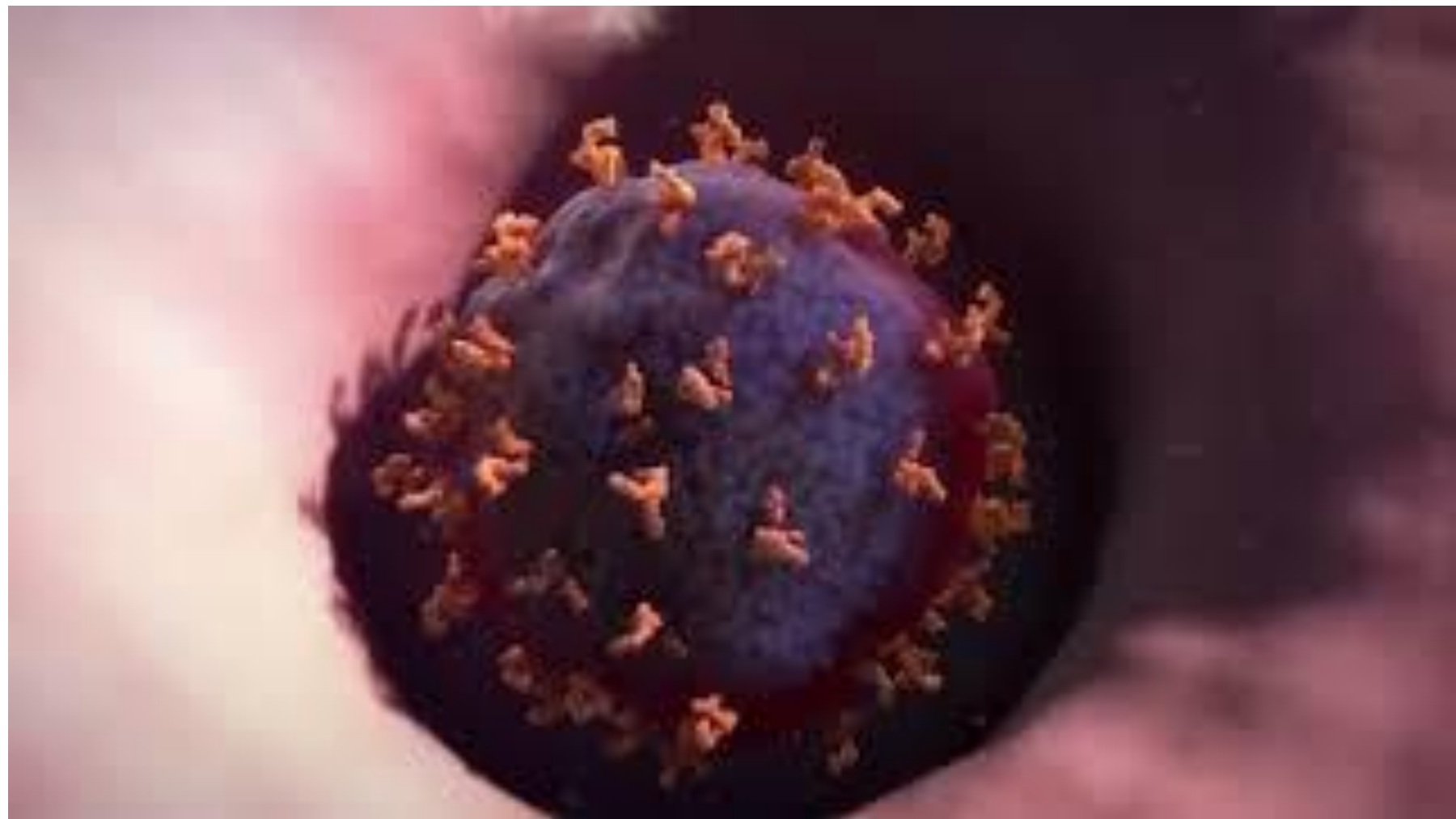

3. Cultius cel·lular

— M01. Cultius cel·lulars —

- 1.1 Reconeix les estructures cel·lulars i subcel·lulars i les seves funcions.
- 1.2 Caracteritza els diferents tipus de cèl·lules.
- 1.3 Reconeix les etapes del cicle cel·lular.
- 1.4 Descriu els principis de la genètica cel·lular.
- 1.5 Descriu l'evolució històrica dels cultius cel·lulars.
- 1.6 Caracteritza les cèl·lules primàries i les línies cel·lulars.
- 1.7 Descriu metodologia per a garantir l'asèpsia en els cultius cel·lulars.
- 1.8 Justifica la importància de l'asèpsia en els cultius cel·lulars.

Els cultius cel·lulars són el conjunt de tècniques que permeten el manteniment de cèl·lules fora de l'organisme d'origen, mantenint les seves propietats fisiològiques, bioquímiques i genètiques, per un temps variable.



Tipus de cultiu

- a) Segons origen:
 - i) Primari
 - ii) Línies cel·lulars: primàries o contínues
- b) Segons preservació estructura cel·lular
 - i) En adherència o monocapa
 - ii) En suspensió
 - iii) Teixit - explant
 - iv) 3D
- c) Segons cèl·lules
 - i) Embrionàries
 - ii) Tumorals
 - iii) "normals"
 - iv) Stem cells

Cada tipus de cultiu té unes característiques determinades recollides en la seva fitxa tècnica

