

Relatório Interno

Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante

Adriana Alexandre dos Santos Tavares

João Manuel R. S. Tavares



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Julho de 2009

Agradecimentos

A primeira autora deseja expressar os seguintes agradecimentos:

- Ao Professor João Manuel R. S. Tavares pelo apoio fornecido ao longo do meu projecto de Mestrado, em particular pela orientação, disponibilidade e apoio fornecido ao longo de todo este projecto.
- Aos meus pais e irmão por terem demonstrado, como sempre, um apoio incondicional.
- A todos os que possibilitaram o desenvolvimento do meu projecto de Mestrado.

Sumário:

Este relatório tem por objectivos expor em os princípios gerais de cultura de células e da citometria de fluxo para análise dos efeitos da radiação ionizante em culturas de células. Assim, conceitos relacionados com culturas de células, incluindo tipos de culturas e vantagens e desvantagens, são expostos no presente relatório. Adicionalmente, o princípio da técnica de citometria de fluxo, bem como, o seu uso em estudos dos efeitos da radiação ionizante em culturas de células, são igualmente apresentados.

Summary:

This report aims to explain in the basic principles of cells culture and flow citometry for the study of ionizing radiation effects on cells culture. Thus, subjects such as cells culture type and advantages/disadvantages of cells culture are explained. Additionally, basic principles of flow citometry, as well as, its applicability for the study of ionizing radiation effects on cell culture are also presented.

Índice

Capítulo I. Princípios Gerais de Culturas de Células	1
1.1 Introdução	2
1.2 Tipos de Culturas.....	3
1.3 Morfologia e Características Funcionais	5
1.4 Meios de Cultura.....	7
1.5 Avaliação e Contaminação da Cultura	9
1.6 Sumário	14
Capítulo II. Citometria de Fluxo e Avaliação dos Efeitos da Radiação em Culturas de Células ..	15
2.1 Introdução	16
2.2 Citómetro de Fluxo: Principais Características	17
2.3 Vantagens e Desvantagens da Citometria de Fluxo	19
2.4 Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação em Culturas de Células.....	21
2.5 Sumário	24
Capítulo III. Conclusão.....	26
Bibliografia	28

Capítulo I. Princípios Gerais de Culturas de Células

1.1 Introdução

A cultura de células tem vindo a afirmar-se como uma ferramenta muito útil em múltiplas áreas de investigação das ciências da saúde.

O termo cultura tecidular refere-se ao processo de extracção de tecidos ou órgãos de um animal ou planta, com conseqüente colocação num ambiente artificial capaz de sustentar e proporcionar o crescimento destes. Este ambiente é, geralmente, criado num receptáculo de plástico ou vidro com um meio de cultura líquido ou semi-sólido capaz de fornecer nutrientes essenciais para a sobrevivência e crescimento do tecido ou órgão. Quando se removem células de fragmentos de órgãos antes ou durante a cultura, com concomitante separação das células vizinhas, diz-se que se está a realizar uma cultura de células.

Apesar das culturas de células animais terem sido realizadas com sucesso por Ross Harrison em 1907, só na década de 40 e 50 do século XX, e após vários desenvolvimentos, é que ocorrem as primeiras culturas de células amplamente disponíveis como ferramenta de pesquisa para os cientistas, (Ryan 2008). As principais razões para isso incluem: primeiro, o desenvolvimento de antibióticos, que facilitaram o processo de cultura celular e evitaram muitos dos problemas inerentes a contaminações da cultura celular; segundo, verificou-se a melhoria das técnicas, nomeadamente, aquelas relacionadas com o uso de tripsina para remoção de células dos vasos de cultura e fundamentais para a obtenção de linhas celulares em crescimento contínuo (tais como, células HeLa); finalmente, como terceira razão, surgem as linhas de culturas de células padronizadas, com meios de cultura quimicamente definidos, o que facilitou o trabalho padronizado entre diferentes grupos de cientistas, bem como, facilitou o processo de cultura celular, tornando-o mais ágil, (Ryan 2008).

O presente capítulo tem como principais objectivos abordar os principais conceitos de culturas de células; nomeadamente, o conceito de linha celular, meio de cultura, avaliação da cultura e morfologia celular. Para tal, estruturou-se o mesmo da seguinte forma: primeiro, aborda-se os principais tipos de células; depois, algumas das características funcionais e morfológicas das culturas; de seguida, expõe-se técnicas para avaliação da cultura; e finalmente, apresenta-se um sumário.

1.2 Tipos de Culturas

As culturas primárias derivam directamente de tecido animal normal excisado, o qual é posteriormente transplantado para uma cultura ou, após dissociação por enzimas digestivas, é colocado sob a forma de células únicas em suspensão. Estas culturas são inicialmente heterogéneas, contudo com o passar do tempo tornam-se dominadas por fibroblastos. A preparação destas culturas ditas primárias é um processo que requer trabalho minucioso e demorado, apresentando como principal desvantagem um tempo de sobrevivência *in vitro* limitado. Apesar desta desvantagem, durante o seu curto período de vida, estas células têm como vantagem a capacidade de reter muitas das características de diferenciação observáveis em células *in vivo*, (SIGMA 2008). As culturas primárias obtidas pelo método de explantação são obtidas pela recolha cirúrgica de pequenas peças de tecido, que são posteriormente colocadas no vaso de cultura (de plástico ou vidro) emergido num meio de cultura. Alguns dias após, as células individuais são transferidas do tecido explantado e colocadas num outro vaso de cultura com substrato, onde se dividirão e crescerão. O segundo método para realização de culturas de células primárias, que é o mais amplamente utilizado, acelera o processo pela adição de enzimas digestivas (enzimas proteolíticas), como é o caso da tripsina e da colagenase, que vão fragmentar o tecido e clivar as ligações entre as células. Desta forma, cria-se uma suspensão de células únicas que é depois colocada num vaso de cultura com meio de cultura adequado para crescimento e divisão celular. Este método é denominado dissociação enzimática, Figura 1.1.



Figura 1.1. Representação do processo de dissociação enzimática em culturas primárias de células (adaptado de (Ryan 2008)).

Quando as células resultantes de culturas primárias desenvolvem-se e utilizam todo o substrato disponível na cultura, estas devem ser subculturadas para que possam continuar a crescer. Este processo é geralmente realizado com recurso a enzimas que gentilmente separam as células do substrato da cultura. Estas enzimas são similares às utilizadas durante o processo de dissociação enzimática a que as culturas primárias são submetidas e, uma vez, terminado o processo, a suspensão de células pode ser subdividida e colocada em novos vasos de cultura, (Ryan 2008).

Dado que as culturas primárias de células são isoladas de seres vivos, em particular para as ciências da saúde, de seres humanos ou de animais, estas apresentam populações heterogéneas, por exemplo, apresentam diferentes populações celulares e diferentes estados de diferenciação celular. Cada amostra removida do dador é, por isso mesmo, única e impossível de reproduzir exactamente. O processo de diferenciação deste tipo de células inicia-se no momento em que estas células são removidas do dador, pelo que tais culturas são dinâmicas e estão em constante alteração. Assim, as culturas primárias de células requerem comumente meios de cultura complexos e são sistemas extremamente difíceis de padronizar, (Hartung 2002).

Culturas de células contínuas são constituídas por um único tipo de células que se propagam em série durante um número limitado de divisões celulares (geralmente cerca de trinta) ou, em alguns casos, de forma ilimitada. O primeiro grupo (divisões celulares limitadas) usa, geralmente, células diplóides e mantém, habitualmente, um certo grau de diferenciação. O facto destas linhas celulares apresentarem senescência ao fim de trinta divisões celulares significa que práticas rigorosas de trabalho devem ser empregues para que estas consigam sobreviver períodos de tempo consideráveis. Por outro lado, o grupo das células que se propagam indefinidamente possui, frequentemente, esta capacidade devido ao facto de terem sido transformadas em células tumorais. As linhas de células tumorais derivam, frequentemente, de tumores reais, contudo, podem ser criadas por indução, utilizando oncogenes virais ou tratamentos químicos. Estas linhas apresentam como vantagem a disponibilidade quase ilimitada, contudo, retêm muito poucas características das células originais in vivo, (SIGMA 2008). Para além disso, as linhas celulares contínuas, por serem mais homogéneas e mais estáveis são, portanto, mais reprodutíveis que as populações de células primárias. Estas características advêm do facto de ocorrerem alterações fundamentais no fenotipo das células, logo após o isolamento do tecido do dador, (Hartung 2002).

