
4. Medis Cultius cel·lulars

M01. Cultius cel·lulars

Cell culture conditions

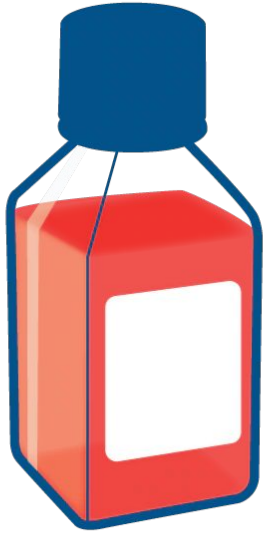
- Growth substrates
 - Media
 - AA and Vitamins
 - Ions and trace elements
 - Carbohydrates and organic supplements
 - Serum
 - Antibiotics & antimycotic solutions
 - Growth factors and hormones
 - pH
 - CO₂ and bicarbonate
 - T°
 - Osmolaritat
 - Viscositat
-

Sovint el **fenotip** (aparença física, funcions especialitzades i altres característiques observables) de les cèl·lules en cultiu canvia degut a que el seu “microenvironment” ha canviat.

Un cultiu primari manté certa semblança amb el cultiu original però a mesura que es van realitzar subcultius (pases) és difícil mantenir aquestes característiques. Poder aconseguir-ho és important per:

- Mantenir el linatge cel·lular
- Afavorir la proliferació
- Permetre l'aplicació de diferents condicions controlades per estimular el fenotip diferenciat desitjat

→ És molt important mantenir unes condicions de cultiu controlades



Què és el medi?

El medi és el component més important ja que:

- Proporciona els nutrients, GF i hormones pel creixement cel·lular
- Regula el pH
- Regula la pressió osmòtica

Tots els medis de cultiu han de venir acompanyats d'una fulla d'especificacions en la qual s'especifiquin el pH, l'osmolaritat, concentració...

A més de com emmagatzemar-ho i la data de caducitat, és molt important no usar un medi caducat.

En l'inici dels cultius cel·lulars s'utilitzaven fluids corporals o extractes cel·lulars, però per necessitats de mantenir la qualitat i estandarització es van començar a desenvolupar medis definits (comercials).

Tipus de medi - segons origen

1. **Medis naturals** són aquells que consisteixen únicament en fluids naturals. Són molt utilitzats per a gran part del cultiu de cèl·lules d'origen animal, el gran desavantatge que posseeixen els medis naturals és la seva baixa reproducibilitat a causa de la falta de coneixement de la seva composició exacta.

Dins d'aquesta mena de medis tenim els fluids biològics (plasma, sèrum, fluid amniòtic...), extractes de teixit (extracte d'embrions, lisis de fetge...) i coàguls.

2. **Medis artificials o sintètics** es preparen agregant nutrients (tant orgànics com inorgànics). Són els més utilitzats actualment, ja que podem saber amb exactitud els seus components i tenir una alta reproducibilitat.



Tipus de medi - segons funció

- **Medi de manteniment:** aquell que utilitzem de manera rutinària per a mantenir la nostra línia cel·lular. El fem servir pels canvis de medi, normalment es realitza tres vegades per setmana, retirant el medi del flascó o placa de cultiu i reemplaçant-lo per medi fresc. Sol portar antibiòtics i un 10% de sèrum fetal boví.
 - **Medi de congelació:** S'utilitza quan volem mantindre les cèl·lules congelades en nitrogen líquid o a -70°C , per a això el medi que usem ha de portar dimetilsulfóxid (DMSO), que evita la formació de cristalls en congelar-se. Normalment el percentatge de DMSO en el medi de congelació és entre 5 i 20%.
 - **Medi d'experimentació:** és el medi en el qual dissolem mostres les molècules o fàrmacs que volem testejar en la nostra línia cel·lular. Porta molt poc sèrum fetal boví (0,1-1%) o fins i tot no conté res, ja que el FBS pot fer que la nostra molècula experimenta no funcioni com esperem.
-

Tipus de medis - segons suero

A) Medi basal

Conté AA, vitamines, sals inorgàniques, font de carboni (glucosa) i SUERO.