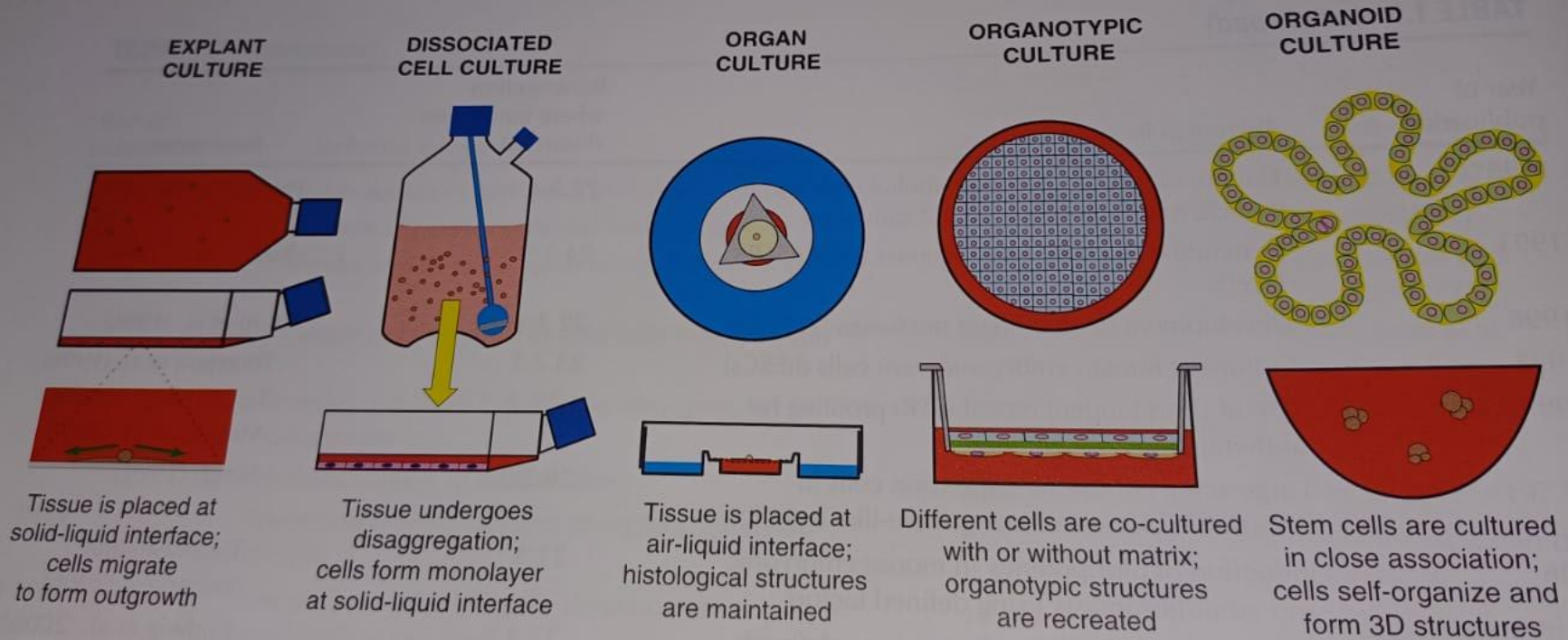
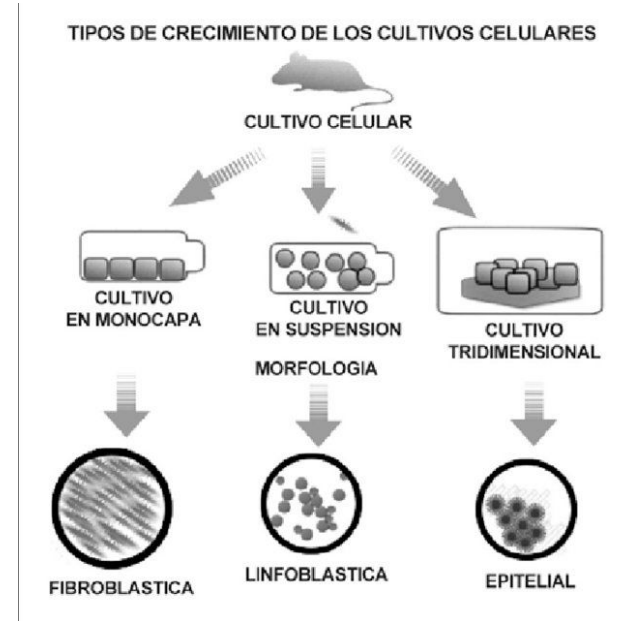


Fig. 1.4. Types of tissue culture. Additional terms may be used to describe 3D culture; see Figure 27.1.

Segons preservació estructura cel·lular

- A) **Cultius cel·lulars:** obtingudes per la disgregació d'un teixit
- a) Monocapa o adherencia: les cèl·lules s'uneixen al suport per créixer
 - b) Suspensió: creixement en un medi líquid
 - c) Cultius 3D: creació d'estructures 3D

- B) **Teixits:** conservació total o parcial d'un teixit



Factors que determinen i defineixen el bon estat cel·lular de les cèl·lules:

1. Naturalesa del substrat
2. Contacte intercel·lular
3. Composició del medi de cultiu
4. Constitució de la fase gasosa
5. Temperatura d'incubació



37°C
5% de CO₂ (pH)
Humitat
Medi de cultiu ric en AA
Antibiòtics

Com /d'on s'obtenen els cultius cel·lulars?

Les cèl·lules han de tenir unes característiques determinades que en permetin el cultiu:

1. Han de poder-se disgregar.
2. Han de poder-se adherir al substrat.
3. Han de poder-se dividir amb una alta taxa de creixement.
4. Han de ser sensibles a inhibidors i/o estimulants de creixement.

Els cultius cel·lulars s'originen mitjançant disgregació (enzimàtica o mecànica) d'un teixit o per evolució d'explants. Les cèl·lules proliferen arribant a ocupar tota la superfície del recipient, per la qual cosa es poden propagar.

Confluència

La majoria de línies cel·lulars que creixen adherides al suport pateixen una parada en el seu creixement a densitats elevades, imposada pel procés d'**inhibició per contacte**.

Depenent de la morfologia i propietats de cada línia, les cèl·lules deixen de dividir-se, bé quan ocupen tota la superfície de la placa, o bé quan totes estan en contacte amb altres (sense necessitat de cobrir completament el suport).

A aquesta situació (o densitat) se'l denomina **CONFLUÈNCIA** del cultiu.

La confluència és el percentatge de l'àrea del mitjà de creixement coberta per cèl·lules adherents. (p. ex. 50% confluència indica que 50 de 100 parts de la superfície de creixement estan ocupades per cèl·lules – si la superfície és 2 cm², després 1 cm² serà ocupat).

Aquest indicador s'utilitza per a avaluar el creixement i l'expansió cel·lular i quan dividir les cèl·lules., abans que aconseguixin la confluència total (generalment en 80% confluència, però variable entre diferents tipus de cèl·lules).

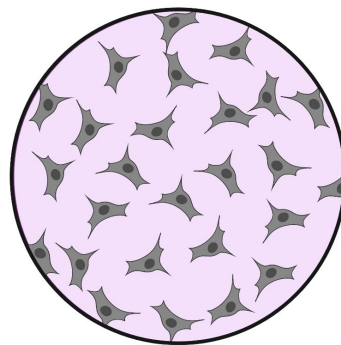
La confluència es mesura:

- Estimació visual, requereix pràctica
 - Softwares
- 
- CÀLCULS DENSITAT CEL·LULAR

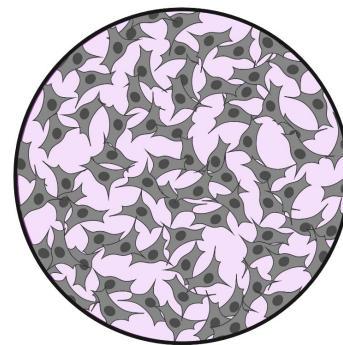
Confluència

Quan les cèl·lules arriben a una confluència del 80-90% ja estan llestes per a realitzar un subcultiu.