Em suma, pode-se definir cultura de células como um tipo de cultura de tecidos que envolve um conjunto de técnicas que permitem cultivar e/ou manter células isoladas fora do

organismo de origem. Existem basicamente dois grandes grupos de culturas celulares: culturas primárias, as quais são obtidas directamente de tecidos, são heterogéneas, mantêm-se pouco tempo em cultura e são mais propícias ao desenvolvimento de contaminações; e linhas celulares, que são obtidas a partir de culturas primárias, podem ser células imortalizadas (devido a alterações genéticas), apresentam crescimento rápido e contínuo e proliferação ilimitada ou limitada a um número elevado de divisões celulares, Figura 1.2, (Coimbra 2008).

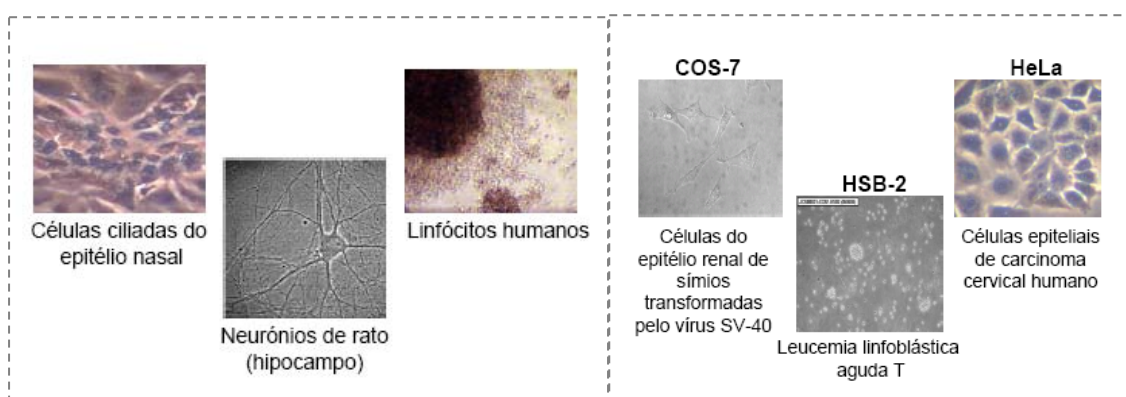


Figura 1.2. Células de culturas primárias (à esquerda) e linhas celulares (à direita) (retirado de (Coimbra 2008)).

As principais vantagens do uso de culturas de células incluem o controlo de condições ambientais, a análise independente de parâmetros, elevado número de testes num reduzido intervalo de tempo, redução dos ensaios com animais e técnica menos dispendiosa que a experimentação animal. Por outro lado, as principais desvantagens incluem: perda de características fenotípicas, sistema biológico fora do ambiente natural e ausência de sinais importantes, (Coimbra 2008).

O processo de criação de uma cultura de células *in vitro* envolve, de forma sucinta, o dador, as células ou tecido, o meio de cultura e o substrato. Estes componentes interagem e as propriedades do sistema na sua totalidade, bem como as suas variações, são o resultado indubitável de tais interacções, (Hartung 2002).

1.3 Morfologia e Características Funcionais

As culturas de células podem apresentar-se em duas formas: em suspensão e em monocamada aderente. A forma como estas se dispõem reflecte o tecido no qual tiveram origem, pelo que, culturas de células derivadas do sangue tendem a crescer em suspensão, enquanto

células derivadas de tecidos sólidos (como por exemplo: pulmão e rim) tendem a crescer em monocamadas aderentes, (SIGMA 2008).

As culturas celulares podem ser descritas com base na sua morfologia (forma e aspecto) ou com base nas suas características funcionais. Assim, podem ser divididas em três grandes grupos, (Ryan 2008):

- Epiteliais: células que aderem ao substrato e apresentam forma achatada e poligonal;
- Linfoblásticas: células que, normalmente, não aderem ao substrato, permanecendo em suspensão com uma forma esférica;
- Fibroblásticas: células que estão aderidas ao substrato e apresentam-se alongadas, bipolares e frequentemente formam “remoinhos”.

O uso de técnicas de fusão tornou possível o desenvolvimento de células híbridas pela junção de dois tipos de células diferente. Estas podem exibir características de uma das células mãe ou das duas. Esta técnica foi utilizada em 1975 para criar células capazes de produzir anticorpos monoclonais específicos, (Ryan 2008). As referidas células, denominadas hibridomas, são formadas pelo uso de duas células diferentes, mas relacionadas entre si. A primeira é um linfócito derivado do baço com capacidades de produzir o anticorpo desejado; enquanto, a segunda é uma célula de melanoma com grande capacidade de proliferação, a qual é programada para produzir grandes quantidades de anticorpos, mas não para produzir o anticorpo.

As características das culturas de células resultam da relação entre a sua origem e a forma de adaptação destas às condições da cultura celular. Marcadores bioquímicos podem ser utilizados para determinar se as células continuam a desempenhar funções especializadas, da mesma forma que enquanto presentes nos tecidos *in vivo*. Marcadores morfológicos e ultraestruturais podem também ser examinados. Frequentemente, estas características são perdidas ou alteradas como resultado do processo de colocação no ambiente artificial da cultura de células. Algumas linhas celulares podem, eventualmente, parar a sua divisão celular, demonstrando sinais de envelhecimento contínuos. Estas células são denominadas finitas. Outras linhas, ditas “imortais” continuam a dividir indefinidamente, sendo denominadas linhas celulares contínuas. Quando uma linha celular dita “normal” se transforma numa linha imortal, realizando deste modo, uma alteração irreversível ou transformação, quer intencionalmente (pela utilização de fármacos, radiação ou vírus) quer de forma espontânea, diz-se que são células transformadas. Como características principais, estas células apresentam um crescimento, geralmente, mais fácil e rápido; contudo, apresentam, frequentemente, cromossomas anormais e

extranumerários. As células que apresentam número normal de cromossomas são denominadas células diplóides, enquanto aquelas que apresentam número alterado de cromossomas são denominadas aneuplóides, (Ryan 2008).

1.4 Meios de Cultura

Um meio de cultura consiste numa solução base definida, normalmente constituída por sais, açúcares e aminoácidos, bem como, alguns suplementos misturados, dependendo do tipo de células, (Hartung 2002).

Para muitos investigadores, um ambiente saudável para a sobrevivência das células em cultura deve ser aquele que permita, pelo menos, um aumento do número de células devido à divisão celular (mitose). Adicionalmente, quando as condições do meio de cultura são as ideais, as células podem apresentar funções fisiológicas e bioquímicas similares às que apresentam *in vivo*, tais como, contracção muscular ou secreção de enzimas ou hormonas. Para alcançar este meio de cultura ideal é importante considerar a temperatura, o substrato para adesão da camada de células e o meio de cultura.

A temperatura do meio é, geralmente, colocada à temperatura corporal do dador de onde foram retiradas as células; atendendo a que, vertebrados de sangue frio apresentam temperaturas entre 18 e 25 °C, enquanto os mamíferos exibem uma temperatura entre 36 e 37 °C. A manutenção da temperatura na cultura de células é conseguida pelo uso de incubadoras bem calibradas e ajustadas.

