

Células HaCaT-ras A5 | 300494

Informações gerais

Description

As células HaCaT-ras A5 são uma linhagem celular de queratinócitos da pele humana, imortalizada espontaneamente e não tumorigênica, fundamental para o estudo das interações do microambiente tumoral e da progressão do carcinoma cutâneo. Originadas de um homem caucasiano de 62 anos, essas células passaram por seleção clonal e mutagênese, o que, aliado à regulação autócrina de fatores de crescimento, permite a formação de tumores císticos benignos, de crescimento lento e altamente diferenciados, em camundongos Balb/c-nu/nu. Isso as torna um modelo valioso para investigar a dinâmica celular e os 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 imunes e células endoteliais. Essas interações são mediadas pela secreção de várias moléculas de sinalização, como fatores de crescimento, citocinas e proteases, entre as quais a interleucina-6 (IL-6) desempenha um papel fundamental. Sabe-se que a IL-6 fica desregulada em muitos tipos de câncer, principalmente por meio da superexpressão ou ativação persistente do fator de transcrição STAT3.

Pesquisas demonstraram que a estimulação das células HaCaT-ras A5 pela IL-6 aumenta significativamente sua proliferação por meio da via de sinalização JAK/STAT, enquanto os fibroblastos permanecem inalterados devido a uma inibição mais potente por parte do SOCS3, um regulador negativo dessa via. Essa resposta diferencial foi representada em um modelo matemático que descreve a dinâmica do STAT3 e do SOCS3, proporcionando uma compreensão mais profunda das cascatas de sinalização específicas das células.

Além disso, a IL-6 não apenas afeta diretamente a proliferação das células HaCaT-ras A5, mas também influencia indiretamente o ambiente celular por meio da ativação de uma rede de fatores de crescimento, como HGF, KGF, VEGF e IL-8. A análise da expressão gênica envolvendo mais de 16.000 genes revelou que a estimulação pela IL-6 regula positivamente 19 genes relacionados à via de sinalização do interferon tanto nas células HaCaT-ras A5 quanto 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 por meio de experimentos de supressão com siRNA, ressalta a complexa regulação exercida pela IL-6 tanto nas células tumorais quanto nas estromais. Essa compreensão abrangente das funções da IL-6 amplia o potencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas, com o objetivo de modular as vias de sinalização da IL-6 no microambiente tumoral.

De modo geral, as células HaCaT-ras A5 oferecem um modelo robusto para explorar a complexa interação no microambiente tumoral, abrindo caminho para novas abordagens na pesquisa do câncer e no desenvolvimento de terapias.

Organism Humano

Tissue Pele

Synonyms Clone A-5 do HaCaT-ras, HaCaT A-5, A-5, A5

Características

Células HaCaT-ras A5 | 300494

Age	62 anos
Gender	Masculino
Ethnicity	caucasiano
Cell type	Queratinócito
Growth properties	Aderente

Dados regulatórios

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

Dados biomoleculares

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

Manuseio

Culture Medium	DMEM, p/v: 4,5 g/L de glicose, p/v: 4 mM de L-glutamina, p/v: 3,7 g/L de NaHCO ₃ , p/v: 1,0 mM de piruvato de sódio (número de artigo da Cytion 820300a)
Supplements	Adicione 10% de FBS ao meio

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

A mistura na proporção de 1:1 de EDTA (solução-mãe: 0,05%) e tripsina (solução-mãe: 0,1%) deve ser preparada sempre antes da separação das células, utilizando PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} para garantir uma osmolaridade fisiológica. Não se recomenda o uso de misturas prontas de tripsina/EDTA, pois isso pode resultar na formação de aglomerados celulares. Como alternativa, pode-se utilizar o TrypLETM Express (Life Technologies) em vez da mistura de tripsina/EDTA. Deve-se seguir o protocolo do fabricante.