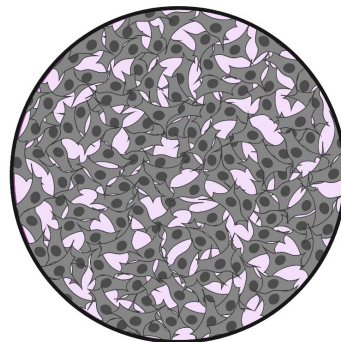
Si les deixéssim créixer fins a una confluència del 100% i estiguessin molt temps sota aquestes condicions, es produiria una inhibició per contacte entre les cèl·lules i per tant deixarien de créixer i entrarien en el procés de senescència i mort cel·lular.



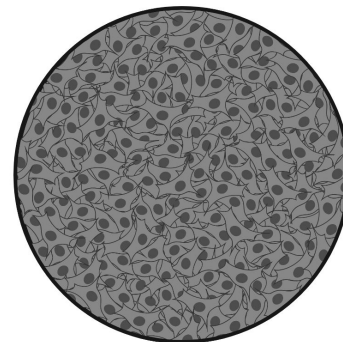
20%



50%



80%



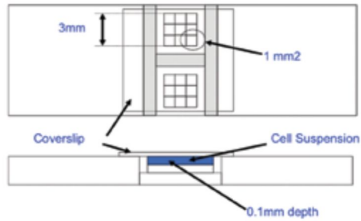
100%



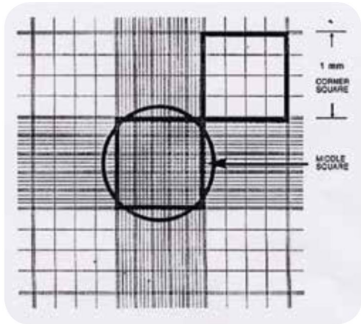


Densitat cel·lular

A haemocytometer being filled with cell suspension



Dimensions of a haemocytometer



- Cells/mL

Hem de fer el comptatge en les cambres de recompte, en la imatge veiem les dimensions d'una Neubauer convencional, però ens hi hem de fixar sempre.

Volum quadrant = ?

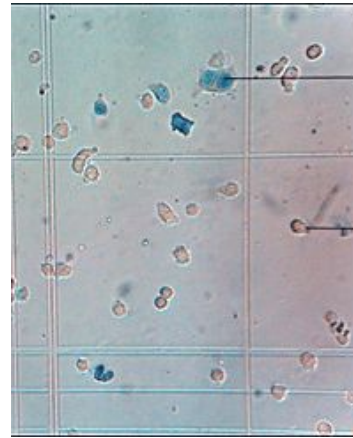
Comtatge = cells/n^oquadrants

Densitat = n^ocells/n^oquadrants x quadrant/volum x FD

També podem calcular el numero total de cells:

$$n^{\circ}Cells = V_{total} \times [cells]$$

Viabilitat (%)



MUERTAS: Células teñidas.

VIVAS: Células
blancas.

Viabilitat= (cells vives /cells totals) x100

→ Haurem de contar les **cè·l·lules mortes**: BLAU DE TRIPÀ

La viabilitat es pot contar tant de les cè·l·lules contades en les cambres com de les cells totals

Càlculs viabilitat

Es tripsiniza un flascó de 75 cm^2 , el pèl·let cel·lular és resuspès en 2 ml de medi. Al contar en cambra de Neubauer amb blau de tripà observem una mitjana de 58 cèl·lules vives i 5 mortes. Indiqueu:

a- Quantitat de cèl·lules totals.

b- Viabilitat.

Exercici 2

Estem fent un estudi de la viabilitat de les nostres cèl·lules en cultiu. D'una placa on hi ha 3 mL de suspensió cel·lular agafem 20 μ L per fer el contacte cel·lular. Inicialment intentem visualitzar en les nostres cambres de Neubauer 10 μ L de la suspensió juntament amb 10 μ L de blau de tripà, però hi ha masses cells per poder fer un contacte després de carregar 10 μ L en la cambra

Com a tècnics decidim afegir 10 μ L de PBS per disoldre la solució que ja té blau de tripà i, aquesta vegada observem:

- 1r quadrant: 50 cells transparents i 10 blaves
- 2n quadrant: 68 cells totals i 11 blaves
- 3r quadrant: 72 cells totals i 57 transparents
- 4t quadrant: 53 cells transparents i 6 blaves

06/11

Recollim una suspensió cel·lular de SF9 en confluència amb un volum de 4,5 mL i fem el contacte a la càmera de Neubauer. Hem hagut de dil·luir 10uL de suspensió cel·lular amb 90uL de PBS, ja que la concentració és molt elevada. Hem contat el següent número de cells:

- 105 cells transparents + 15 blaves
- 97 cells totals + 9 blaves
- 84 cells transparents + 11 blaves
- 92 cells totals i 71 cells transparents

Calcula la **viabilitat i cells totals** d'aquesta suspensió

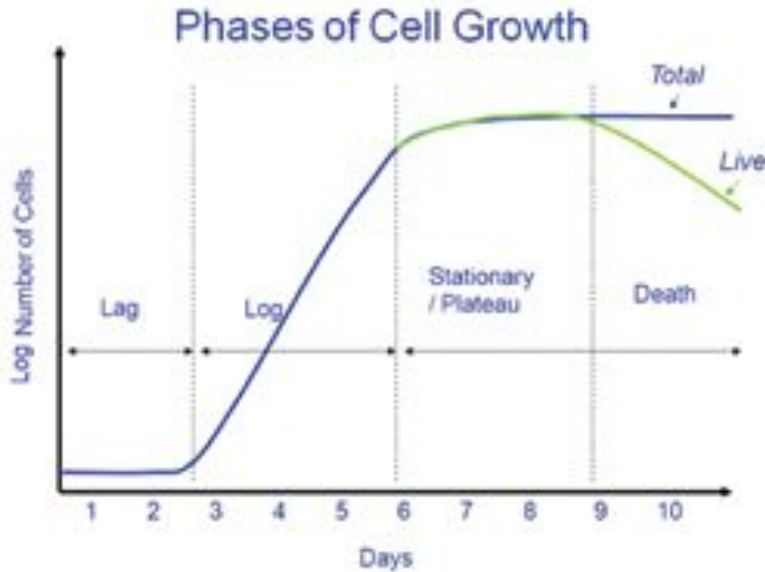
Recollim una suspensió cel·lular de SF9 en confluència amb un volum de 4,5 mL i fem el contacte a la càmera de Neubauer. Hem hagut de dil·luir 10uL de suspensió cel·lular amb 90uL de PBS, ja que la concentració és molt elevada. Hem contat el següent número de cells:

- 105 cells transparents + 15 blaves
- 97 cells totals + 9 blaves
- 84 cells transparents + 11 blaves
- 92 cells totals i 71 cells transparents

Calcula la **viabilitat i cells totals** d'aquesta suspensió

Creixement d'un cultiu

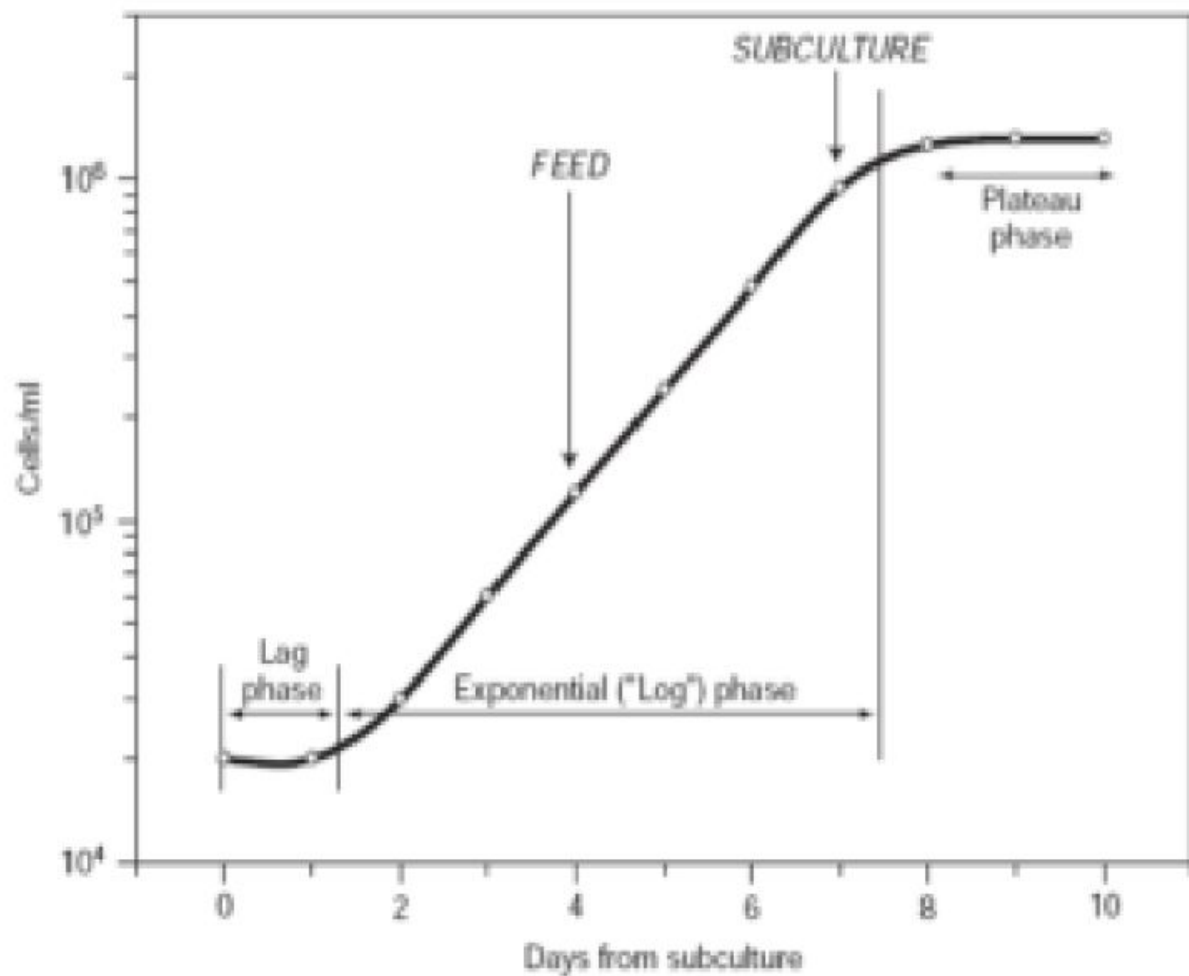
Una alteració en el creixement cel·lular pot indicar un problema significatiu dins de la línia de la cèl·lula i si no es detecta, pot tenir efectes perjudicials sobre els resultats experimentals