Para células que necessitam de um substrato para suporte este deve ser capaz de fornecer capacidade de suporte, mas também crescimento. Os substratos mais comuns são o vidro e alguns tipos de plástico tratados. Para além disso, devem ser adicionados factores de adesão, tais como, o colagénio, gelatina, fibronectina e laminina, que melhorarão o crescimento e função normal de células derivadas do cérebro, vasos sanguíneos, rins, fígado, pele e muitos outros. Muitas vezes, as células que aderem podem funcionar melhor quando a superfície de adesão é permeável ou porosa, pois deste modo podem polarizar de forma similar ao que sucede no interior do corpo.

Como referido, o meio de cultura é um factor importante e complexo em termos de controlo para alcançar um meio de cultura desejado pois, para além dos requisitos nutricionais, o meio de cultura necessita de factores de crescimento, regulação do pH e osmolalidade e fornecimento de gases essenciais (como oxigénio e dióxido de carbono). Os nutrientes

fornecidos possibilitam às células a produção de proteínas e outros componentes essenciais para o crescimento e funcionamento, bem como, a produção de energia necessária para o metabolismo. Por outro lado, os factores de crescimento e as hormonas auxiliam na regulação e controlo da taxa de crescimento celular e das características funcionais. É comum, em vez de se adicionarem estes componentes directamente ao meio de cultura, adicionar-se 5 a 20% de soro animal ao meio. Contudo, tal procedimento acrescenta variabilidade, dado que, os soros são fornecidos por diferentes produtores e dentro do mesmo produtor por diferentes animais, pelo que muitas vezes surgem problemas em controlar o crescimento e função celular. Quando as células normais funcionais estão em crescimento, o soro é geralmente substituído por factores de crescimento específicos.

No meio deve-se também controlar o pH, para evitar alterações abruptas deste. Usualmente um *buffer* (solução tampão) de CO₂-bicarbonato ou um *buffer* orgânico são utilizados para manter o pH do meio num intervalo de 7.0 a 7.4, dependendo do tipo de células. Quando se utiliza o *buffer* CO₂-bicarbonato é necessário controlar e regular a quantidade de CO₂ dissolvida no meio. Tal procedimento é, geralmente, realizado pelo incubador com controlos de CO₂ e deve fornecer uma atmosfera com cerca de 2 a 10% de CO₂. Por outro lado, alguns meios com CO₂-bicarbonato não necessitam de CO₂ adicional; contudo, nestes casos deve-se utilizar um vaso de cultura selado, (Ryan 2008). A maioria dos meios de cultura disponíveis comercialmente inclui fenol vermelho como indicador de pH, cuja função é monitorizar constantemente o estado do pH em culturas celulares pela mudança de cor. Geralmente, o meio de cultura deve ser mudado quando a cor muda para amarelo (meio ácido) ou púrpura (meio alcalino), (SIGMA 2008).

Por último, a osmolalidade (pressão osmótica) do meio de cultura é importante, pois auxilia a regular o fluxo de substâncias do interior para o exterior das células. Assim, a evaporação observada em meios de cultura em vasos abertos vai diminuir rapidamente a osmolalidade resultando em células danificadas, mortas ou em *stress*. Nestes casos os incubadores com altos níveis de humidade podem reduzir a evaporação ao estritamente essencial, (Ryan 2008).

Os constituintes básicos de um meio de cultura incluem: sais inorgânicos, carboidratos, aminoácidos, vitaminas, ácidos gordos e lípidos, proteínas e péptidos e soro. As principais funções destes constituintes são descritas em seguida.

Os sais inorgânicos ajudam a manter o equilíbrio osmótico entre células e regulam o potencial de membrana pelo fornecimento de iões cálcio, sódio e potássio. Todos estes iões são igualmente requeridos pela matriz de adesão celular, assim como co-factores enzimáticos.

Os carboidratos, geralmente na forma de açúcares, são a maior fonte de energia das culturas de células. Os açúcares mais utilizados em culturas celulares incluem a glucose e a galactose, contudo alguns meios podem necessitar de maltose ou frutose. A concentração de açúcares no meio basal varia entre 1 e 4.5 g/L em meios mais complexos. Um meio com elevadas concentrações de açúcares é capaz de sustentar o crescimento de um vasto espectro de tipos de células.

O soro da cultura de células é frequentemente a fonte de vitaminas para a cultura de células; contudo, muitos meios podem ser enriquecidos com vitaminas de forma a tornarem-se mais capazes de suportar um vasto número de células. As vitaminas são precursoras de inúmeros co-factores, sendo que várias vitaminas, particularmente as do grupo B, são essenciais para o crescimento e proliferação celular e, nalguns tipos de células, a vitamina B12 é primordial. Alguns meios de cultura apresentam também níveis aumentados de vitamina A e E, mas as vitaminas mais utilizadas num meio de cultura são a riboflavina, tiamina e biotina.

As proteínas e os péptidos são utilizados para repor aqueles que estavam normalmente presentes no ambiente celular normal. As proteínas e péptidos mais comuns incluem a albumina, a transferrina, a fibronectina e a fetuína. À semelhança das proteínas e péptidos, os ácidos gordos e lípidos são importantes constituintes do soro e os mais comuns incluem o colesterol e os esteróides essenciais para células especializadas.

Alguns elementos vestigiais podem ser encontrados no soro, tais como, zinco, cobre, selénio e ácido tricarbóxico, que apresentam as mais variadas funções. O selénio, por exemplo, é um desintoxicante que ajuda na remoção dos radicais livres do oxigénio.

O soro é uma mistura complexa de albumina, factores de crescimento e inibidores de crescimento, sendo muito provavelmente um dos componentes mais importantes nos meios de cultura celulares. O mais comumente utilizado é o soro fetal bovino. Como principais funções apresenta: protecção mecânica, capacidade tampão em culturas com taxas de proliferação reduzidas e ligação e neutralização de toxinas, (SIGMA 2008).

1.5 Avaliação e Contaminação da Cultura

A avaliação do desempenho da cultura de células é geralmente baseada em quatro características celulares importantes: morfologia, crescimento celular, eficácia da cultura e expressão de funções especiais, (Ryan 2008).

A morfologia ou forma da célula é o mais fácil de determinar, porém é frequentemente de pouca utilidade. Apesar de alterações da morfologia celular serem muitas vezes observadas em culturas de células, é contudo difícil relacionar essas observações com as condições que as causaram. Por outro lado é, igualmente, difícil quantificar ou medir precisamente essa alteração. O primeiro sinal de que algo não está bem na cultura de células ocorre, quando, ao serem examinadas ao microscópio, as células apresentam padrões de adesão ou crescimento pobres ou pouco usuais. Quando existem suspeitas de problemas, pulverizar o vaso de cultura com violeta cristal ou outro corante histológico demonstra qual o padrão de crescimento e, deste modo, indica o possível problema.

A contagem de células ou qualquer outro método para estimar o número de células permite determinar a taxa de crescimento celular. Esta determinação possibilita um desenho da experiência mais detalhado para determinar quais as condições (meio de cultura, soro, substrato, entre outras características) são melhores para as células; isto é, as condições que produzem uma maior taxa de crescimento. Esta técnica de contagem de células pode também ser utilizada para medir a sobrevivência celular ou a morte celular, sendo frequentemente utilizada nos ensaios citotóxicos *in vitro*, (Ryan 2008).

De forma a analisar as características de crescimento celular de um tipo particular de células, pode-se traçar uma curva de crescimento a partir da qual se pode obter o tempo de duplicação da população, o tempo em *lag fase* e a densidade de saturação. Esta curva de crescimento demonstra a *lag fase*, que representa o tempo que a célula demora a recuperar da subcultura, juntamente com o tempo de aderência e de disseminação celular (cerca de 48 horas, embora em 12 a 24 horas as células já recuperaram da tripina e reconstruíram o seu citoesqueleto, segregaram matriz para adesão e espalharam-se pelo substrato); a *log fase* é o momento do gráfico em que o número de células começa a aumentar exponencialmente; e finalmente, a fase de *plateau* na qual a cultura se torna mais densa e diminui ou interrompe a sua taxa de crescimento. Apesar das curvas de crescimento, Figura 1.3, apresentarem muita informação, estas são muito morosas e trabalhosas para serem utilizadas na monitorização da cultura de células. Assim, o uso de um hemocitómetro ou um contador de partículas electrónico fornece uma medição mais directa e simples do número de células e, portanto, do crescimento celular. As células podem ser contadas antes, durante e após a experiência para, de uma forma eficaz e precisa, quantificar e padronizar as condições experimentais. Adicionalmente, o uso de azul tripano quando se utiliza do hemocitómetro, Figura 1.4, fornece ao investigador uma avaliação quantitativa da viabilidade celular pelo cálculo das contagens diferenciais das células que excluem o azul tripano (células doentes ou normais) das que captam (células

indubitavelmente mortas). Esta técnica é a menos dispendiosa, mas é trabalhosa na aplicação do método completo; contudo, fornece informação fiável do número total de células e ainda o número de células viáveis, (Mather 1998; Freshney 2006).

