 – Extracção e caracterização de proteínas de células infectadas
 - 2.1 - Marcação radioactiva e extracção de proteínas
 - 2.2 - Caracterização dos polipéptidos celulares e virais
- 3 – Extracção e caracterização de RNAs de células infectadas
 - 3.1- Extracção de RNAs
 - 3.2- Caracterização do RNA celular e viral
 - 3.2.1- Análise electroforética do RNA
 - 3.2.2 - Tradução do RNA *in vitro*

Parte I

TÉCNICAS DE CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS

1 – OBSERVAÇÃO, MANUSEAMENTO E SUB-CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS

Objectivos

- 1 - Observação de culturas de células VERO e de outras linhas celulares.**
- 2 - Identificação de culturas confluentes.**
- 3 - Obtenção de suspensões celulares.**
- 4 - Determinação da concentração e da taxa de inviabilidade de uma suspensão celular.**
- 5 - Obtenção de sub-culturas (passagem de células).**

Introdução

Vão ser utilizadas diversas linhas celulares, que são cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME) suplementado com soro fetal de bovino (“foetal calf serum”) a 10% (DME-FCS₁₀). O pH do meio é mantido numa atmosfera com CO₂ a 5% (obtida ou por gazeamento ou por colocação em estufa de CO₂ com atmosfera húmida).

As células crescem em monocamada, aderentes à superfície do frasco/placa de cultura.

A sub-cultura das células faz-se habitualmente a partir de culturas confluentes, enquanto que a infecção é efectuada preferencialmente com culturas subconfluentes.

As células são subcultivadas, a partir de suspensões celulares obtidas por tripsinização das células da monocamada.

Todas as operações envolvidas no manuseamento das células e respectivos meios são efectuadas em condições de assepsia, com material estéril, e em câmara de fluxo laminar.

Procedimento

- 1 - Observar os frascos e placas com culturas celulares.**
- 2 - Subcultivar as células de um frasco T25 (com 25cm² de área) para:**
 - 2 placas P35 (com 35mm de diâmetro - 9,6cm² de área) de forma a que possam ser infectadas daí a dois dias;
 - 1 T25 que esteja óptimo (confluente) para ser subcultivado daí a 2 dias.
- 2.1 - Lavar a monocamada celular por duas vezes com 2ml de PBS-A.**
- 2.2 - Adicionar 1ml de tripsina e rejeitar o excesso após passagem por toda a monocamada.**
- 2.3 - Incubar a 37 °C até que as células se destaquem do frasco (2 a 3 minutos).**
- 2.4 - Adicionar 2ml de meio e ressuspender bem as células, por pipetagem.**
- 2.5 - Contar o número de células presentes na suspensão celular (ver protocolo “Determinação da concentração e da taxa de inviabilidade de uma suspensão celular”).**
- 2.6 - Calcular os inóculos a distribuir pelas placas e frasco de cultura pretendidos (ver protocolo “Obtenção de sub-culturas de células VERO”).**
- 2.7 - Após distribuição dos inóculos, adicionar meio de cultura às P35 e ao T25 de forma a ficarem respectivamente com 2ml e 6ml de meio. Colocar a incubar na estufa de CO₂ (deixando o frasco mal rolhado).**

2 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E DA TAXA DE INVIABILIDADE DE UMA SUSPENSÃO CELULAR

Objectivos

- 1 - Determinação da concentração de uma suspensão celular.
- 2 - Determinação da taxa de inviabilidade de uma suspensão celular.

Introdução

O número de células de uma cultura pode ser contado. É necessário obter primeiro uma suspensão celular devidamente homogeneizada, da qual se retira uma alíquota para aplicar numa câmara de contagem.

Quando também se pretende conhecer a taxa de inviabilidade dessa cultura, utiliza-se para a contagem uma alíquota da suspensão celular diluída numa solução de azul de tripano em PBS-A. O azul de tripano é um corante de exclusão que apenas entra em células permeabilizadas (inviáveis). Após a entrada na célula atravessa o invólucro nuclear e acaba por se localizar nos núcleos, que ficam corados de azul.