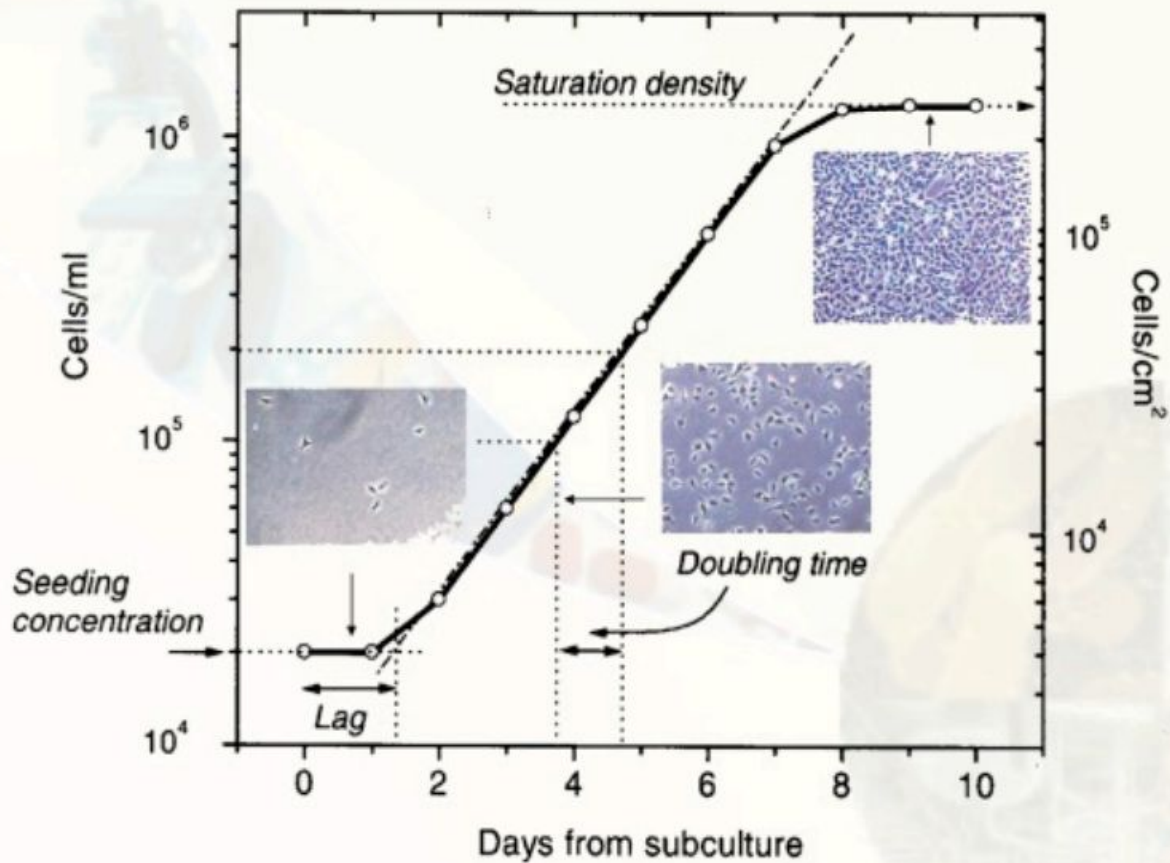


Una corba de creixement típica mostra un patró sigmoide de proliferació. La Les fases de creixement associades amb cel·les normals es defineixen com:

- 1. Fase Lag:** en aquesta etapa les cèl·lules no es divideixen, s'adapten a les condicions del cultiu. La durada d'aquesta fase dependrà de la fase de creixement de la línia cel·lular en el moment del subcultiu i també de la densitat de sembra.
- 2. Fase de creixement logarítmic (Log):** proliferació activa i exponencial. Es produeix un augment de la densitat cel·lular. Cada línia cel·lular mostrarà diferent cinètica de proliferació. És el punt on s'hauria de produir un subcultiu.
- 3. Fase estacionària:** la proliferació cel·lular disminueix a causa de la que la població esdevé confluent. Les cèl·lules són més susceptibles a lesions.
- 4. Fase de la declinació:** la mort cel·lular predomina en aquesta fase i hi ha una reducció en la nombre de cel·les viables. La mort cel·lular no es deu a la reducció de nutrients, sinó a la progressió natural del cicle cel·lular.

Depenent de l'experiment utilitzarem les cells en una fase o en una altra





Normal growth curve of animal cells.

Cell doubling time (Td o T2)

Valor que determina el comportament de creixement (growth behaviour) o dinàmica del cultiu cel·lular.

Es tracta del temps que tarda una cell a completar el cicle cel·lular. És a dir, a duplicar-se. I quan parlem del cultiu cel·lular és el temps que esperem que la població cel·lular es dupliqui

És característic de cada línia cel·lular*

És clau per saber quan és necessari fer un pase

$$\text{Doubling time} = \frac{\text{Duration} \cdot \ln(2)}{\ln\left(\frac{\text{Final concentration}}{\text{Initial concentration}}\right)}$$

$$\text{Doubling time} = \frac{\text{Duration} \cdot \ln(2)}{\ln\left(\frac{\text{Final concentration}}{\text{Initial concentration}}\right)}$$

Condicions creixement cultius

pH	CO ₂	Temperatura
<p>Línies cel·lulars mamífers: pH=7,4 (hi ha variacons amb línies transformades i en línies fibroblàstiques) Les línies d'insectes, pH=6,2</p>	<p>Es necessari utilitzar CO₂ exogen per controlar el pH cel·lular. S'utilitza entre un 4–10% CO₂ i en els procediments de cultiu cel·lular, que dependrà del tipus de medi utilitzat (de la concentració de bicarbonat que tingui aquest)</p>	<p>Línies humanes i mamífers= 36-37°C Cells Insectes = 27-30°C Línies aviars = 38,5°C Animals de sang freda = 15-26°C</p>

Les condicions varien amb cada tipus cel·lular, és important conèixer bé les característiques ja que una desviació en aquetes condicions pot provocar la pèrdua del creixement cel·lular o l'expressió de fenotips aberrants fins a pèrdua del cultiu.

CELL CULTURE HANDLING


Safe Laboratory Practices

Normes bàsiques:

- PPI
- No menjar ni veure
- Gestió de residus


CULTIUS CEL·LULARS

1. Neteja de mans
2. Neteja de superfícies
3. Guants **NETS!** (EtOH 70%)
4. No obrir material fora la campana
5. Minimitzar aerosols - NO Talking



En un laboratori
de cultius NO
protegim la
persona, sinò la
MOSTRA

Handling - Moviments a la campana

- Material estèril  - Waste
- Moviments curtosos - Spills
- Conèixer el nou equipament
- Evitar agafar medi i reactius directament de les ampolles originals →
ALIQOTES
- Quan obrim un falcon o ampolla, com posem el tap?