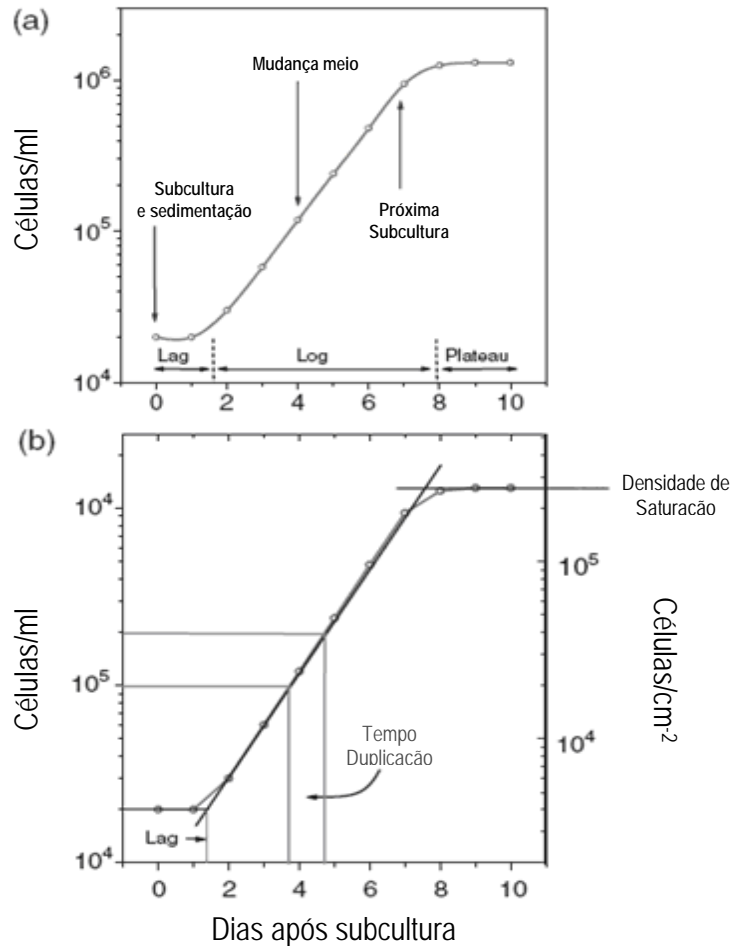


Figura 1.3. Curvas de crescimento celular: (a) Aumento do número de células numa escala logarítmica em função dos dias decorridos após subcultura; (b) Parâmetros cinéticos que podem ser derivados da curva (a) (adaptado de (Freshney 2006)).

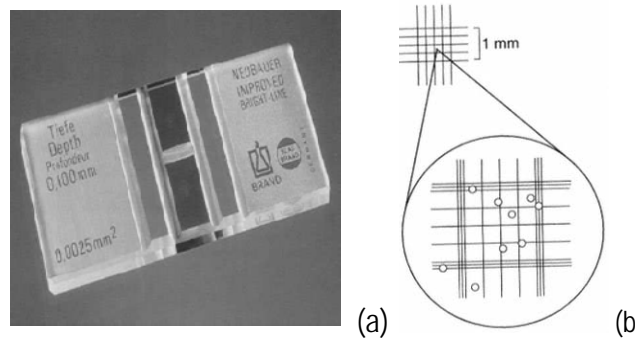


Figura 1.4. Hemocitómetro e determinação do número de células ((a) adaptado de (Mather 1998; Coimbra 2008) e (b) de (Mather 1998)).

A eficácia da cultura é um método de teste no qual um reduzido número de células (entre 20 e 200) é colocado num vaso de cultura, medindo-se o número de colónias que se formam. A percentagem de colónias que se formam constitui uma medida de sobrevivência celular, enquanto o tamanho das colónias representa a taxa de crescimento. Este método de teste é similar ao aplicado na análise da taxa de crescimento celular; contudo, é mais sensível a pequenas variações em condições de cultura celular, (Ryan 2008).

No método de determinação da eficácia da cultura, dado que a razão volume do meio/volume de células é muito elevada, existe um impacto mínimo das células sobre o ambiente; por isso, a possibilidade das células metabolizarem e converterem os aminoácidos em compostos tóxicos ou secretarem factores de crescimento autócrinos é muito reduzida. Assim, este parâmetro é considerado muito útil na avaliação dos requisitos nutricionais das células, para comparação dos lotes de soro e avaliação dos componentes tóxicos a testar. Existem ainda muitos investigadores que preferem este método ao método de determinação da taxa de crescimento na avaliação dos efeitos dos factores de crescimento. Apesar disto, as concentrações óptimas de nutrientes e factores de crescimento obtidas por este teste, podem não ser adequadas para suportar elevadas densidades celulares. A eficácia da cultura é determinada pelo quociente entre as colónias formadas e as colónias cultivadas, (Mather 1998).

A última característica a avaliar é a expressão de funções especializadas. Esta é geralmente mais difícil de medir e de observar, pelo que, testes bioquímicos e imunológicos podem ser utilizados para a sua determinação. Apesar de algumas culturas de células poderem crescer em condições subóptimas, funções altamente especializadas requerem, frequentemente, condições de cultura quase perfeitas.

A contaminação de culturas de células divide-se em dois grandes grupos: químicas e biológicas. Os contaminantes químicos são os mais difíceis de detectar, dado que, são causados por agentes como as toxinas, iões metálicos e vestígios de desinfectantes químicos. Os contaminantes biológicos na forma de bactérias ou fungos apresentam, frequentemente, efeitos visíveis sobre a cultura de células (alterações de pH, por exemplo), sendo por isso mais fáceis de detectar, principalmente quando os antibióticos são omitidos do meio de cultura. Contudo, duas formas de contaminação biológica, por micoplasmas e vírus, não são facilmente detectados visualmente e requerem métodos especiais de detecção.

As principais regras para evitar contaminação de cultura de células são: treino adequado e técnicas assépticas por parte do investigador e equipamento esterilizado e correctamente monitorizado, (Ryan 2008).

As contaminações biológicas detectáveis a olho nu podem, por isso, ser controladas com rigor através de uma observação diária da cultura de células ao microscópio; contudo, no caso de infecção da cultura de células por micoplasmas ou vírus, as alterações podem passar despercebidas, mas podem por outro lado incluir: redução da taxa de crescimento, alterações morfológicas, aberrações dos cromossomas e alterações do metabolismo dos aminoácidos e ácidos nucleicos, (SIGMA 2008).

A investigação utilizando culturas de células ou os bancos de células deve apresentar as mesmas livres de contaminações e em estado saudável. O uso continuado de antibióticos e agentes anti-fúngicos pode, por vezes, mascarar a presença destes organismos, conduzindo ao desenvolvimento de estirpes mais resistentes e, portanto, mais difíceis de eliminar. Por este motivo, é importante avaliar periodicamente a presença de contaminação da cultura de células.

O primeiro passo para detectar contaminação bacteriana ou fúngica consiste na observação macroscópica e microscópica. Uma vez detectada a contaminação, todos os reagentes e soros utilizados na cultura de células, bem como, a própria cultura têm que ser destruídos com hipoclorito de sódio e, posteriormente, descartados.

