

Biología Celular y Molecular

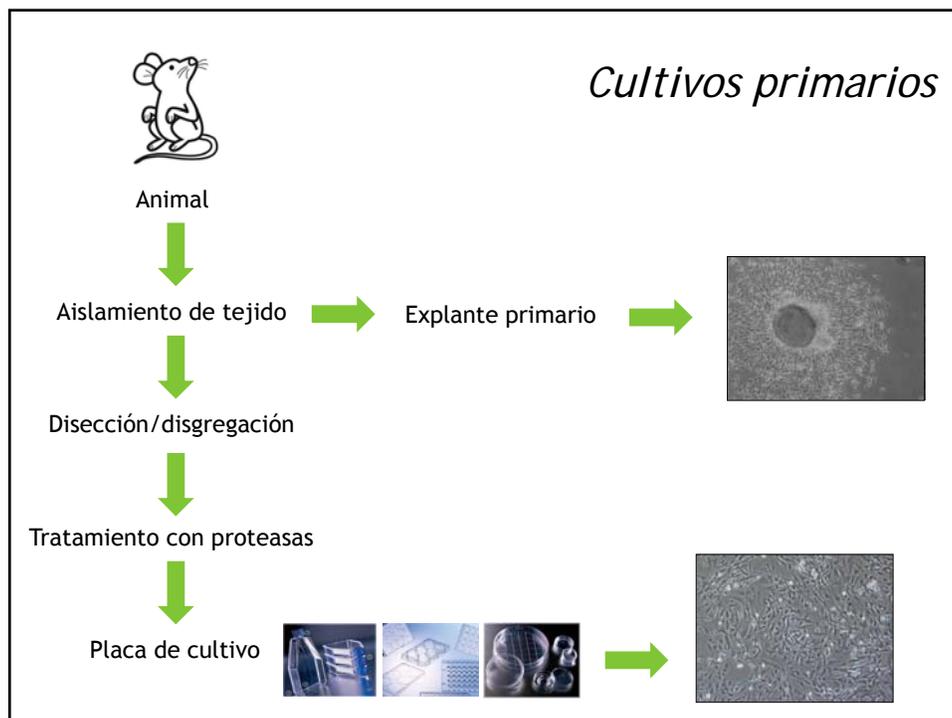
Cultivo celular

Métodos y técnicas de cultivo celular

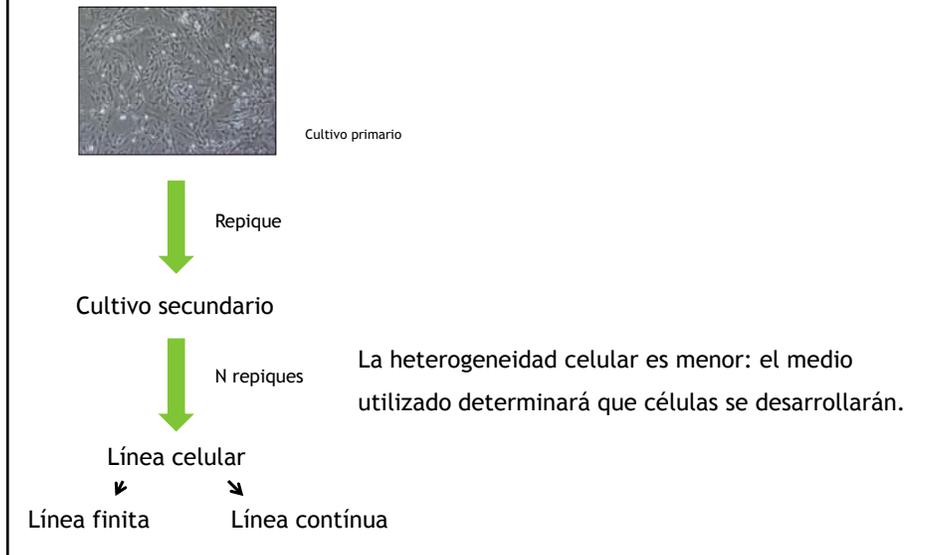
¿Por qué estudiar células in vitro?

Son plataformas tecnológicas esenciales para el desarrollo de múltiples investigaciones científicas.

- ✓ Es una fuente homogénea de un tipo celular dado.
- ✓ Mayor control de las condiciones experimentales.
- ✓ No hay un nivel de organización real; permite el estudio de procesos de forma simplificada (OJO! hay que saber extrapolar resultados).
- ✓ Es mas simple y barato que criar animales.
- ✓ La mayoría de las líneas utilizadas están disponibles comercialmente; los resultados obtenidos por diferentes grupos pueden compararse.