Proposta campana

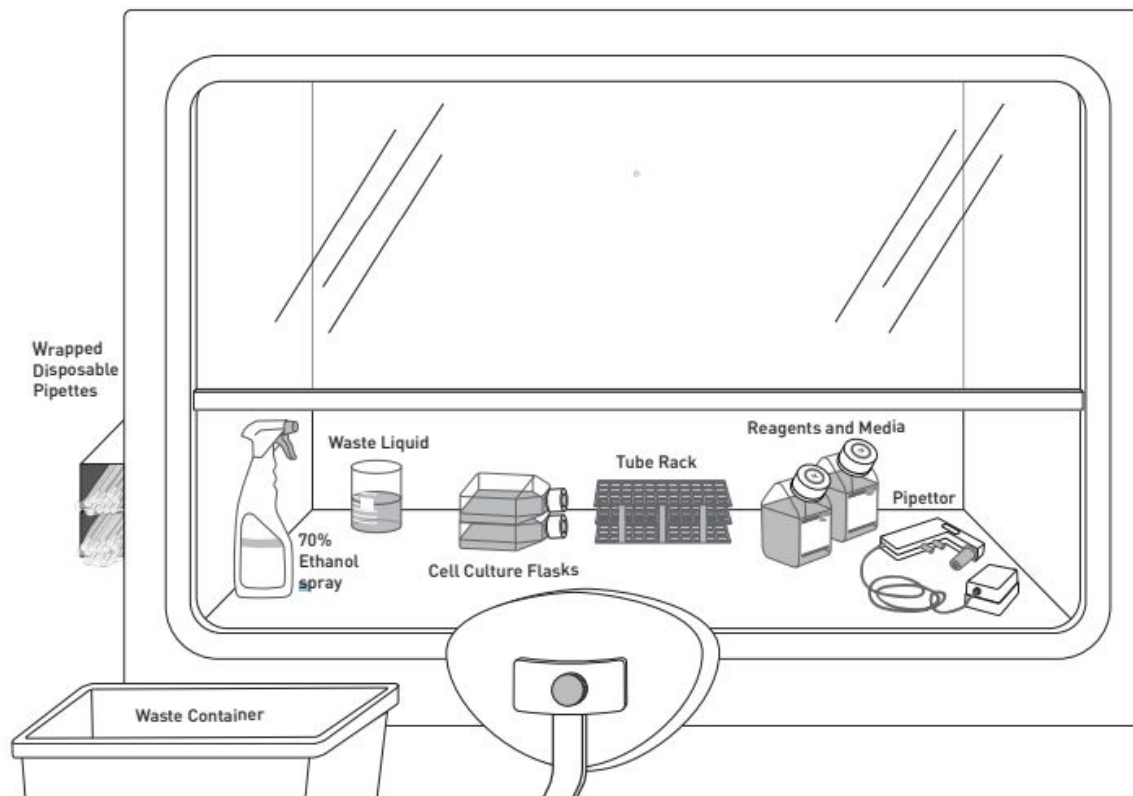


Figure 2.1. The basic layout of a cell culture hood for right-handed workers. Left-handed workers may switch the positions of the items laid out on the work surface.

Protocol Asepsia

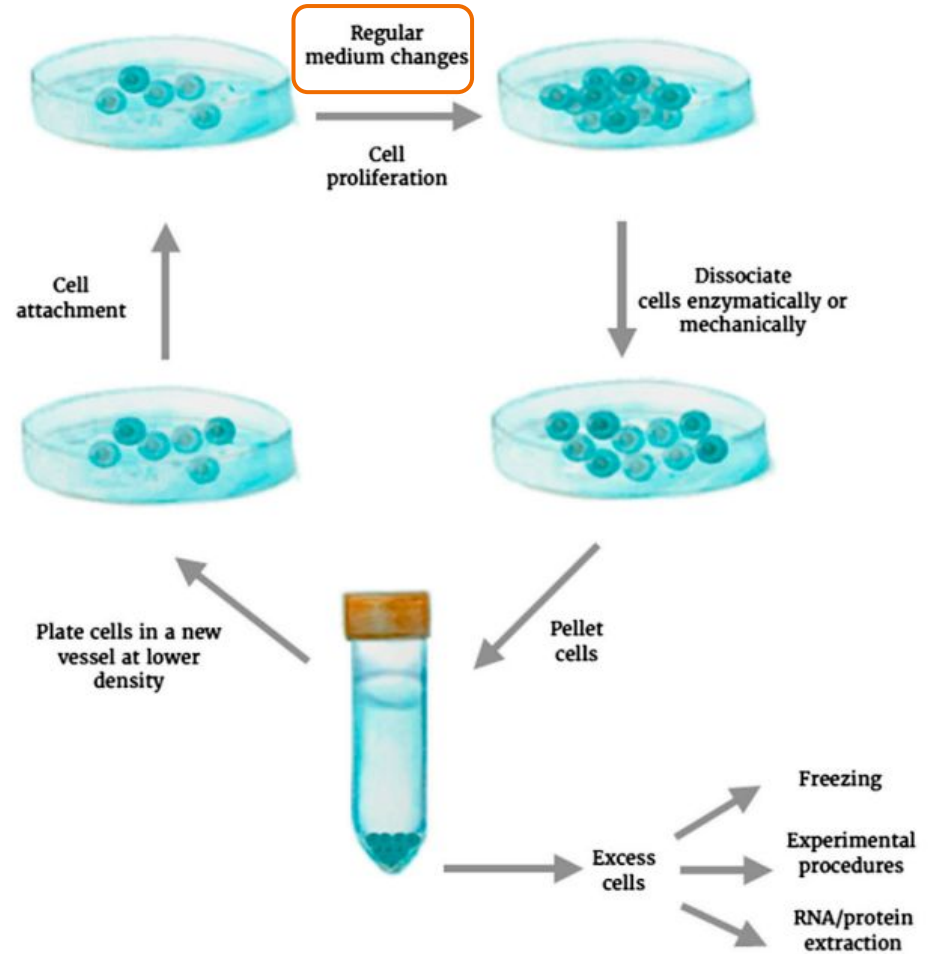
Fer un checklist de coses que hem de tenir en compte abans d'entrar a la campana que imprimirem i penjarem perquè sigui visible per tothom.



MANTENIMENT CULTIUS

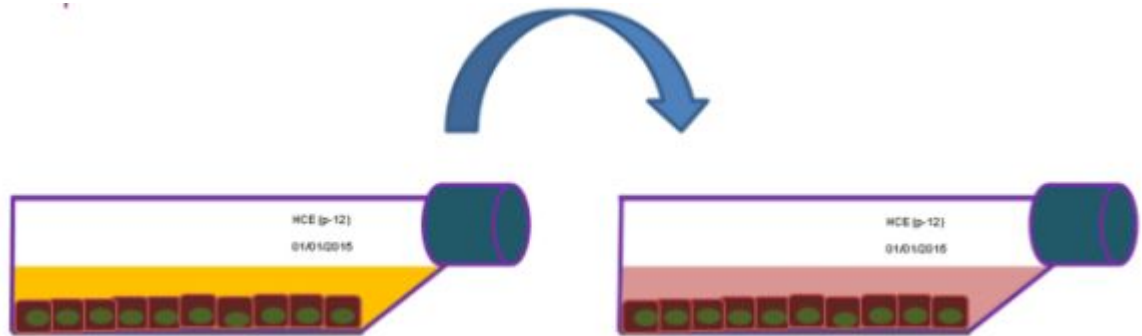
Manteniment

- Canvi de medi
- Subcultius
- Criopreservació
- Control contaminació



1. Canvi de medi

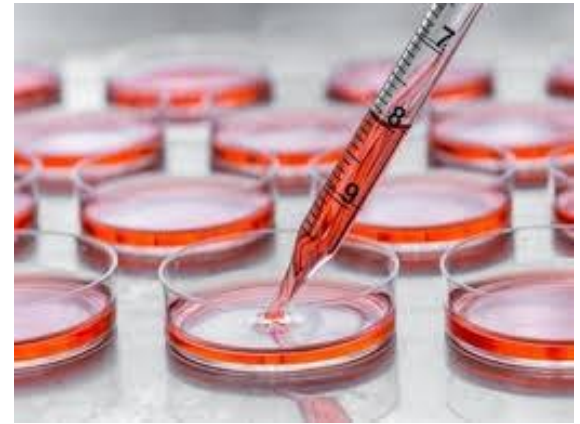
Procés de substitució del medi de cultiu per medi fresc. És sol realitzar cada 48/72h en funció de les nostres observacions al microscopi i d'altres indicadors com és el canvi de color del medi.