Dado que se utiliza soro e tripsina natural como suplementos aos meios de cultura, bem como, para a realização de subculturas, o risco de contaminação por estes agentes deve ser sempre considerada. Para além disso, a contaminação por vírus pode surgir de outras fontes, tais como, o tecido ou órgão do dador ou factores de crescimento contaminados por outras culturas infectadas. A eliminação das contaminações por vírus é difícil e não existe um teste universal para identificação deste tipo de contaminantes, pelo que, os vírus podem ser identificados utilizando um vasto leque de testes moleculares e imunológicos. Estes testes incluem, usualmente, os patógenos potencialmente perigosos para os humanos, como por exemplo, o HIV. A monitorização de vírus deve ser realizada cada 3 a 4 meses.

O micoplasma é um organismo sub-microscópico que atravessa os filtros de 0.22 μm utilizados para a filtração estéril dos reagentes e soros utilizados nas culturas celulares. Ao contrário das infecções por bactérias comuns, as provocadas pelo micoplasma não resultam em alterações visíveis da cultura. Actualmente, têm surgido testes dedicados ao teste de micoplasma em culturas de células, sendo que, estes devem ser realizados cada dois meses, (Besta 2004).

1.6 Sumário

Pretendeu-se como presente capítulo apresentar e descrever os conceitos fundamentais de culturas de células, com particular importância nos relacionados com diferentes tipos de culturas de células, morfologia de diferentes células e principais processos de avaliação da cultura de células.

Neste capítulo verificou-se que o uso de linhas celulares face às culturas primárias apresenta algumas vantagens; nomeadamente, a sua maior padronização e facilidade de manipulação e desenvolvimento em meio laboratorial. Verificou-se ainda que existem diferentes morfologias de células, que podem ser, geralmente, classificadas em três grupos, que são: epiteliais, linfoblásticas e fibroblásticas. Adicionalmente, observou-se que o meio de cultura é um componente muito importante na cultura de células e que uma avaliação de contaminações, bem como a monitorização da cultura devem ser realizadas periodicamente.

Capítulo II. Citometria de Fluxo e Avaliação dos Efeitos da Radiação em Culturas de Células

2.1 Introdução

Dois modelos distintos de morte celular, necrose e apoptose, distinguem-se com base nas diferenças morfológicas, bioquímicas e alterações moleculares que ocorrem nas células aquando do seu processo de morte, (Hanon E. 1996). A necessidade de obter informação dos processos biológicos, nomeadamente processos de morte celular, tem conduzido ao aparecimento e utilização de múltiplos equipamentos e técnicas para o efeito, (Silva 2004). Uma das técnicas utilizadas para avaliar tais processos biológicos é a citometria de fluxo.

Sabe-se que, a radiação ionizante é um agente potencialmente danificador do ADN, quer seja por efeitos directos, quer seja por efeitos indirectos sobre as células irradiadas. A indução de aberrações cromossómicas, bem como, de alterações no ciclo celular, mitose aberrante ou morte celular podem aumentar com o aumento da dose de irradiação, (Baatout 2004).

Frequentemente, para que se possam estudar os efeitos da radiação em termos de biologia celular, particularmente, indução de apoptose, usa-se a citometria de fluxo. Esta é uma ferramenta muito útil e de fácil utilização, sendo capaz de fornecer informações sobre células em fases iniciais de apoptose, células em fase final de apoptose, células necróticas, entre outras informações.

A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa de análise celular, tendo-se desenvolvido o primeiro citómetro de fluxo em 1970 e, a partir daí, este tem-se tornado um instrumento essencial nas ciências biológicas. De entre as suas múltiplas aplicações salientam-se aquelas relacionadas com hematologia, enumeração reticulócita, análise da função celular, cinética do ciclo celular, genética, biologia molecular e microbiologia, (Riley 2005; Nolla 2008).

No presente capítulo pretende-se expor alguns dos conceitos chave para a compreensão da citometria de fluxo, designadamente, pela enumeração de algumas características do citómetro de fluxo e pela comparação desta técnica com a microscopia tradicional. Para além disso, pretende-se ainda expor a utilidade da citometria de fluxo na avaliação dos efeitos da radiação em culturas de células. Assim, o capítulo foi organizado por temas, começando pelo citómetro de fluxo, vantagens e desvantagens da citometria de fluxo e sua utilidade na avaliação dos efeitos da radiação em células.

2.2 Citómetro de Fluxo: Principais Características

Um citómetro de fluxo é um sistema constituído por 5 elementos: fonte de luz, (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para selecção de um intervalo de comprimento de onda específico, a partir duma gama espectral mais vasta, fotodíodos ou fotomultiplicadores para a detecção sensível e processamento dos sinais com interesse e uma unidade que processa os dados recolhidos, Figura 2.1.

A suspensão celular é injectada e atravessa a câmara onde se dá a passagem célula a célula através do feixe de luz, perpendicular ao fluxo. A passagem individual das células é obtida através da focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra, sendo esta injectada no seio de uma solução salina (*sheath fluid*) que também atravessa a câmara, Figura 2.2. A diferença de velocidades entre os dois fluidos faz com que o fluxo se processe em regime laminar. A velocidade de escoamento da solução de revestimento (*sheath fluid*) é superior à da amostra, e ajustável, o que permite reduzir e controlar a espessura da solução da amostra para que possa passar uma célula de cada vez. Desta forma, podem detectar-se até 10000 células (eventos) por segundo. O feixe de luz de excitação ao interceptar a célula na câmara, sofre dispersão quer na direcção frontal (*forward scattering - FS*), quer lateral (*side scattering*). A luz assim dispersa é detectada directamente por fotodíodos (dispersão frontal) ou pode ser desviada a 90° por lentes, espelhos dicróticos e filtros ópticos e focada em fotomultiplicadores.

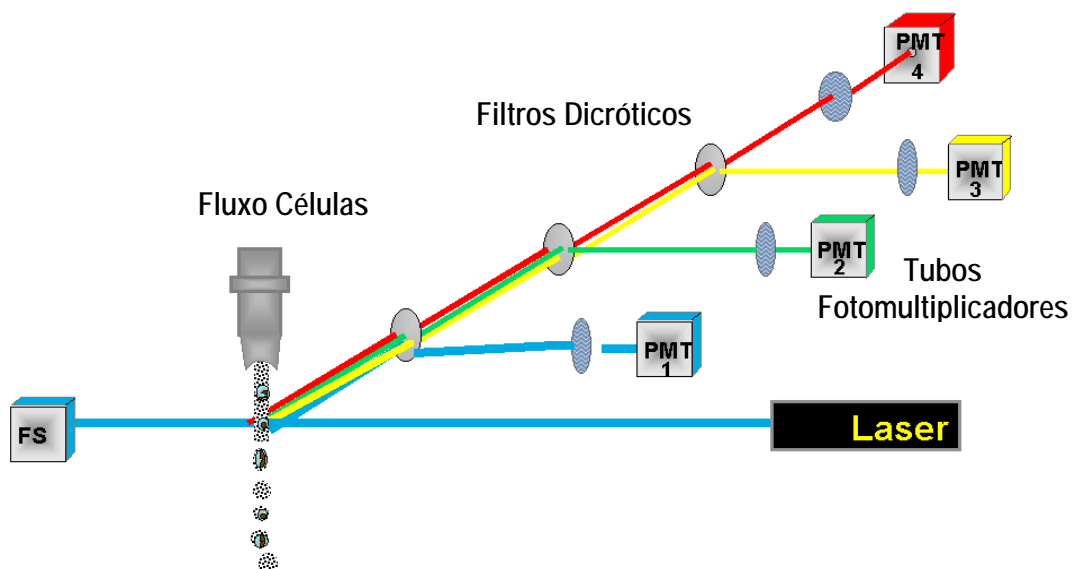


Figura 2.1. Esquema da constituição interna de um citómetro de fluxo; deve-se notar o sistema de lentes (adaptado de (Caprioglio 2008)).