B) Medi amb baix contingut en sèrum

Medi enriquit amb nutrients i altres factors per reduir la quantitat de suero necessària.

C) Serum-Free Media

Elimina l'utilització d'animals intermediaris medinant altres formulacions hormonals i nutricionals. Aquests medis ens permeten "crear" medis selectius, utilitzant la combinació adequada de GF. Medis molt més cars (€€)

FBS (Suero fetal bobí)

El suero/sèrum és la font principal de factors de creixement i d'adhesió, hormones, lípids i minerals. Aquest també regula la permeabilitat de la membrana, contribuint a l'entrada dels nutrients i altres components dins de les cèl·lules.

El percentatge del suero sol ser del 10%.

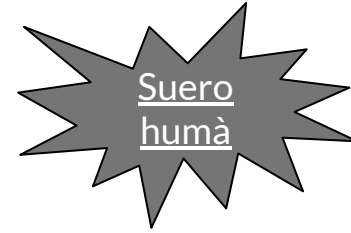
També conté **mitògens** que permeten el pas del checkpoint G1/S → Mitosi

Per a aconseguir el sèrum es recorre al processament de sang fetal recollida durant el procés de la matança del bestiar, mediant punció cardíaca o umbilical. La sang prové dels fetus no nascuts, extrets de les seves mares després que siguin sacrificades.



Problemes d'estandarització, traçabilitat, variabilitat, cost i CONTAMINACIÓ.

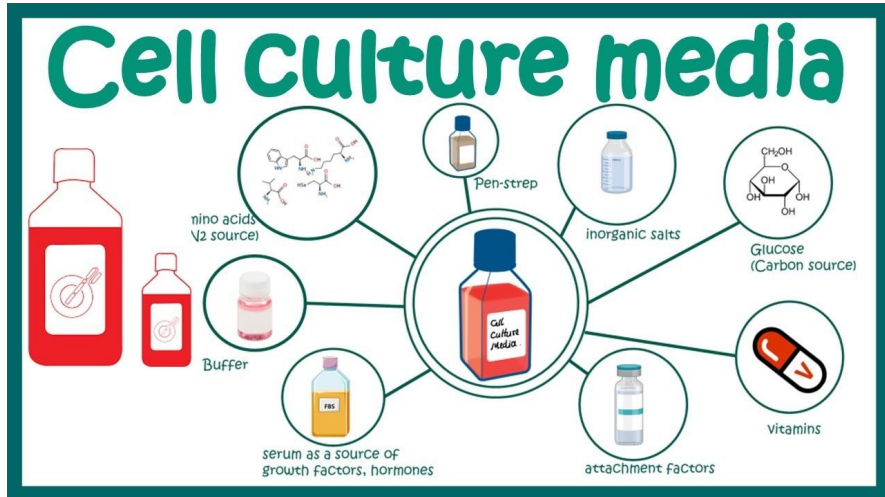
Alternatives al FBS



- **HPL** (Human Platelet Lysate) → a partir de concentrat de plaquetes humanes
- **BSA** (Bovine Seum Albumin) → proteïnes, que són el principal component del sèrum, que permeten augmentar l'estabilitat de les membranes cel·lulars.
- **HSA** (Human Serum Albumin) → regula l'osmosi cel·lular
- **Medis sense suero** → medis preparats per un creixement optimitzat sense suplement proteic. Les cèl·lules poden adaptar-se a aquestes condicions.

L'absència de proteïnes sèriques facilita la purificació dels productes finals

Components del medi



AA

Glucosa

Vitamines

Sals inorgàniques

Indicador de pH

Solucions tampó

Aminoácidos	Vitaminas	Sales	Otros Compuestos *	Proteínas requeridas en medios definidos libres de suero
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosa	Insulina
Cisteína	Colina	KCl	Penicilina	Transferrina
Glutamina	Folato	Na H ₂ PO ₄	Estreptomina	Factores de crecimiento
Histidina	Nicotinamida	NaHCO ₃	Anfotericina	específicos
Isoleucina	Pantotenato	CaCl ₂	Rojo fenol	
Leucina	Piridoxal	MgCl ₂	Suero fetal bovino	
Lisina	Tiamina			
Metionina	Riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptofano				
Tirosina				
Valina				

Tabla 2. Composición de medios de cultivo para células de mamífero.