Canvi de medi

El **medi de cultiu** aporta a les cèl·lules els nutrients mínims: solució salina, aa, vitamines, glucosa, sèrum, etc. Sol contenir antibiòtics i antifúngics, i un indicador de pH (roig de fenol).

Cada tipus cel·lular té unes característiques determinades i requisits específics → diferents tipus de medi (DMEM, MEM, RPMI, etc.)



Per mantenir les cèl·lules en condicions òptimes aquest medi s'ha de renovar cada 48h/72h:

1. Eliminació medi antic
2. Incorporació nou medi **atemperat**

Rentar amb PBS quan canviem el medi?



Si eliminem el 100% del medi antic i el canviem per medi nou, podem provocar una aturada en el creixement. Per això aspirarem el medi deixant una petita part de medi antic: pot contenir FT i GF que ajudin al medi a continuar creixent.

2. Subcultiu o passi

Com hem comentat no és addient mantenir les cèl·lules en cultiu en confluència durant llargs períodes de temps, per tant el que s'han de realitzar són **subcultius**. D'aquesta manera evitem la senescència cel·lular.

Un subcultiu consiteix en l'aixecament i/o recol·lecció de cèl·lules d'un flascó de cultiu, i el seu posterior passi en un altre flascó on es trobarà en menor densitat cel·lular que li segueixi permetent el creixement.

Aquest procés s'ha de realitzar en funció de la densitat del nostre cultiu, que s'ha d'anar controlant via observació de les plaques o flascons i mitjançant un recompte cel·lular

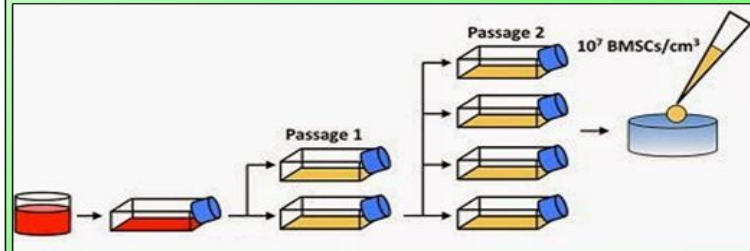
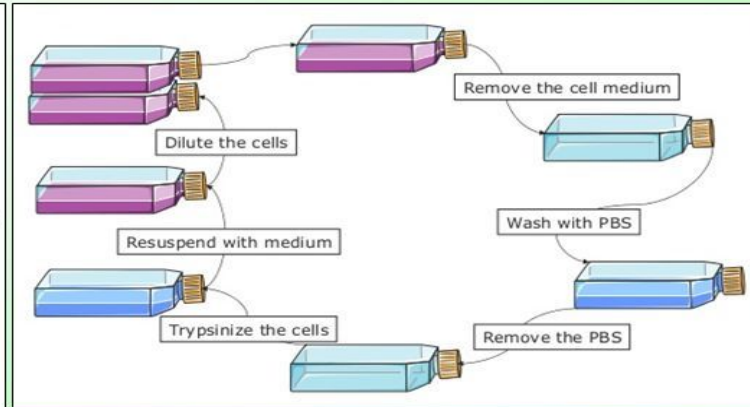
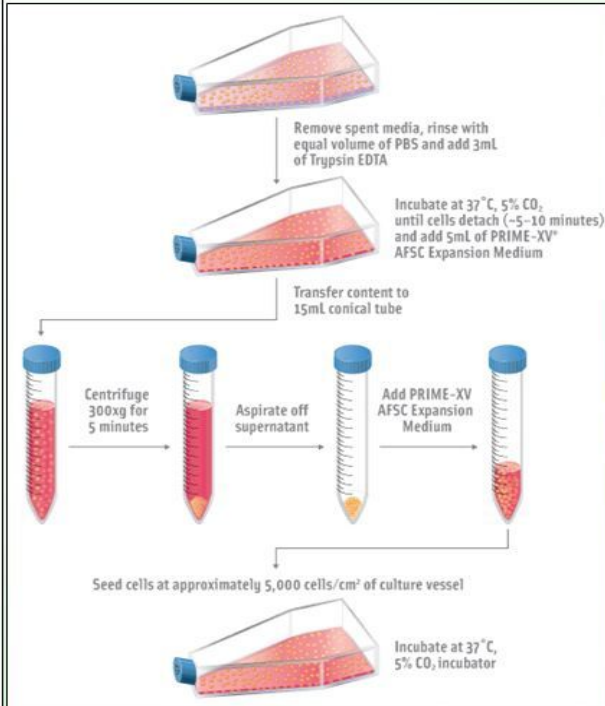
Fases subcultiu - Pase

1. Observació al microscopi
2. Eliminació medi
3. Aixecament cells
 - a. Físic: Scrapping
 - b. Químic: Tripsinització o EDTA (quelant de calci)
4. Observació
5. Centrifugació
6. Recompte
7. Dil·lució
8. Nova sembra per a expansió

Aquest procés pot variar en funció del tipus de cultiu que tinguem:

- Cultius en suspensió
- Cultius adherents

Cultivos celulares



Subcultivo de una monocapa (2)

Tripsinització

La **tripsina** és un enzim que elimina les unions entre les cèl·lules i el substrat.

Aquest procés ha de realitzar-se amb cura, ja que la tripsina també és capaç de destruir les cèl·lules per digestió total.

Quan les cèl·lules s'han separat, s'afegeix al recipient de cultiu un medi amb **sèrum (FBS)**. En el sèrum hi ha molècules que inhibeixen la tripsina, detenint-se la reacció i impedit així la destrucció cel·lular.

5. Sub-culturing



Sub-culturing should always be done with aseptic technique in sterile conditions

- Split ratios can be used to ensure cells should be ready for an experiment on a particular day, or just to keep the cell culture running for future use or as a backup. Suspension cell lines often have a recommended sub-culture seeding density. Always check the guidelines for the cell line in use. Some slow growing cells may not grow if a high split ratio is used. Some fast growing cells may require a high split ratio to make sure they do not overgrow. Note that most cells must not be split more than 1:10 as the seeding density will be too low for the cells to survive.