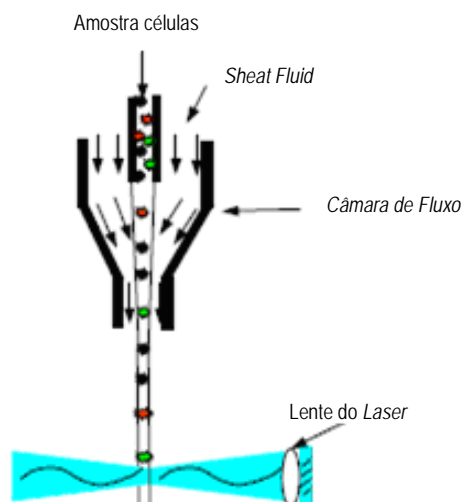


Figura 2.2. Representação de uma câmara de fluxo; a passagem individual das células (eventos) é conseguida pela focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra no seio da solução salina (*sheat fluid*) (adaptado de (Nolla 2008)).

A combinação dos dois tipos de luz dispersa revela informações importantes, nomeadamente, a dimensão celular, a granularidade/complexidade e a morfologia.

Compostos intracelulares com fluorescência intrínseca (ex: clorofilas, ficobiliproteínas, NAD(P)H, etc.) ou passíveis de se ligarem a corantes fluorescentes (fluorocromos), permitem a diferenciação selectiva de subpopulações com base na combinação de vários fluorocromos. A fluorescência destes compostos é também detectada por fotomultiplicadores, através de um sistema de lentes, espelhos dicróticos e filtros ópticos, Figura 2.1.

Os citómetros actuais mais sofisticados podem possuir até 16 detectores em simultâneo (luz dispersa e fluorescente), o que permite analisar múltiplas possibilidades de características celulares e/ou componentes celulares de um elevado número de células de forma individual. Esta versatilidade designa-se por análise multiparamétrica, (Silva 2004).

Em resumo, a preparação de suspensões e células é necessária para a realização da análise por citometria de fluxo. Vários corantes imunofluorescentes ou anticorpos são adicionados aos antígenos ou às proteínas de interesse. A suspensão de células é “aspirada” para um fluxo de células, o qual se encontra envolvido numa corrente de fluído, e vai passando ao longo de um feixe *laser*. A luz pode ser absorvida ou desviada assim que embate na célula, sendo que, aquela que é absorvida, quando apresenta o comprimento de onda apropriado, é reemitida como fluorescência, caso a célula apresente substância fluorescente ou mais do que um anticorpo marcado com fluorocromo na superfície da célula ou no seu interior. Por sua vez, a dispersão da

luz depende da estrutura interna da célula, do seu tamanho e forma. As substâncias fluorescentes absorvem luz com um dado comprimento de onda e re-emitem diferentes comprimentos de onda. Finalmente, a luz e/ou sinais desviados fluorescentes são detectados por uma série de fotodíodos, sendo posteriormente amplificados. Alguns filtros ópticos presentes são essenciais para bloquear luz indesejada, permitindo que apenas a luz com o comprimento de onda desejado atinja o fotodetector, (Riley 2005).

2.3 Vantagens e Desvantagens da Citometria de Fluxo

A informação que se pode retirar dos ensaios de viabilidade clássicos, sobre os estados fisiológicos das células, é limitada a dois níveis extremos de actividade metabólica: o saudável, presente em células viáveis com capacidade para se dividirem, e o correspondente à morte celular. Contudo, por vezes, as células encontram-se num estado fisiológico intermédio entre o metabolicamente activo e a morte celular, sendo que, o método tradicional não contabiliza essas células.

A vantagem da citometria de fluxo em analisar células individualmente consiste na detecção de uma variedade de estados fisiológicos celulares intermédios que realmente existem numa determinada população, descobrindo assim uma heterogeneidade populacional. Para além disso, os dados obtidos através das técnicas clássicas são relativos à cultura como um todo, ou seja, uma amostra representativa da cultura apresenta um único valor, referente à média dos valores de um determinado parâmetro, de todas as células. Contudo, numa população celular, as células não se encontram todas no mesmo estado metabólico e fisiológico, pelo que se torna necessário detectar e descrever as várias subpopulações de forma diferenciada. Mais uma vez, a citometria de fluxo permite a avaliação da heterogeneidade de culturas, à escala da célula individual. Desta forma, dados “discretos” representando subpopulações diferentes podem fornecer uma “imagem” mais detalhada e real da complexidade e heterogeneidade que ocorre num determinado bioprocessos. Por estes motivos, a citometria de fluxo tem tido, cada vez mais, impacto na comunidade científica.

A combinação de vários fluorocromos em citometria de fluxo permite a diferenciação de diferentes subpopulações numa determinada população, correspondentes a diferentes níveis de funcionalidade das células. Esta diferenciação levou à introdução do termo “viável, mas não culturável”, aplicado a células que não estando metabolicamente activas, também não estão mortas e, evidentemente, não são reveladas através dos ensaios de viabilidade celular. A

utilização de critérios do funcionamento celular tais como o potencial da membrana citoplasmática e a integridade da mesma, permitem caracterizar estes estados metabólicos.

De forma geral, a utilização da mistura de diversos corantes permite a diferenciação dos seguintes estados metabólicos funcionais: células saudáveis (com capacidade para se dividirem), “vitais”, intactas e permeabilizadas. Pensa-se que quando uma célula se encontra sob *stress*, alguns dos sistemas de transporte activo são afectados (células “vitais”), seguindo-se a despolarização da membrana citoplasmática (células intactas) e, mais tarde, a sua permeabilização (células mortas). Células sem a membrana citoplasmática intacta não conseguem manter ou gerar o gradiente de potencial electroquímico que origina o potencial de membrana. Além disso, a sua estrutura interna, não estando protegida por uma membrana citoplasmática intacta, encontra-se livremente exposta ao meio ambiente, pelo que estas células acabarão por se decompor. Todas estas etapas conduzem à morte celular.

Assim, é possível diferenciar o estado fisiológico de uma célula individual, para além do clássico e estrito conceito de viabilidade, baseado no funcionamento de alguns sistemas de transporte activo, ou na presença ou ausência da membrana citoplasmática intacta e polarizada. A citometria de fluxo surge assim como uma técnica consistente e fiável na detecção das verdadeiras percentagens de células viáveis e mortas, numa determinada população de células.

Uma comparação entre a microscopia pelo método clássico e a citometria de fluxo permite distinguir estas duas técnicas em seis pontos fundamentais. Em primeiro lugar, na microscopia são utilizadas células imobilizadas, realizando-se uma contagem manual; por outro lado, na citometria de fluxo, as células são analisadas em suspensão e vão passando em fila única pela frente do *laser*. A detecção, no método clássico, é visual, enquanto, na citometria de fluxo é realizada uma detecção electrónica. No método clássico detectam-se centenas de células, com uma taxa de análise de 100 células por minuto, enquanto, na citometria de fluxo se detectam milhares a milhões de células, com uma taxa de 2000 a 5000 células por segundo. A sensibilidade do método clássico é reduzida, detectando-se apenas expressões proteicas marcadas, o que contrasta com a sensibilidade do método por citometria de fluxo, que apresenta elevada sensibilidade, mesmo para expressões proteicas diminuídas. Finalmente, no método clássico a avaliação é quantitativa, mas descreve apenas duas possibilidades, célula viva ou célula morta; o que apresenta desvantagens, como explicado anteriormente. A citometria de fluxo, por sua vez, é também um método quantitativo, mas a fluorescência de cada célula é classificada, (Silva 2004).

2.4 Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação em Culturas de Células

Para além das múltiplas vantagens da citometria de fluxo previamente explicadas, esta permite ainda, uma rápida análise do ADN, da expressão fenotípica e da função celular. A avaliação quantitativa desta técnica tem sido muito utilizada na avaliação do transporte de fármacos, fluxo do cálcio, proliferação e apoptose celular. Sabendo destas potencialidades da citometria de fluxo, e de muitas outras, alguns investigadores passaram a utilizar a citometria de fluxo para monitorizar os efeitos da radiação na distribuição de ADN pelo ciclo celular em células de mamíferos.