* La penicilina y la estreptomina son antibióticos y la anfotericina es un antimicótico, se adicionan para impedir el crecimiento de bacterias y hongos contaminantes, respectivamente. El rojo fenol es un indicador de pH. *Tomado de [1].*

Sals inorgàniques

Permeten el balanç osmòtic i la regulació del potencial de membrana, a través de l'aportació d'ions Na^+ , K^+ i Ca^{2+} .

Tots aquests ions són imprescindibles per la matriu cel·lular (adhessió) i com a cofactors dels diferents enzims.

Font de carboni

Font d'energia. Els hidrats de carboni (sucres) més utilitzats són la glucos i galactosa, tot i que hi ha medis que contenen maltosa o fructosa.

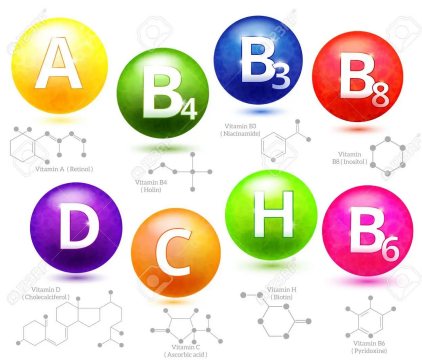
La concentració d'aquests sucres és variable: els medis amb una alta concentració són capaços de suportar el creixement cel·lular en un major numero de tipus de cultius.

Vitamines

Les vitamines són precursors per diversos cofactors, és a dir per molècules amb un rol important en el creixement i proliferació.

Són importants per a la proliferació cel·lular i el seu creixement, ja que les cèl·lules no poden sintetitzar la quantitat necessària. Són un suplement imprescindible.

El sèrum és una font important d'aquestes, tot i així molts medis es troben enriquits amb vitamines augmentant així l'espectre de cèl·lules que hi poden créixer. Els medis solen estar enriquits amb Vitamina B, A i E.



Congelació

Condicions necessàries per poder congelar

a) Medi congelació



10% FBS

10% DMSO

b) Confluència

c) Viabilitat >80%

d) Bona aparença

e) A la fase log del creixement cel·lular

Actualment ja es venen medis de congelació amb les concentracions de DMSO i sèrum necessàries

També necessitarem l'equipament que ens permet congelar mitjançant una baixada controlada de la temperatura

Mr Frosty

Permet la baixada gradual de la temperatura.

Vials de 1-2mL estèrils

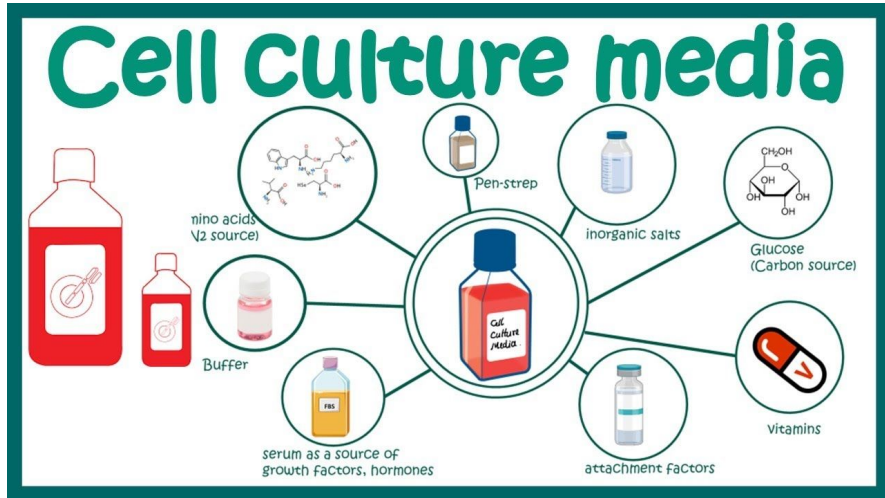
10^6 cell/mL

→ Actualment s'està poden conservar vials de $2-50 \times 10^6$ cells/mL fet que fa que poguem inocular les cells directament al bioreactor sense haver de passar per un procés d'escalada





