



Protocolo de Congelamento de Células Aderentes

Um pré-requisito essencial para a qualidade constante das células é o estabelecimento de um banco de células por meio de criopreservação. O cultivo contínuo pode levar a mudanças genéticas, redução da taxa de proliferação, transformação e alteração dos padrões de expressão. Com a ajuda da criopreservação, as linhas celulares podem ser armazenadas quase indefinidamente sem qualquer redução na qualidade.

O protocolo seguinte descreve as etapas básicas para o congelamento de células aderentes. Este protocolo não é adequado para todas as linhas de células. Favor consultar também os protocolos dos bancos de células/fontes correspondentes.

Consulte sempre os regulamentos nacionais para o manuseio de material biológico, use a roupa de proteção apropriada e observe as regras de trabalho asséptico em todas as etapas.

Informações gerais:

Antes que as células sejam congeladas, elas devem ser examinadas morfológicamente e para contaminação. As células devem estar na fase de registro tardio. Para células aderentes, recomenda-se a colheita de células em 70-80% de confluência. 24 h antes do congelamento, uma troca de meio deve ser realizada.

Cryopreservation of Adherent Cells

An essential prerequisite for the constant quality of cells is the establishment of a cell bank by means of cryopreservation. Continuous cultivation may lead to genetic changes, reduction of the proliferation rate, transformation, and altered expression patterns. With the help of cryopreservation, cell lines can be stored almost indefinitely without any reduction in quality.

The following protocol describes the basic steps for freezing adherent cells. This protocol is not suitable for every cell line. Please also refer to the protocols of the corresponding cell banks/sources.

Refer always to the national regulations for handling biological material, use the appropriate protective clothing and observe the rules of aseptic work in all steps.

General Information:

Before cells are frozen, they should be examined morphologically and checked for contamination. The cells should be in a late log phase. For adherent cells, cell harvesting at 70-80% confluence is recommended. 24 hours before freezing a media change should be performed.



Congelamento do meio:

As seguintes composições são adequadas como meios de congelamento:

Soro contendo meio de cultura:

- 90% meio de cultura +10% DMSO*
- 45% meio filtrado estéril acondicionado / 45% meio fresco + 10% DMSO*.

O anticongelante contido no meio de cultura e o alto teor de proteína do soro protegem as células contra danos durante o processo de congelamento e descongelamento. Com meios livres de soro o efeito protetor do soro é perdido e pode ser compensado por anticongelante adicional (por exemplo: HES, F68™ Plurônico, metil celulose).

Meio de cultura livre de soro: (xeno-livre, quimicamente definido)

- 89% quimicamente definido, meio livre de soro, 10% DMSO*, 1% F68™ Plurônico [5].
- Meios comerciais de congelamento sem soro

*DMSO não é adequado para algumas células HL-60 [1], HBE4-E5/E7 [1, 2], a glicerina é uma alternativa adequada

Preparação:

Pré-resfriar as pipetas sorológicas, o meio de congelamento, os recipientes de congelamento e os tubos criogênicos no refrigerador.

Freezing Media:

The following media are suitable as freezing media:

Media with Serum:

- 90% culture media +10% DMSO*
- 45% sterile filtered conditioned media / 45% fresh media + 10% DMSO*.

The antifreeze in the culture media, and the high protein content of the serum, protect the cells from damage during the freezing and thawing process. With a serum-free media the protective effect of the serum is lost and can be compensated by additional antifreeze (e.g.: HES, Pluronic F68™, and methyl cellulose).

Media Serum-free: (xeno-free, chemically defined)

- 89% chemically defined, serum-free media, 10% DMSO*, 1% Pluronic F68™ [5]
- Commercially available serum-free freezing media

**DMSO is not suitable for some cells HL-60 [1], HBE4-E5/E7 [1, 2], glycerol is be a suitable alternative*

Preparation:

Pre-cool the serological pipettes, the freezing media, the freezing container and the cryotubes in the refrigerator.



Procedimento:

- Aspirar o meio de cultura com uma pipeta esterilizada e lavar as células duas vezes com PBS quente (0,1 mL/cm²).
- Dissolver as células com um reagente de dissociação adequado (por exemplo, Tripsina, Tripsina-EDTA). Siga o protocolo estabelecido em seu laboratório.
- Após a adição de um meio fresco contendo um componente inibidor de dissociação, transfira as células para um tubo de centrifugação.
- Centrifugar as células: 200 x g durante 5 minutos.
- Remover o sobrenadante e resuspender as células com meio fresco e determinar a contagem de células.
- Centrifugar as células novamente a 200 x g durante 5 minutos.
- Remova o sobrenadante e resuspend as células com o volume necessário de meio de congelamento para obter uma contagem de células vivas de 1×10^6 - 1×10^7 células/mL.
- Alíquota a suspensão da célula nos tubos criogênicos devidamente rotulados.
- As células devem ser congeladas a uma taxa de congelamento controlada de -1°C/min. Você pode usar máquinas de congelamento programáveis ou recipientes de congelamento para este fim.
- Armazene os recipientes de congelamento durante a noite em um freezer a -80°C.
- No dia seguinte, transferir os tubos criogênicos para um freezer de -152° C ou armazená-los na fase gasosa de um container de LN₂. Como não ocorrem reações nas células a -130° C [7], o armazenamento na fase de gás é possível e recomendado por razões de segurança. [8]