Subculturing

1. **Descartar o meio antigo:** Remova o meio antigo dos frascos.
2. **Lavar as células:** Adicione 3 a 5 ml de PBS (sem cálcio e magnésio) aos frascos T25, ou 5 a 10 ml aos frascos T75, para lavar as células aderentes.
3. **Adicionar solução de EDTA:** Cubra completamente a camada celular com uma solução de EDTA a 0,05% recém-preparada — use 1 a 2 ml para frascos T25 e 2,5 ml para frascos T75.
4. **Incubação:** Incube os frascos a 37 graus Celsius por 10 minutos.
5. **Adicione a solução de tripsina/EDTA:** Após a incubação, adicione uma solução de tripsina/EDTA recém-preparada (0,05% de tripsina, 0,025% de EDTA) aos frascos, garantindo que as células fiquem totalmente cobertas — use 1 ml para frascos T25 e 2,5 ml para frascos T75.
6. **Monitore o desprendimento:** Observe as células, que devem se desprender em 1 a 2 minutos.
7. **Neutralize a tripsina:** Adicione meio de cultura celular contendo FBS para interromper a atividade da tripsina.
8. **Transferir as células:** Distribua a suspensão celular em novos frascos pré-preenchidos com meio de cultura fresco.

Seeding density

1×10^4 células/cm²

Fluid renewal

2 vezes por semana

Freeze medium

Como meio de criopreservação, utilizamos meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% de DMSO para garantir viabilidade adequada após o descongelamento, ou CM-1 (número de catálogo da Cytion 800100), que inclui osmoprotetores e estabilizadores metabólicos otimizados para melhorar a recuperação e reduzir o estresse induzido pela criopreservação.

Células HaCaT-ras A5 | 300494

Thawing and Culturing Cells

1. Verifique se o frasco permanece profundamente congelado no momento da entrega, pois as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após o recebimento, armazene o criovial imediatamente a temperaturas abaixo de $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ para garantir a preservação da integridade celular ou prossiga para a etapa 3, caso seja necessária a cultura imediata.
3. Para cultura imediata, descongele rapidamente o frasco imergindo-o em um banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente por 40 a 60 segundos até que reste apenas um pequeno pedaço de gelo.
4. Realize todas as etapas subsequentes em condições estéreis em uma cabine de fluxo, desinfetando o criovial com etanol a 70% antes de abri-lo.
5. Abra cuidadosamente o frasco desinfetado e transfira a suspensão celular para um tubo de centrifuga de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando delicadamente.
6. Centrifugue a mistura a $300 \times g$ por 3 minutos para separar as células e descarte cuidadosamente o sobrenadante contendo o meio de congelamento residual.
7. Ressuspender suavemente o sedimento celular em 10 ml de meio de cultura fresco. Para células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; para culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 a fim de promover a interação e o crescimento celular eficazes.
8. Siga os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento contínuo e a manutenção da linhagem celular, garantindo resultados experimentais confiáveis.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 , atmosfera umidificada.

Shipping Conditions

As linhagens celulares criopreservadas são enviadas em gelo seco, em embalagens isoladas e validadas, com refrigerante suficiente para manter a temperatura em aproximadamente $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante todo o transporte. Ao receber a remessa, inspecione o recipiente imediatamente e transfira os frascos sem demora para o local de armazenamento adequado.

Storage Conditions

Para preservação a longo prazo, coloque os frascos em nitrogênio líquido em fase de vapor a uma temperatura entre aproximadamente -150 e $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. O armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ é aceitável apenas como uma etapa intermediária de curta duração antes da transferência para o nitrogênio líquido.

Controle de Qualidade e Análise Molecular

Células HaCaT-ras A5 | 300494

Sterility

A contaminação por micoplasma é descartada por meio de ensaios baseados em PCR e de métodos de detecção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não haja contaminação por bactérias, fungos ou leveduras, as culturas celulares são submetidas a inspeções visuais diárias.