Cultivos secundarios y líneas celulares



Líneas celulares

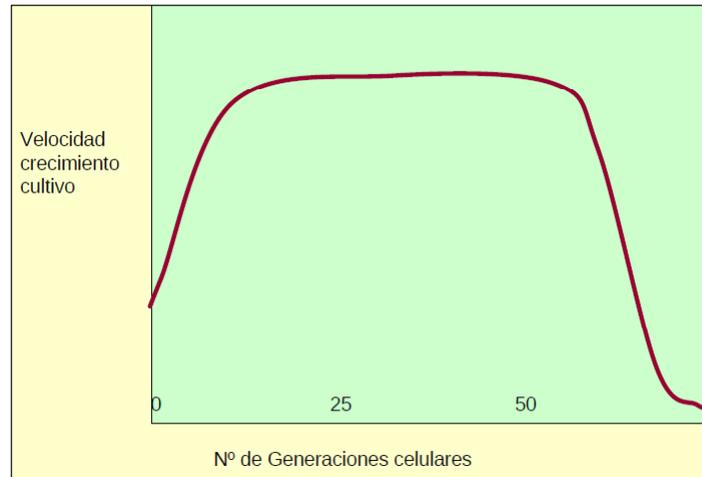
Finitas

Son líneas celulares que sobreviven durante un número limitado de pasajes para después entrar en senescencia. La mayoría de las líneas normales son finitas.

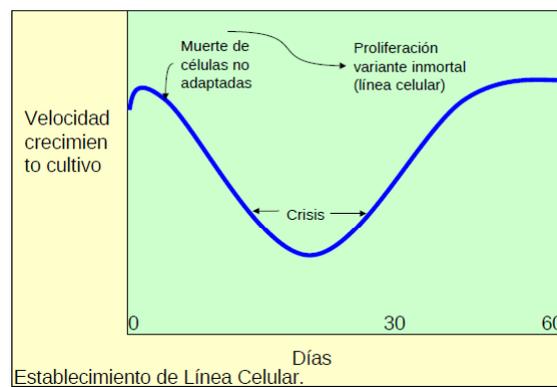
Contínuas

Son líneas celulares que están inmortalizadas (pueden dividirse en cultivo indefinidamente, sin demostrar síntomas de senescencia). Para que una línea finita pase a ser continua, debe sufrir un proceso denominado "transformación" (cambio en el perfil de expresión proteico, nro. cromosómico, etc). Estas líneas pueden generarse artificialmente o ser aisladas de un tejido tumoral.

Cultivo primario de embrión de pollo



Línea celular: población de células animales o vegetales con capacidad de dividirse indefinidamente en condiciones in vitro.

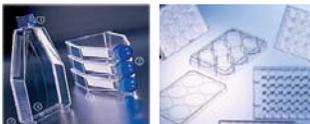


Líneas celulares

Línea celular	Procedencia	Tipo celular de origen
MDCK	Perro	Riñón
VERO	Mono	Riñón
CHO	Hámster	Epitelio del ovario
CV-1	Mono	Riñón
NIH-3T3	Ratón	Fibroblastos de embrión
Rat-1	Rata	Fibroblastos de embrión
Hela	Humana	Carcinoma cervical
HEK-293	Humana	Riñón de embrión
LNCaP	Humana	Tumor de próstata
MCF7	Humana	Tumor de mama
Sf21	Lepidóptero	Ovario
Hi-5	Lepidóptero	Ovario
S2	<i>Drosophila melanogaster</i>	Embriones

Frascos y placas de cultivo

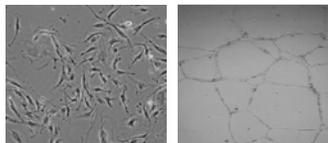
Plásticos tratados



Los recipientes plásticos suelen tener una carga neta negativa, aunque se consiguen con carga neta positiva (facilitan la selección de ciertos tipos celulares).

Coatings

Aún cuando las células suelen secretar sus propias matrices para adherirse al sustrato, se pueden colocar *coatings* proteicos de diversa índole (colágeno, fibronectina, laminina, etc). Suelen utilizarse porque proveen un entorno 3D.



HUVEC

HUVEC con matrigel

Medios de cultivos

Componentes básicos:

1) Aminoácidos esenciales, 2) vitaminas, 3) glucosa, 4) sales minerales, y 5) suero (factores de crecimiento y adhesión, minerales, lípidos y hormonas).

Aditivos:

Antibióticos y antifúngicos: Gentamicina (50 µg/ml), penicilina (100 µg/ml), anfotericina (2,5 µg/ml), etc.

Tampón pH: HEPES para pH en el rango 7,2 a 7,8 y Tricina en el rango 7,4 a 8,0.

Indicador pH: rojo fenol.

Principales medios empleados

Medio Basal de Eagle (BME): medio elemental (aminoácidos esenciales). Se necesita siempre suplementarlo con suero bovino fetal al 10 %.

Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM): contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME. Requiere la adición de suero (10%).

Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM): contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el BME.

Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM): es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, selenito, etc.

RPMI 1640: medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión.

Medio L-15 de Leibovitz: utilizado para el cultivo de virus.