Procedure:

- *Remove all the culture media from the flask and wash the cells twice with warm PBS w/o Ca and Mg (0.1 mL/cm²).*
- *Dissolve the cells with a suitable dissociation reagent (e.g. Trypsin, Trypsin-EDTA). Follow the protocol established in your laboratory.*
- *After addition of fresh media containing a dissociation inhibiting component, transfer the cells into a centrifuge tube.*
- *Resuspend the cells with fresh medium and determine the total cell count and live cell count (viability).*
- *Calculate the required volume of freezing medium to achieve a final live cell count of 1×10^6 - 1×10^7 cells/mL*
- *Centrifuge the cells at 200 x g for 5 min.*
- *Remove the supernatant and resuspend the cells with the calculated volume of freezing medium.*
- *Aliquot the cell suspension into the appropriately labelled cryotubes.*
- *The cells should be frozen at a controlled freezing rate of -1 °C/minute. You can use programmable freezers or freezing container.*
- *Store the freezing container overnight in a -80 °C freezer.*
- *Transfer the cryotubes the next day to a -152 °C freezer or store them in the gas phase of an LN₂ cryogenic storage unit. Since no reactions take place in the cells from -130 °C [7], storage in the gas phase is possible and recommended for safety reasons [8]*



- Verificar a qualidade da criopreservação 24 h após o congelamento, realizando o primeiro controle de descongelamento (vitalidade e esterilidade).
- *Check the quality of the cryopreservation 24 hours after freezing by performing the first thawing control (vitality and sterility).*

Descongelamento das células:

- Coloque 14 mL de meio de cultura quente sem antibióticos em um frasco de T-75 cm² e 10 mL em um tubo de centrifugação.
- Retire um tubo criogênico da unidade de armazenamento de LN2 e aqueça-o, com agitação suave, em um banho de água morna, equilibrado à temperatura de cultura da linha de células.
- Quando os cristais de gelo não forem mais visíveis, transferir o conteúdo do tubo criogênico para o tubo de centrifugação usando uma pipeta estéril.
- Centrifugar as células: 200 x g durante 5 minutos.
- Remover o sobrenadante e resuspende as células com 1 mL de meio fresco. Evite a formação de espuma durante a resuspensão. Isto pode levar a uma conexão pobre e desigual das células. A espuma pode ser reduzida por um ritmo uniforme de pipetagem que não é executado rapidamente e apressadamente.
- Transferir as células para a garrafa de T-75 cm² e cultivar durante 24 h.
- Após 24 h, verifique as células quanto à vitalidade, identidade e esterilidade e subcultive, se desejar.
- Os controles de degelo devem ser realizados regularmente.

Thawing of the Cells:

- *Fill 14 mL warm culture media without antibiotics in a T-75 cm² flask and 10 mL in a centrifuge tube.*
- *Remove one cryotube from the LN2 cryogenic storage unit and warm it up in a warm water bath equilibrated to the culture temperature of the cell line.*
- *As soon as ice crystals are no longer visible, transfer the content of the cryotube into the centrifuge tube using a sterile pipette.*
- *Centrifuge the cells: 200 x g for 5 minutes.*
- *Remove the supernatant and resuspend the cells with 1 mL fresh media.*
- *Avoid foaming during resuspension. This can lead to poor and uneven cell attachment. Foaming can be reduced by an even pipetting rhythm which is not performed quickly and hastily.*
- *Transfer the cells into the T-75 cm² flask and cultivate for 24 hours.*
- *Transfer the cells into the T-75 cm² flask and cultivate for 24 hours.*
- *After 24 hours you can check the cells for vitality, identity, and sterility and sub-cultivate them if desired.*
- *The thawing controls should be performed regularly.*



1. ATCC® Animal Cell Culture Guide. Tips and Techniques for Continuous Cell Lines: 24-27, 2014
2. ECACC Protocol Fundamental Techniques in Cell Culture. Laboratory Handbook 2nd Edition: 51-52, 2010
3. Freshney R., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. Wiley-Blackwell: 307-326, 2016
4. Gstraunthaler G., Lindl T., Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. Springer Spektrum Verlag: 137-140, 2014
5. Hernández, Y.G., Fischer, R. Serum-free Culturing of Mammalian Cells – Adaptation to and Cryopreservation in Fully Defined Media. ALTEX 24: 110-116, 2007
6. Morris C.B., Cryopreservation of Animal and Human Cell Lines. In: Day J.G., Stacey G.N. (eds) Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology™, vol 368. Humana Press 2007
7. Stacey G., Masters J., Cryopreservation and banking of mammalian cell lines. *Nat Protoc* **3**, 1981–1989 2008
8. Tedder R., Zuckerman M., Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *The Lancet* 346(8968), 137–140. 1995