

Células HaCaT-ras A5 | 300494

Informações gerais

Description

As células HaCaT-ras A5 são uma linha celular de queratinócitos da pele humana espontaneamente imortalizada e não tumorigénica, fundamental para o estudo das interações do microambiente tumoral e da progressão do carcinoma da pele. Provenientes de um homem caucasiano de 62 anos de idade, estas células foram submetidas a seleção clonal e mutagénese, que, juntamente com a regulação autócrina do fator de crescimento, permitem a formação de tumores císticos benignos de crescimento lento e altamente diferenciados em ratinhos Balb/c-nu/nu. Este facto torna-os um modelo valioso para a investigação da dinâmica celular e dos mecanismos moleculares da progressão tumoral in vivo.

As células HaCaT-ras A5 são particularmente úteis para elucidar as interações complexas entre as células tumorais e as células estromais circundantes, incluindo fibroblastos, células imunitárias e células endoteliais. Estas interações são mediadas pela secreção de várias moléculas de sinalização, como factores de crescimento, citocinas e proteases, entre as quais a interleucina-6 (IL-6) desempenha um papel fundamental. Sabe-se que a IL-6 se encontra desregulada em muitos tipos de cancro, principalmente através da sobreexpressão ou da ativação persistente do fator de transcrição STAT3.

A investigação demonstrou que a estimulação com IL-6 das células HaCaT-ras A5 aumenta significativamente a sua proliferação através da via de sinalização JAK/STAT, enquanto os fibroblastos não são afectados devido a uma inibição mais potente por SOCS3, um regulador negativo desta via. Esta resposta diferencial foi capturada num modelo matemático que descreve a dinâmica de STAT3 e SOCS3, proporcionando uma compreensão mais profunda das cascatas de sinalização específicas das células.

Além disso, a IL-6 não só afecta diretamente a proliferação das células HaCaT-ras A5, como também influencia indiretamente o ambiente celular através da ativação de uma rede de factores de crescimento como o HGF, o KGF, o VEGF e a IL-8. A análise da expressão genética envolvendo mais de 16.000 genes revelou que a estimulação da IL-6 regula positivamente 19 genes relacionados com a via de sinalização do interferão, tanto nas células HaCaT-ras A5 como nos fibroblastos, o que se correlaciona com a inibição do crescimento observada nos fibroblastos.

A descoberta do papel crucial da SerpinB4 na proliferação das células HaCaT-ras A5, confirmada através de experiências de knockdown de siRNA, sublinha a intrincada regulação da IL-6 tanto nas células tumorais como nas células estromais. Esta compreensão abrangente dos papéis da IL-6 aumenta o potencial de desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas para a modulação das vias de sinalização da IL-6 no microambiente tumoral.

Globalmente, as células HaCaT-ras A5 constituem um modelo robusto para explorar a complexa interação no microambiente tumoral, abrindo caminho a novas abordagens na investigação do cancro e no desenvolvimento de terapias.

Organism Humano

Tissue Pele

Synonyms HaCaT-ras clone A-5, HaCaT A-5, A-5, A5

Caraterísticas

Células HaCaT-ras A5 | 300494

Age	62 anos
Gender	Masculino
Ethnicity	Caucasiano
Cell type	Queratinócitos
Growth properties	Aderente

Dados regulamentares

Citation	HaCaT-ras A5 (número de catálogo Cytion 300494)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_xK16
GMO Status	OGM-S1: Esta linhagem HaCaT-ras A5 contém uma construção do oncogene c-Ha-ras incorporada num plasmídeo para investigação da transformação epitelial. Esta classificação aplica-se apenas na Alemanha e pode diferir noutros países.

Dados biomoleculares

Protein expression	P53 (+), CEA (+),
Tumorigenic	Formação de tumores benignos em ratinhos Balb/c-nu/nu.
Karyotype	Aneuploide (hipotetraplóide)

Manuseamento

Culture Medium	DMEM, com: 4,5 g/L de glucose, com: 4 mM de L-Glutamina, com: 3,7 g/L de NaHCO ₃ , com: 1,0 mM de piruvato de sódio (número de artigo Cytion 820300a)
Supplements	Completar o meio com 10% de FBS

Células HaCaT-ras A5 | 300494**Dissociation Reagent**

A mistura 1:1 de EDTA (stock: 0,05%) e tripsina (stock: 0,1%) tem de ser preparada antes da separação das células, utilizando PBS sem Ca²⁺ e Mg²⁺ para obter uma osmolaridade fisiológica. Não se recomenda a utilização de misturas de tripsina/EDTA prontas a usar, uma vez que tal pode resultar em aglomerados de células. Em alternativa, pode ser utilizado o TrypLETM Express (Life Technologies) em vez de tripsina/EDTA. O protocolo do fabricante deve ser seguido.