Procedimento

- 1 - Retirar 0,1ml da suspensão celular para um microtubo
- 2 - Adicionar 0,2ml de azul de tripano em PBS-A e misturar bem.
(Nesta alíquota a suspensão celular fica diluída 1:3)
- 3 - Pipetar uma amostra para uma câmara de contagem (hemacitómetro), após montar devidamente a lamela.
- 4 - Contar os números de células **viáveis** e **inviáveis** presentes nos dois campos da câmara de contagem.
(distinguem-se as células inviáveis por apresentarem os núcleos corados de azul). Calcular as médias dos dois valores obtidos: n_v e n_i , respectivamente.

5 – Cálculos:

- 5 -1 - Calcular a concentração de células viáveis (C_v) presentes na suspensão celular

$$C_v = n_v \times 10^4 \times 3$$

- 5 -2- Calcular a concentração de células inviáveis (C_i) presentes na suspensão celular

$$C_i = n_i \times 10^4 \times 3$$

- 5 -3 - Calcular o número de células viáveis (N_v) presentes na suspensão celular

$$N_v = C \times V$$

- 5 -4 – Calcular a taxa de inviabilidade (T_i) da suspensão celular

$$T_i = (n_i / n_v) \times 100 \%$$

- C (concentração) é o número de células existentes em 1 mililitro de suspensão celular
- n_v é a média do número de células viáveis observado por campo da câmara de contagem (10^{-4} cm^3)
- N_v é o número de células viáveis presentes na suspensão celular
- V é o volume da suspensão celular

3 – OBTENÇÃO DE SUB-CULTURAS DE CÉLULAS VERO

Objectivos:

Tendo em consideração o tipo de frasco/placa a utilizar e o tempo de cultura pretendido, determinar os inóculos adequados para preparação de sub-culturas destinadas a:

- i) passagem de células / manutenção da linha celular
- ii) inoculação com um vírus, tendo em vista a sua produção

Introdução

As células VERO são uma linha contínua com origem em células de rim de macaco verde africano.

São células fibroblásticas, que crescem em monocamada, a 37°C, em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME) suplementado com soro fetal de bovino (“foetal calf serum”) a 10% (DME-FCS₁₀). O pH do meio é mantido numa atmosfera com CO₂ a 5% (obtida ou por gazeamento ou por colocação em estufa de CO₂ com atmosfera húmida).

Uma cultura confluenta tem cerca de 2,5 X 10⁵ células por cm².

O ciclo de replicação celular é de cerca de 24 horas, após uma taxa de crescimento de apenas 1,25X no primeiro dia de cultura.

A subcultura das células faz-se habitualmente a partir de culturas confluentes, enquanto que a infecção é efectuada preferencialmente em culturas subconfluentes.

As células são subcultivadas a partir de suspensões celulares obtidas por tripsinização das células da monocamada (ver protocolo “Observação, manuseamento e subcultura de células animais”).

Procedimento

Utilizar a seguinte tabela para calcular os inóculos adequados à obtenção das sub-culturas pretendidas

SUB-CULTURA DE CÉLULAS VERO			
Frasco/Placa a preparar	Área (cm ²)	Nº de células na confluência	Inóculo para utilizar ao 3º dia
T25 = T24	24	6x10 ⁶	1,2x10 ⁶ P
T75 = T83	83	2x10 ⁷	4x10 ⁶ P
T180 = T175	175	4,5x10 ⁷	9x10 ⁶ P, 4,5x10 ⁶ I
placa de 24 poços	45	107	10 ⁶ I
P35 = P40	8,8	2,2x10 ⁶	2,2x10 ⁵ I
P60 = P58	20,8	5,2x10 ⁶	5,2x10 ⁵ I
P100 = P92	56,7	1,4x10 ⁷	1,4x10 ⁶ I
P150 = P144	145	3,6x10 ⁷	3,6x10 ⁶ I

Utilização pretendida ao 3º dia:

P – Passagem – 5x10⁴ células/cm²

I – Infecção – 2,5x10⁴ células/cm²