O conteúdo de ADN de cada célula pode ser medido, podendo ser utilizado para estimar a distribuição celular no ciclo celular. O ciclo celular divide-se em várias fases: fase G_1/G_0 , fase S (síntese ADN), fase G_2 e fase M (mitose). O conteúdo de distribuição de ADN numa população celular típica em crescimento celular caracteriza-se por dois picos em G_1/G_0 e G_2/M e um vale na fase S . As células na fase G_2/M apresentam o dobro da quantidade de ADN que a fase G_1/G_0 , sendo que a fase S apresenta variações da quantidade de ADN entre as fases G_1 e G_2 , Figura 2.3. A monitorização do ciclo celular, bem como a sua regulação, é fundamental para compreensão dos efeitos da radiação na célula.

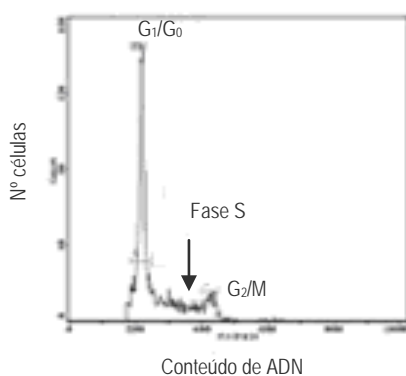


Figura 2.3. Representação do ciclo celular medido por citometria de fluxo com uso de iodeto de propídio (adaptado de (Baatout 2004)).

Nas células eucarióticas, a radiação ionizante causa atrasos na divisão, nomeadamente no período G_2 , sendo este atraso proporcional ao tipo de célula, posição da célula no ciclo celular e dose absorvida. Este atraso serve frequentemente para que a célula repare os danos ao ADN, Figura 2.4.

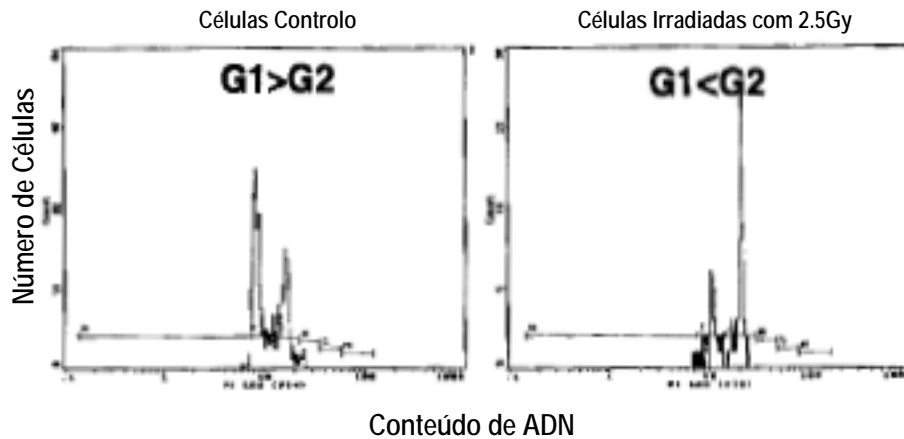


Figura 2.4. Representação gráfica obtida com citometria de fluxo em células controlo e células irradiadas, de notar o atraso na fase G_2 ; resultados obtidos com uso de iodeto de propídio (adaptado de (Baatout 2004)).

A apoptose caracteriza-se, basicamente, por alterações morfológicas, que incluem aumento da granularidade citoplasmática, retracção celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos. Esta morte celular programada pode surgir espontaneamente ou por agressões de estímulos externos, nomeadamente, pela radiação ionizante. A citometria de fluxo permite também detectar apoptose radioinduzida pelo uso de iodeto de propídio e anexina V, Figuras 2.5 e 2.6, (Baatout 2004).

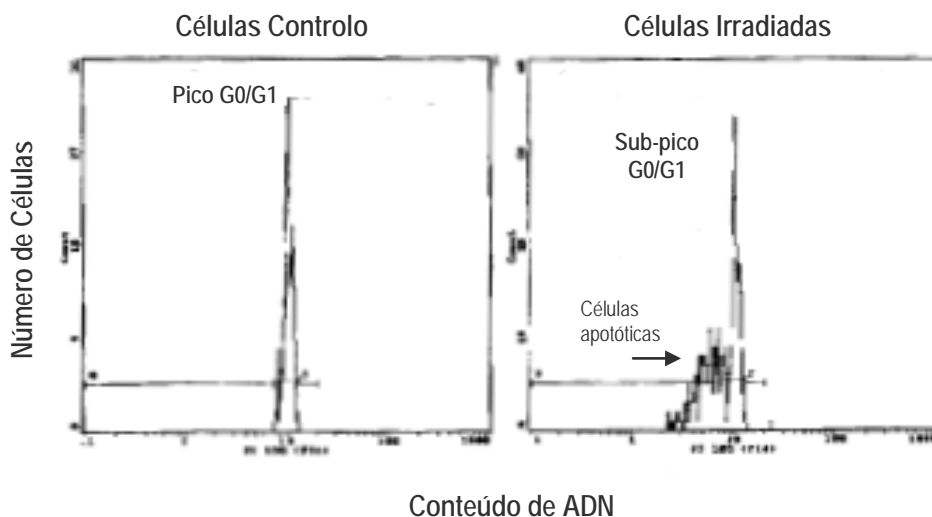


Figura 2.5. Detecção de apoptose em linfócitos humanos irradiados, utilizando o iodeto de propídio (adaptado de (Baatout 2004)).

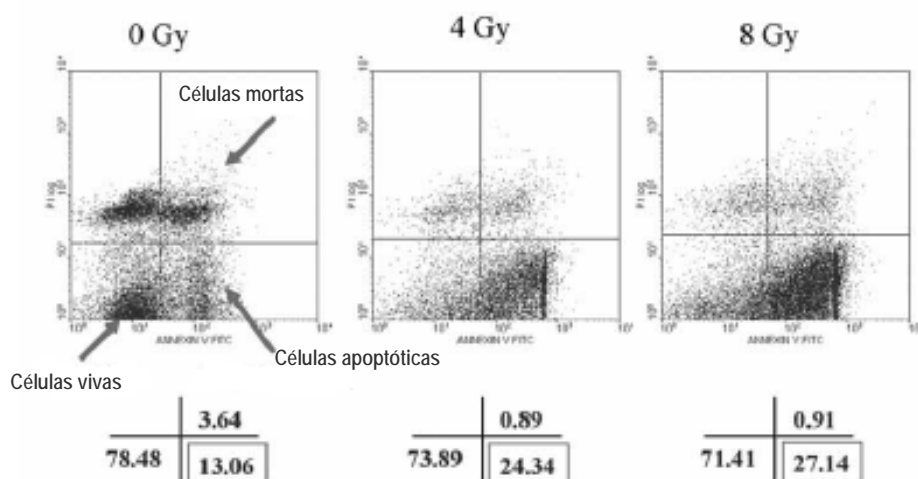


Figura 2.6. Avaliação da integridade da membrana de leucócitos com anexina V; verifica-se um aumento do número de células apoptóticas com o aumento da dose (adaptado de (Baatout 2004)).

A anexina V é utilizada para reconhecer fosfatidilserina translocada e, uma vez associada ao iodeto de propídio, que funciona como corante de exclusão de viabilidade celular, permite detectar células apoptóticas e discriminar entre apoptose (precoce e tardia) e necrose, (Baatout 2004). A viabilidade celular pode ser avaliada com base em alterações morfológicas ou alterações na permeabilidade da membrana e/ou estado fisiológico inferido a partir da exclusão de certos corantes ou a retenção de outros. As células vivas apresentam membranas intactas e podem ser avaliadas pela sua capacidade de excluir corantes que rapidamente entram para células mortas ou danificadas. O uso de iodeto de propídio tem sido utilizado na maioria das culturas celulares para a avaliação de células não viáveis. A sua vasta aplicação tem por base o facto do seu procedimento de realizar ser simples, pois as células danificadas coram de vermelho vivo, sendo por isso facilmente identificadas, (Coder 1997). Em suma, o iodeto de propídio não atravessa a barreira da membrana celular em situações normais; contudo, quando penetra na célula significa que a membrana está danificada, o que implicará a presença de uma célula danificada ou morta.