Subculturing

1. **Eliminar o meio antigo:** Remover o meio antigo dos frascos.
2. **Lavar as células:** Adicionar 3-5 ml de PBS (sem cálcio e magnésio) aos frascos T25, ou 5-10 ml aos frascos T75, para lavar as células aderentes.
3. **Adicionar solução de EDTA:** Cobrir completamente a camada de células com uma solução de EDTA a 0,05% recentemente preparada - utilizar 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75.
4. **Incubação:** Incubar os frascos a 37 graus Celsius durante 10 minutos.
5. **Adicionar solução de tripsina/EDTA:** Após a incubação, adicionar uma solução de tripsina/EDTA recém-preparada (0,05% de tripsina, 0,025% de EDTA) aos frascos, assegurando que as células são totalmente cobertas - utilizar 1 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75.
6. **Monitorizar o desprendimento:** Observar as células, que devem desprender-se no espaço de 1-2 minutos.
7. **Neutralizar a tripsina:** Adicionar meio de cultura de células contendo FBS para parar a atividade da tripsina.
8. **Transferir as células:** Dispensar a suspensão de células em novos frascos previamente cheios com meio de cultura fresco.

Seeding density

1 x 10⁴ células/cm²

Fluid renewal

2 vezes por semana

Freeze medium

Como meio de criopreservação, utilizamos um meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% DMSO para uma viabilidade pós-descongelamento adequada, ou CM-1 (número de catálogo Cytion 800100), que inclui osmoprotectores otimizados e estabilizadores metabólicos para melhorar a recuperação e reduzir o stress induzido pela crio.

Células HaCaT-ras A5 | 300494

Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que o frasco permanece profundamente congelado aquando da entrega, uma vez que as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após a receção, armazenar o frasco criogénico imediatamente a temperaturas inferiores a -150°C para garantir a preservação da integridade celular, ou avançar para o passo 3 se for necessária uma cultura imediata.
3. Para uma cultura imediata, descongelar rapidamente o frasco imergindo-o num banho de água a 37°C com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos até ficar um pequeno aglomerado de gelo.
4. Efetuar todos os passos subsequentes em condições estéreis numa capela de fluxo, desinfectando o frasco criogénico com etanol a 70% antes de o abrir.
5. Abrir cuidadosamente o frasco desinfectado e transferir a suspensão de células para um tubo de centrifugação de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando suavemente.
6. Centrifugar a mistura a $300 \times g$ durante 3 minutos para separar as células e eliminar cuidadosamente o sobrenadante que contém o meio de congelação residual.
7. Ressuspender suavemente o pellet de células em 10 ml de meio de cultura fresco. No caso de células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; no caso de culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 para promover uma interação e um crescimento eficazes das células.
8. Cumprir os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento e manutenção contínuos da linha celular, garantindo resultados experimentais fiáveis.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , atmosfera humidificada.

Flask Coating

Nenhum

Freezing Procedure

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78°C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Células HaCaT-ras A5 | 300494

Shipping Conditions

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Storage Conditions

Para conservação a longo prazo, colocar os frascos em azoto líquido em fase de vapor a uma temperatura entre -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como um curto passo intermédio antes da transferência para azoto líquido.

Controlo de qualidade / Perfil genético / HLA

Sterility

A contaminação por micoplasma é excluída utilizando ensaios baseados em PCR e métodos de deteção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não há contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras, as culturas de células são sujeitas a inspecções visuais diárias.

Alelos HLA

A*: '31:01:02
B*: '40:01:02, '51:01:01
C*: '03:04:01, '15:02:01
DRB1*: '04:01:01, '15:01:01G
DQA1*: '01:02:01, '03:03:01
DQB1*: '03:01:01, '06:02:01
DPB1*: '03:01:01G, '04:01:01G
E: '01:03:01, '01:03:02