

**Células MCA-3D | 400437****Informações gerais****Description**

A linha celular MCA-3D é derivada de culturas epidérmicas primárias de ratinho que apresentam resistência à diferenciação terminal induzida pelo cálcio. Estas células foram inicialmente tratadas com os carcinogéneos N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) ou 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) e subsequentemente expostas a 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). A resistência à diferenciação terminal foi avaliada através da elevação dos níveis de cálcio no meio de cultura para 1,2 mM, o que permite seletivamente o crescimento de células transformadas, enquanto as células normais sofrem tipicamente diferenciação terminal e morte.

A linha celular MCA-3D apresenta uma morfologia epitelial e forma colónias bem definidas em cultura. A análise ultra-estrutural revela que as células MCA-3D contêm filamentos de queratina e desmossomas, que são indicativos da sua origem epitelial e sugerem a manutenção de algum grau de diferenciação normal dos queratinócitos. No entanto, a abundância exacta destas estruturas pode variar entre subpopulações dentro da linha.

As células MCA-3D foram testadas quanto à sua tumorigenicidade por injeção subcutânea em recém-nascidos Balb/c singénicos, com resultados que indicam que esta linha não é tumorigénica, mesmo após cultura prolongada em condições de elevado teor de cálcio. Para além disso, as células MCA-3D não crescem em ágar macio, o que apoia ainda mais o seu fenótipo não maligno. Os ensaios bioquímicos da atividade da gama glutamil transpeptidase (GGT) e da atividade da transglutaminase demonstraram que as células MCA-3D são negativas para a GGT e que a sua atividade da transglutaminase não está correlacionada com o potencial tumorigénico, o que está de acordo com a sua classificação não tumorigénica.

Globalmente, a linha celular MCA-3D serve de modelo para o estudo das fases iniciais da carcinogénese e dos factores que influenciam a progressão de lesões pré-neoplásicas para tumores totalmente malignos.

**Organism** Rato**Tissue** Pele**Synonyms** MCA3D, MCA3D, MCA/3D, MCA 3D**Caraterísticas****Breed/Subspecies** BALB/c**Gender** Feminino**Cell type** Queratinócitos**Growth properties** Aderente**Dados regulamentares**

**Células MCA-3D | 400437****Citation** MCA-3D (número de catálogo Cytion 400437)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 10090**CellosaurusAccession** CVCL\_5797**Dados biomoleculares****Manuseamento****Culture Medium** Ham's F12, com: 1,0 mM de glutamina estável, com: 1,0 mM de piruvato de sódio, com: 1,1 g/L NaHCO<sub>3</sub> (número de artigo Cytion 820600a)**Supplements** Completar o meio com 10% de FBS**Dissociation Reagent** TrypLE Express**Subculturing** Remover o meio e lavar as células aderentes com PBS sem cálcio e magnésio (3-5 ml de PBS para T25, 5-10 ml para frascos de cultura de células T75). Adicionar TrypleExpress (1-2 ml por T25, 2,5 ml por frasco de cultura de células T75), a folha de células deve ser completamente coberta. Incubar a 37 graus Celsius durante 15-20 minutos. Ressuspender cuidadosamente as células com meio (10 ml), centrifugar durante 5 minutos a 300xg, ressuspender as células em meio fresco e distribuir em novos frascos que contenham meio fresco.**Seeding density** 0,5 a 1 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>**Fluid renewal** 2 a 3 vezes por semana**Post-Thaw Recovery** Após o descongelamento, coloque as células em placas a uma densidade de 5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> e deixe-as recuperar do processo de congelamento e aderir durante pelo menos 24 horas.**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 MCA-3D | 400437

### 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 MCA-3D | 400437

### 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.