Um dos sinais mais precoces de apoptose é a translocação de fosfolípidos da membrana celular, a fosfatidilserina, da camada interna da membrana celular para a camada externa. Uma vez exposta ao ambiente extracelular, os locais de ligação da fosfatidilserina translocada tornam-se disponíveis para a anexina V, a qual apresenta dependência do ião cálcio (Ca^{2+}), Figura 2.7.

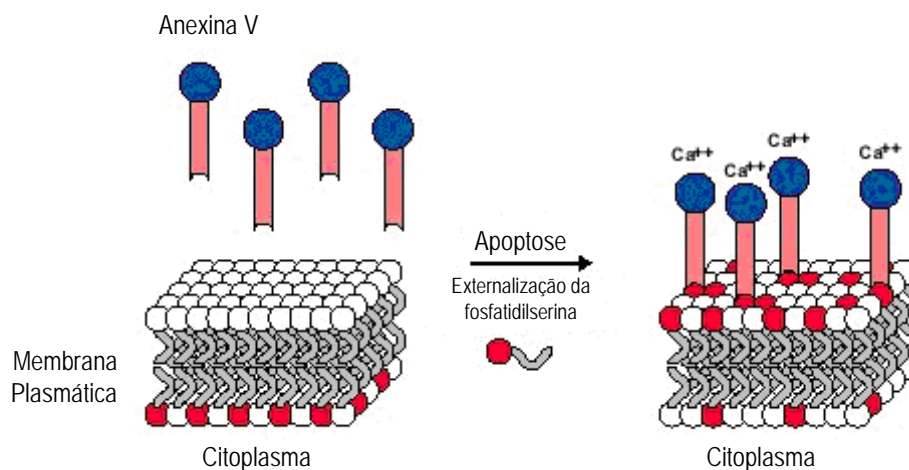


Figura 2.7. Representação esquemática da ligação da anexina V à membrana plasmática em células apoptóticas (à direita) e a ausência de ligação em células normais (à esquerda) (adaptado de (BD 2007)).

Uma vez que a translocação da fosfatidilserina também ocorre em situações de necrose, a anexina V não é um marcador absoluto de apoptose, pelo que, deve ser utilizada em conjunto com corantes essenciais, nomeadamente o iodeto de propídio, os quais penetram nas células quando a integridade membrana plasmática está afectada, o que ocorre apenas nos estádios finais da apoptose ou em casos de necrose celular. Assim, células que sejam negativas à anexina V e, simultaneamente, ao iodeto de propídio, são células sem indícios de apoptose, verificando-se ainda que não correu translocação da fosfatidilserina e a membrana plasmática ainda está intacta. Por outro lado, se as células forem positivas à anexina V, mas negativas ao iodeto de propídio, estas encontram-se em estádios iniciais de apoptose, pois já ocorreu translocação da fosfatidilserina, mas a membrana plasmática ainda está intacta. Finalmente, se as células forem positivas a ambos (anexina V e iodeto de propídio), então assume-se que as células estão em estádios tardios de apoptose ou em morte celular confirmada; nestes casos, quer a translocação da fosfatidilserina, quer a perda de integridade da membrana plasmática já ocorreram, (BD 2007).

2.5 Sumário

Do presente capítulo pode-se concluir que a citometria de fluxo é uma técnica superior à microscopia clássica, particularmente no que respeita à determinação de células apoptóticas, necróticas e viáveis, pois apresenta como principais vantagens a possibilidade de analisar

milhares a milhões de células, com uma taxa de 2000 a 5000 células por segundo, o que se traduz numa elevada sensibilidade de detecção e ainda a possibilidade de avaliar individualmente cada célula. Por outro lado, verifica-se que a citometria de fluxo é uma técnica válida para o estudo das alterações celulares em culturas de células (por exemplo, apoptose, necrose e viabilidade celular), nomeadamente aquelas relacionadas com os efeitos da radiação ionizante.

Capítulo III. Conclusão

As linhas celulares face às culturas de células primárias apresentam algumas vantagens, nomeadamente, maior padronização, facilidade de manipulação e desenvolvimento laboratorial, o que pode explicar o crescente uso deste tipo de células face às culturas primárias, tipicamente mais morosas e sensíveis. Outra conclusão possível de retirar do Capítulo I relaciona-se com a classificação das células em cultura em três grandes grupos, conforme diferenças morfológicas entre células: epiteliais, linfoblásticas e fibroblásticas. Por outro lado, conclui-se ainda que o meio de cultura é um componente muito importante da cultura de células e que uma avaliação de contaminações, bem como a monitorização da cultura devem ser realizadas periodicamente pelo uso de testes padronizados.

A citometria de fluxo é uma técnica superior à microscopia clássica, possibilitando o estudo de células apoptóticas, necróticas e viáveis. A sua elevada sensibilidade e rapidez de análise (possibilidade de analisar milhares a milhões de células, com uma taxa de 2000 a 5000 células por segundo) são as suas principais vantagens face à microscopia clássica. Dada a sua sensibilidade, rapidez e, com recurso a corantes característicos, especificidade, esta apresenta-se como uma técnica válida para o estudo das alterações celulares em culturas de células. Uma dessas possibilidades é o estudo dos efeitos da radiação ionizante em culturas de células. Pelo uso de iodeto de propídeo e anexina V, por exemplo, pode-se avaliar uma cultura de células, classificando as células em necróticas, apoptóticas ou viáveis/saudáveis.

Bibliografia

- Baatout (2004). "Cytometric methods to analyze radiation effects." Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents **18**(2): 101-105.
- BD, B. (2007). "Annexin V - Introduction." Annexin V Retrieved 26 June 2008, from http://www.bdbiosciences.com/features/products/display_product.php?keyID=48.
- Besta, I. N. N. C. (2004). Detection of Contaminants in Human Cell Culture. L. P. f. H. C. Culture. Marina Mora, EuroBio Bank.
- Caprioglio, D. (2008). "Fluorescence in Biology." Retrieved 26 June 2008, from <http://csm.colostate-pueblo.edu/biology/dcaprio/412L/Fluor1.html>.
- Coder, D. (1997). Assessment of cell viability. Current Protocols in Cytometry, John Wiley & Sons.
- Coimbra, U. (2008). "Noções básicas de cultura de células." Retrieved Maio 2008, from <https://woc.uc.pt/bioquimica/getFile.do?tipo=2&id=523>.
- Freshney, I. (2006). Basic Principles of Cell Culture. Culture of Cells for Tissue Engineering. G. V.-N. e I. Freshney, Jon Wiley and Sons.
- Hanon E., V. A., Pastoret P. (1996). "The Use of Flow Cytometry for Concomitant Detection of Apoptosis and Cell Cycle Analysis." Biochemica **2**(Technical Tips): 25-27.
- Hartung, T. (2002). "Good Cell Culture Practice." ATLA **30**: 407-414.
- Mather, J. (1998). Introduction to Cell and Tissue Culture. New York and London, Plenum Press.
- Nolla, H. (2008). Basic Principles in Flow Cytometry. U. o. California. Berkeley.
- Riley, R. (2005). "Principles and Applications of Flow Cytometry." Retrieved 26 June 2008, from <http://www.pathology.vcu.edu/education/lymph/documents/Flow.pdf>.
- Ryan, J. (2008). Introduction to Animal Cell Culture. Technical Bulletin.
- SIGMA (2008). Fundamental Techniques in Cell Culture... A Laboratory Handbook, SIGMA Laboratories.
- Silva, T. R., Alberto; Hewitt, Christopher; Roseiro, Jose (2004). "Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos." Boletim de Biotecnologia **77**(Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo II): 32-40.