Components del medi



AA

Glucosa

Vitamines

Sals inorgàniques

Indicador de pH

Solucions tampó

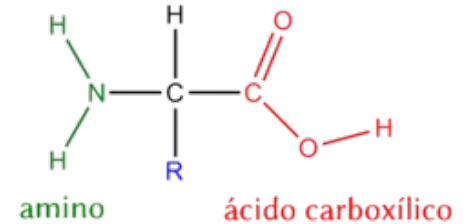
Aminoàcids (AA)

Són els components bàsics de les proteïnes i, hi ha 9 d'aquests que l'organisme no és capaç de fabricar-los, els **essencials**.

Per tant, aquests hauran d'estar afegits al medi pel correcte funcionament de les cells. La concentració d'AA determinarà el potencial de densitat cèl·lular, és a dir, la màxima densitat a la que podrà arribar el nostre cultiu, ja que un cop aquests s'esgotin les cel·lules no podran proliferar.

La **GLUTAMINA** té un paper clau en els cultius cel·lulars, ja que es degrada relativament ràpid a 37°C. Aquest és un dels motius pel qual el medi s'ha d'ALICUOTAR i només escalfar els volums que anem a utilitzar aquell dia. Actualment hi ha medis amb versions més estables d'aquest AA, com ara la L-glutamina.

Els AA no-essencials estimula el creixement i allarga la viabilitat dels cultius cel·lulars.



Àcids grassos i lípids

Proteïnes i pèptids

Especialment importants
en els medis serum-free,
ja que és on es troben.

Són claus en el desenvolupament
de cultius especialitzats.

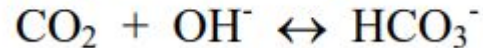
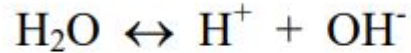
Els pèptids més habituals són l'albumina,
transferrina, fibronectina i fetuïna.

Solucions tampó

Responsables de la regulació del pH que ha d'estar entre 7.2-7.4 per tenir unes condicions òptimes de cultiu, tot i que hi ha especificitats en algunes línies o tipus cel·lulars.

Aquesta regulació del pH es pot fer per a per dues vies:

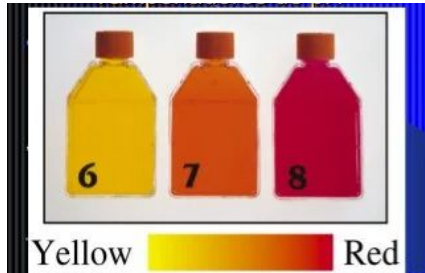
- Tamponació natural mitjançant l'ambient de l'incubador (5% de CO₂): balanç OH⁻/HCO₃⁻ (low cost)



- Tamponació química mitjançant ions dipolars- **HEPES**: té una capacitat major de regulació però és relativament car i pot resultar tòxic per alguns tipus cel·lulars en altes concentracions
-

Antibiòtics i antifúngics

Protegeixen el medi de possibles contaminacions.



Indicador de pH

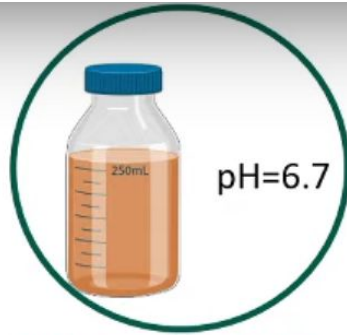
Ens dona informació sobre el creixement del cultiu cel·lular, ja que durant aquest s'alliberen metabolits que modifiquen el pH del medi.

També ens poden informar de contaminacions.

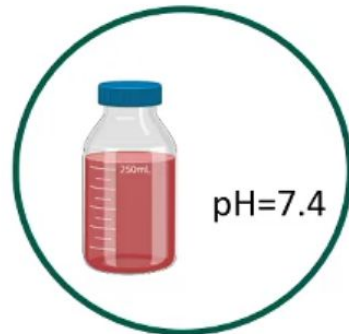
Sol utilitzar-se roig de fenol.



