

**Células RF/6A | 305150****Informações gerais****Description**

A RF/6A é uma linha celular endotelial da coróide e da retina do macaco rhesus (*Macaca mulatta*), estabelecida a partir de tecido fetal da coróide e da retina. A linha está registada no Cellosaurus com a referência CVCL\_4552 e cresce sob a forma de uma monocamada aderente com morfologia semelhante à epitelial. As células RF/6A mantêm características endoteliais fundamentais, incluindo a expressão do Fator VIII (fator de von Willebrand), da fibronectina e dos grânulos de Weibel-Palade, detetáveis por microscopia eletrónica — sendo que estes últimos confirmam a sua identidade endotelial. A linha foi originalmente estabelecida para estudos sobre a vascularização da retina e da coróide e tem sido amplamente adotada como modelo endotelial de primatas para a investigação da angiogénese ocular.

A RF/6A é aplicável na investigação da angiogénese ocular, em estudos sobre a vascularização da retina e da coróide, na avaliação de agentes antiangiogénicos (inibidores do VEGF, bevacizumab, ranibizumab), modelização da degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), biologia da retinopatia diabética e avaliação da permeabilidade vascular no microambiente ocular. A origem em primatas não humanos (NHP) torna a RF/6A mais próxima da biologia vascular da retina humana do que os modelos endoteliais de roedores, particularmente para estudos que envolvam respostas a isoformas do VEGF específicas dos primatas e farmacologia ocular. Esta linha é frequentemente utilizada em ensaios de formação de tubos, ensaios de migração e experiências de estimulação com VEGF.

A RF/6A é mantida como cultura aderente em EMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de NEAA a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. As células são subcultivadas com Accutase quando atingem 70–80% de confluência, para evitar a inibição por contacto e a perda do fenótipo endotelial. Rácio de divisão de 1:3 a 1:5, densidade de sementeira de 1–2 × 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. O meio é renovado 2–3 vezes por semana.

**Organism**

Macaco Rhesus

**Tissue**

Coroide, retina

**Disease**

Endotélio coróide retiniano normal (fetal; não tumorigénico)

**Metastatic site**

Não aplicável (linha celular endotelial coróide-retiniana fetal normal)

**Applications**

Investigação sobre a angiogénese ocular; vascularização da retina e da coróide; avaliação da terapia anti-VEGF (bevacizumab, ranibizumab); modelação da DMRI e da retinopatia diabética; ensaios de formação de tubos; permeabilidade vascular; modelo endotelial retiniano em primatas NHP

**Caraterísticas****Age**

Feto

**Gender**

Sexo não especificado

**Ethnicity**Não aplicável (linha celular de primata não humano; *Macaca mulatta*)

**Células RF/6A | 305150****Morphology** De tipo epitelial**Cell type** Células endoteliais**Growth properties** Aderente**Dados regulamentares****Citation** RF/6A (número de catálogo Cytion 305150)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9544**CellosaurusAccession** CVCL\_4552**GMO Status** Sem modificação genética; linha celular de endotélio coróide da retina fetal de macaco rhesus de tipo selvagem**Dados biomoleculares****Protein expression** Fator , Fibronectina**Manuseamento****Culture Medium** EMEM (MEM Eagle), com: 2 mM L-Glutamina, com: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, com: EBSS (número de artigo Cytion 820100a)**Supplements** Completar o meio com 10% de FBS e 1% de NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** aprox. 24 a 36 horas

## Células RF/6A | 305150

**Subculturing** Retirar o meio antigo das células aderentes e lavá-las com PBS sem cálcio e magnésio. Nos frascos T25, utilizar 3-5 ml de PBS e, nos frascos T75, 5-10 ml. Em seguida, cobrir completamente as células com Accutase, utilizando 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75. Deixar as células incubar à temperatura ambiente durante 8-10 minutos para as destacar. Após a incubação, misturar suavemente as células com 10 ml de meio para as ressuspender e, em seguida, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Deitar fora o sobrenadante, ressuspender as células em meio fresco e transferi-las para novos frascos que já contenham meio fresco.

**Split ratio** 1 a 5

**Seeding density** 1 a  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** 2 a 3 vezes por semana

**Post-Thaw Recovery** Após a descongelação, semeie as células a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> e aguarde pelo menos 24 horas para que adiram antes da primeira troca de meio. Não deixe que as culturas atinjam a confluência total, uma vez que a inibição por contacto pode reduzir o fenótipo endotelial.

**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 RF/6A | 305150

### 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  $-150^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  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

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 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  $-78^{\circ}\text{C}$  durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

## Células RF/6A | 305150

### 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 inspeções visuais diárias.