As a general guide, from a confluent flask of cells:

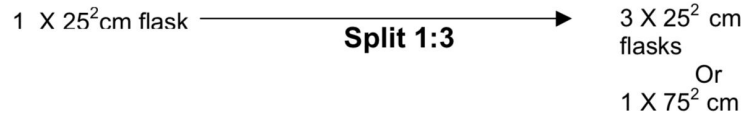
1:2 split should be 70-80% confluent and ready for an experiment in 1 to 2 days.

1:5 split should be 70-80% confluent and ready for an experiment in 2 to 4 days.

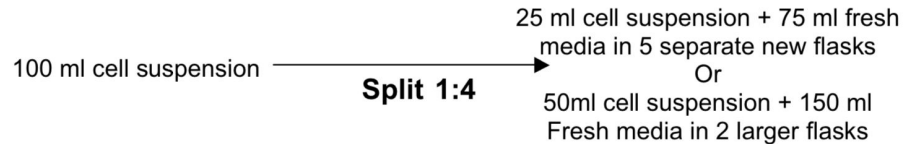
1:10 split should be 70-80% confluent and ready for sub-culturing or plating in 4 to 6 days.

Caps de setmana

Attached cell line split ratios are done on volume of flask surface area:



Suspension cell line split ratios are done on volume of culture cell suspension:



Videos Laura Duran

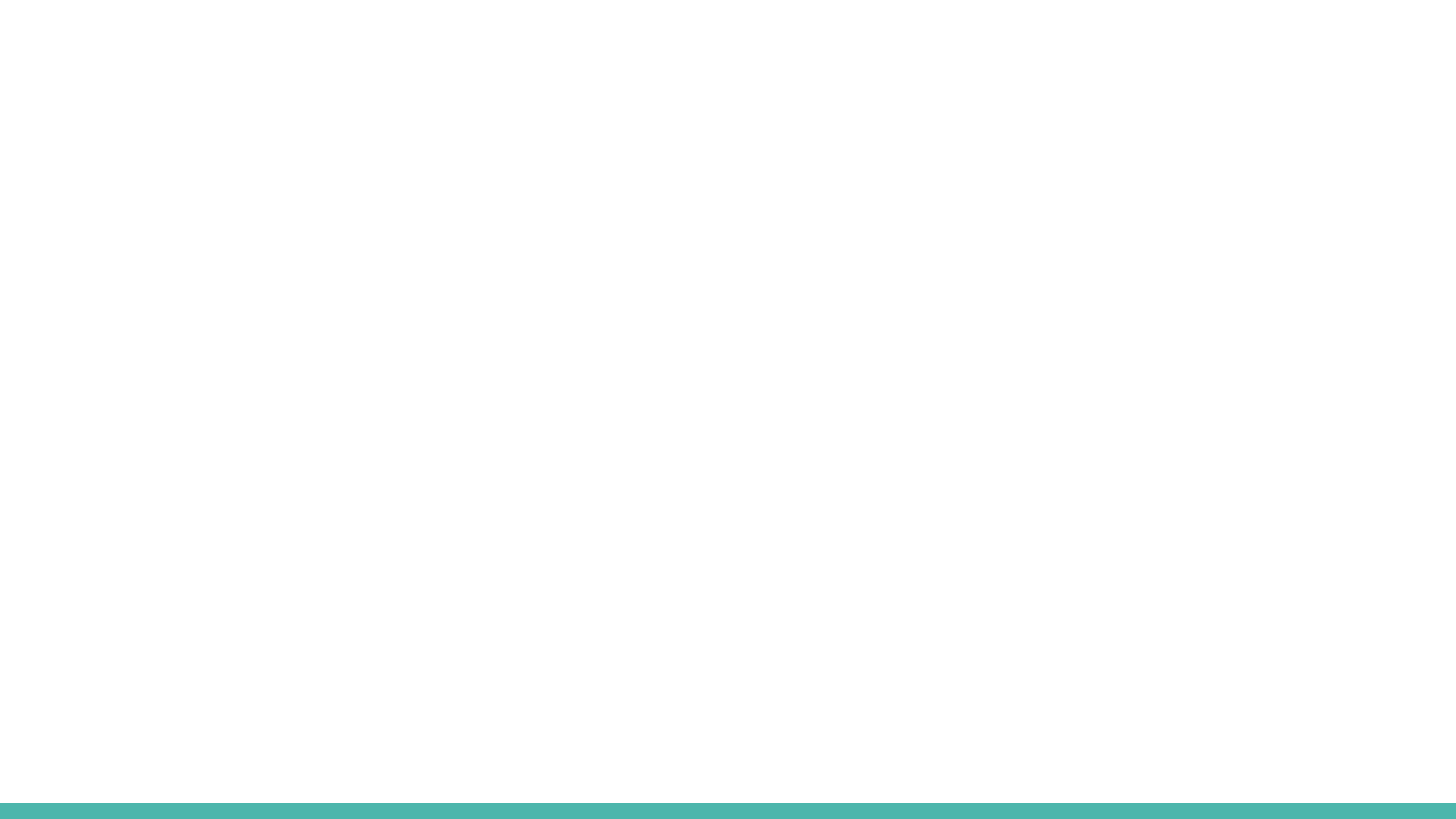
CELL VIRTUAL LAB

Càlculs pasis

Tens un flascó de 75 cm² de HEK293 en confluència que necessites per sembrar 5 plaques de 24 pouets. La suspensió cel·lular que reculls et dona una concentració de $5,4 \times 10^7$ cèl·lules/mL i tens 3,2 mL en total. Als pouets de les plaques necessites 2×10^3 cèl·lules i la resta de cèl·lules les utilitzaràs per sembrar flascons.

Càlculs

Tens un flascó de 25 cm² de COS-7 en confluència que necessites per sembrar 1 placa de 6 pouets. La suspensió cel·lular que reculls et dona una concentració de $5,8 \times 10^6$ cèl·lules/mL i tens 3,7 mL en total. Als pouets de les plaques necessites $0,3 \times 10^6$ cells/mL i la resta de cèl·lules les utilitzaràs per sembrar flascons.



3. Criopreservació

L'objectiu és permetre emmagatzemar cèl·lules a llarg plaç, però també permet:

- reduir risc de contaminació externa
- reduir risc contaminació creuada
- reduir pases, provoquen inestabilitat gènica
- reduir cost (€)

Condicions per poder tenir una criopreservació exitosa:

1. <90 de viabilitat
2. Abscència de contaminació
3. Fase log
4. Alta concentració de serum (proteïnes)
5. **Medi crioprotector** (DMSO o glicerol)



Evita la formació de cristalls de gel, i la conseqüent ruptura de les cèl·lules