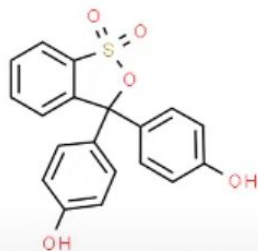
Change ASAP/ look for contamination



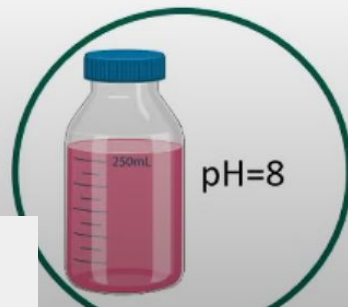
Change within a day



perfect

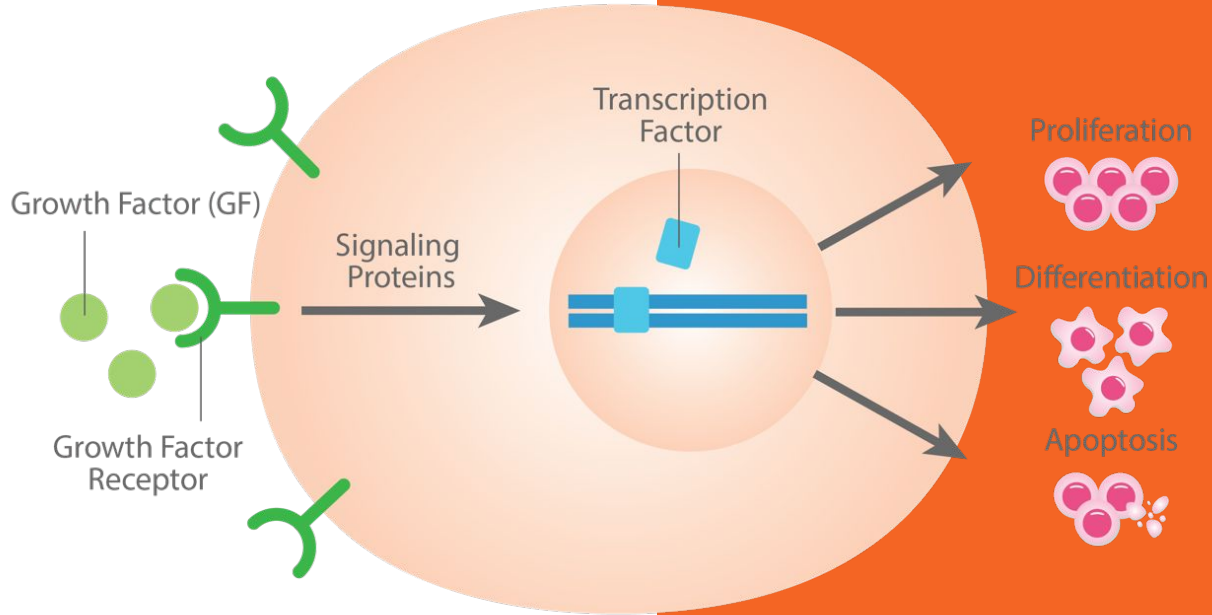


Plenol red



Check CO₂ supply

Growth Factors



Factor	Cell or Tissue of Origin	Selected Target Cells or Tissue	Selected Stimulatory (S) or Inhibitory (I) Actions	Clinical Trials
EGF	macrophages, monocytes	epithelium, endothelial cells	S: proliferation of keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells. S: keratinocyte migration.	venous ulcers
FGF	monocytes, macrophages, endothelial cells	endothelium, fibroblasts, keratinocytes	S: proliferation of endothelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. S: chemotaxis, ECM	diabetic ulcers, venous ulcers, pressure ulcers
GMCSF	macrophages, fibroblasts, endothelial cells	hematopoietic, inflammatory cells, neutrophils, fibroblasts	S: chemotaxis of endothelial cells, inflammatory cells S: keratinocyte proliferation, activation of neutrophils	venous and arterial ulcers
HGH	pituitary gland	hepatocytes, bone, fibroblasts	S: IGF-1 production	venous ulcers
IL-1	lymphocytes, macrophages, keratinocytes	monocytes, neutrophils, fibroblasts, keratinocytes	S: monocytes, neutrophils S: macrophage chemotaxis	pressure ulcers
PDGF	platelets, macrophages, neutrophils, smooth muscle cells	fibroblasts, smooth muscle cells	S: proliferation of smooth muscle cells and fibroblasts S: chemotaxis S: ECM, contraction	diabetic ulcers, pressure ulcers
TGF-β	platelets, bone, most cell types	fibroblasts, endothelial cells, keratinocytes, lymphocytes, monocytes	S: ECM, fibroblast activity S: chemotaxis I: proliferation of keratinocytes, endothelial cells	venous ulcers, pressure ulcers

Resum



Preparació del medi

Encara que tots els medis poden fer-se amb els ingredients bàsics, això consumeix temps i pot predisposar a una contaminació. Per comoditat, molts medis estan disponibles per comprar en format pols (ready mixed powders) o com a medi líquid de 10x i 1x.

Si es compren powders o medis de 10x, és essencial que l'aigua utilitzada per reconstituir els medis estigui lliure de contaminants minerals, orgànics i microbians. També ha de ser lliure de pirogens.

Una vegada preparat el medi, s'ha d'ajustar de manera adequada el pH i després filtrar el medi i esterilitzar-lo, abans d'utilitzar. .

Cada tipus cel·lular té uns requeriments de creixement específic → hem d'escollir correctament el tipus de medi.

En general:

- RPMI- 1640 per cèl·lules en suspensió
 - MEM per cèl·lules adherents
-

Cell Line	Morphology	Species	Medium	Applications
HeLa B	Epithelial	Human	MEM+ 2mM Glutamine+ 10% FBS + 1% Non Essential Amino Acids (NEAA)	Tumourigenicity and virus studies
HL60	Lymphoblast	Human	RPMI 1640 + 2mM Glutamine + 10-20% FBS	Differentiation studies
3T3 clone A31	Fibroblast	Mouse	DMEM + 2mM Glutamine +5% New Born Calf Serum (NBCS) + 5% FBS	Tumourigenicity and virus studies
COS-7	Fibroblast	Monkey	DMEM+ 2mM Glutamine + 10% FBS	Gene expression and virus replication studies
CHO	Epithelial	Hamster	Ham's F12 + 2mM Glutamine + 10% FBS	Nutritional and gene expression studies
HEK 293	Epithelial	Human	EMEM (EBSS) + 2mM Glutamine + 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) + 10% FBS	Transformation studies
HUVEC	Endothelial	Human	F-12 K + 10% FBS + 100 µg/ml Heparin	Angiogenesis studies
Jurkat	Lymphoblast	Human	RPMI-1640 + 10% FBS	Signaling studies

Table 3. Common cell lines and recommended growth media

Medis més comuns

És important llegir els requeriments de medi de cada tipus cel·lular per escollir el medi que afavorirà el creixement

- EMEM
 - RPMI 1640
 - DMEM
-

EMEM (Eagle's minimum essential medium)

El EMEM conté una solució salina equilibrada, aminoàcids no essencials i piruvat de sodi. Està formulat amb una concentració de bicarbonat de sodi reduïda (1500 mg/l) per a usar amb 5% de CO₂.

No es un medi complex, per tant, generalment es fortifica amb suplementes addicionals o nivells de sèrum majors, fent-ho apropiat per a una àmplia gamma de cèl·lules de mamífers.



DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)



El DMEM té gairebé el doble de concentració d'aminoàcids i quatre vegades la quantitat de vitamines que el EMEM, així com nitrat fèrric, piruvat de sodi i alguns aminoàcids suplementaris. La formulació original contenia 1,000 mg/L de glucosa i en un principi va ser descrit per a conrear cèl·lules embrionàries de ratolí.

Una variant posterior amb 4500 mg/L de glucosa ha mostrat ser òptima per al cultiu d'una gran varietat de cèl·lules.

RPMI 1640

És un medi d'ús general amb un ampli rang d'aplicacions en cèl·lules de mamífers, especialment cèl·lules hematopoètiques.

El RPMI-1640 va ser desenvolupat en el Roswell Park Memorial Institute (RPMI) en Buffalo, Nova York. El RPMI-1640 és una modificació del 5A de McCoy i va ser dissenyat per al cultiu a llarg termini de limfòcits de sang perifèrica.

El RPMI-1640 usa un sistema de tampó de bicarbonat i difereix de la majoria dels medis de cultiu de cèl·lules de mamífers en què el seu pH típic és de 8. El RPMI-1640 permet el creixement d'una àmplia varietat de cèl·lules en suspensió i crescudes en monocapa. Si li ho suplementa adequadament amb sèrum o un reemplaçament adequat del sèrum, el RPMI-1640 té un ampli rang d'aplicacions per a cèl·lules de mamífers, incloent-hi el cultiu de limfòcits humans recentment extrets, protocols de fusió i el creixement de cèl·lules híbrides.



Medis semi-sòlids



Medis semi-sòlids

Methylcellulose medium is a type of semi-solid medium that can be used for culturing hematopoietic stem and progenitor cells in colony-forming assays, or culturing hybridomas and Chinese hamster ovarian cells for cell line development.

Permet **aïllar cèl·lules de manera individual**, és a dir, permet aïllar clons →
Hibridomes



Cell environmental culture behaviour

Motilitat cel·lular

El moviment de les cel·lules en el seu substrat és essencial pel cultiu (p.ex: permetre les cel·lules que migrin del teixit explantat)

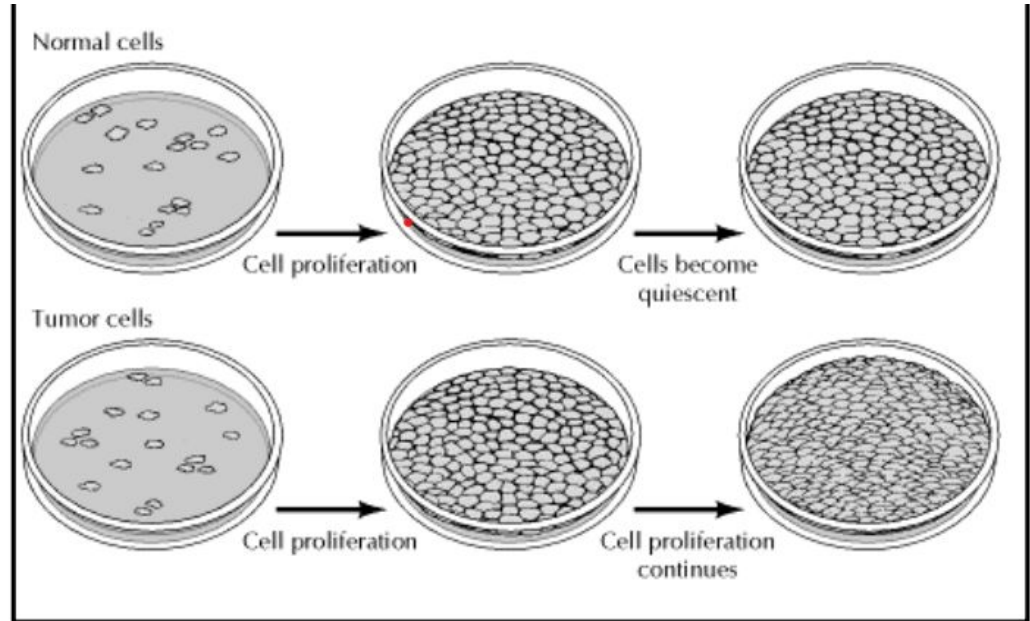
Les cèl·lules més mòbils són els fibroblasts a una baixa densitat cel·lular, ja que migren de manera individual.

Per moure's hi ha una restructuració de la xarxa d'actina cap a la zona de moviment (crawling motion) adherint-se al substrat i alliberant els punts de contacte a l'altre extrem.

Inhibició per contacte

Propietat de les cèl·lules en cultiu per la qual deixen de proliferar en entrar en contacte entre si.

És un dels fenòmens que es troba inactivat en les cèl·lules canceroses.



Cell attachment

1. Absorption
 2. Contact
 3. Attachment
 4. Spreading
-

Cell growth surface and cell attachment

Cell attachment process