Medio F-10 de Ham: para el crecimiento de líneas celulares humanas, debe ser suplementado con proteínas y hormonas. Contiene metales como Fe, Cu, Zn.

Condiciones físicas de cultivo

Temperatura: células de mamífero: 36-37°C, células de vertebrados de sangre fría: 18-25°C.

Fase gaseosa: pO₂, y pCO₂ 5% (suele depender de qué tipo de *buffer* lleve el medio de cultivo: HEPES o bicarbonato).

Humedad: es importante que el medio de cultivo no se evapore (para no alterar la osmolaridad del medio). Se mantiene la atmósfera húmeda con una solución 1X de CuSO₄.

Viscosidad: está determinada fundamentalmente por el contenido en suero. Tiene poca influencia sobre el crecimiento, sí es importante para evitar el daño celular en la agitación del cultivo (menor daño a más viscosidad) y en la tripsinización.

En resumen:

✓A partir de tejidos es posible obtener células libres que pueden ser cultivadas en condiciones de laboratorio (**cultivo primario**).

✓Estas células, a las que debe suministrársele medios complejos con aminoácidos, antibióticos, vitaminas, fuentes de carbono, sales y factores de crecimiento, entre otros componentes, pueden ser sostenidas (repiques o pasajes) entre 50 y 100 generaciones (**líneas celulares finitas**).

✓Algunos cultivos de células logran immortalizarse debido a cambios genéticos (**líneas celulares establecidas o continuas**).

✓Las células derivadas de tumores, llamadas “transformadas”, suelen constituir líneas inmortales.

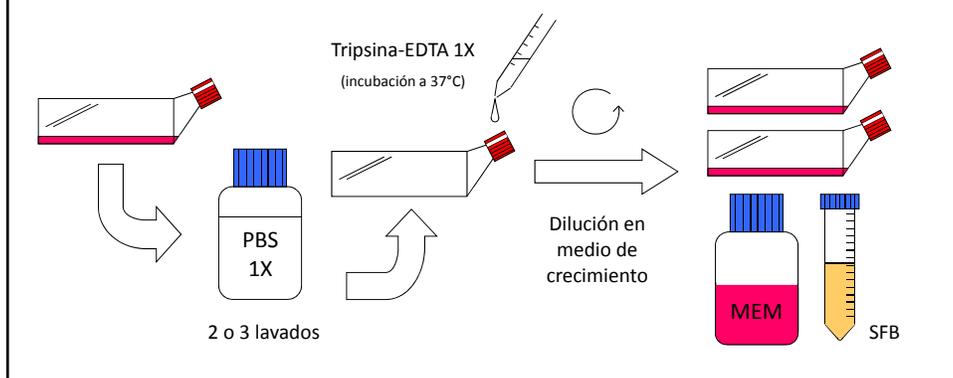
Técnicas básicas de cultivo celular

- Repique o pasaje
- Recuento
- Congelación
- Descongelación

Técnicas básicas de cultivo celular

- Repique o pasaje
- Recuento
- Congelación
- Descongelación

- Cuando un cultivo llega a su confluencia máxima (que puede o no coincidir con la capacidad máxima del recipiente), se lo repica: las células son desprendidas del sustrato, diluidas y trasvasadas (o no) a un nuevo recipiente.
- Para las células que crecen en suspensión, el repique se basa en la dilución.



Técnicas básicas de cultivo celular

- Repique o pasaje
- Recuento
- Congelación
- Descongelación

Recuento

Azul Tripán: es un colorante vital. Las células vivas lo bombean al exterior, viéndose blancas y refringentes. Las células muertas lucen azules y opacas.

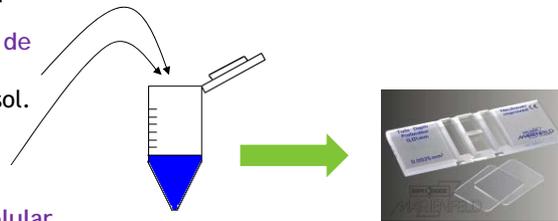
Solución A: solución salina (proporciona un medio osmóticamente favorable).

Solución B: azul tripán.

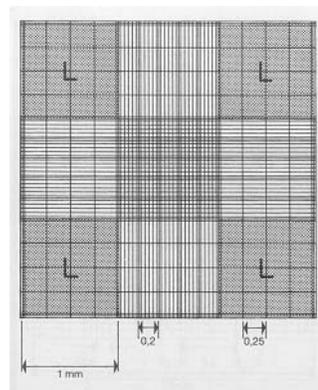
¿Cómo se usa el azul tripán?

1 parte de solución de azul tripán (1 parte sol. A + 4 partes de sol. B)

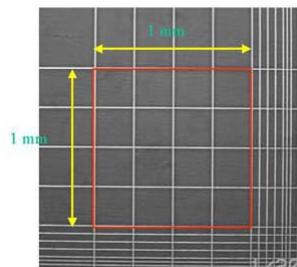
1 parte de suspensión celular

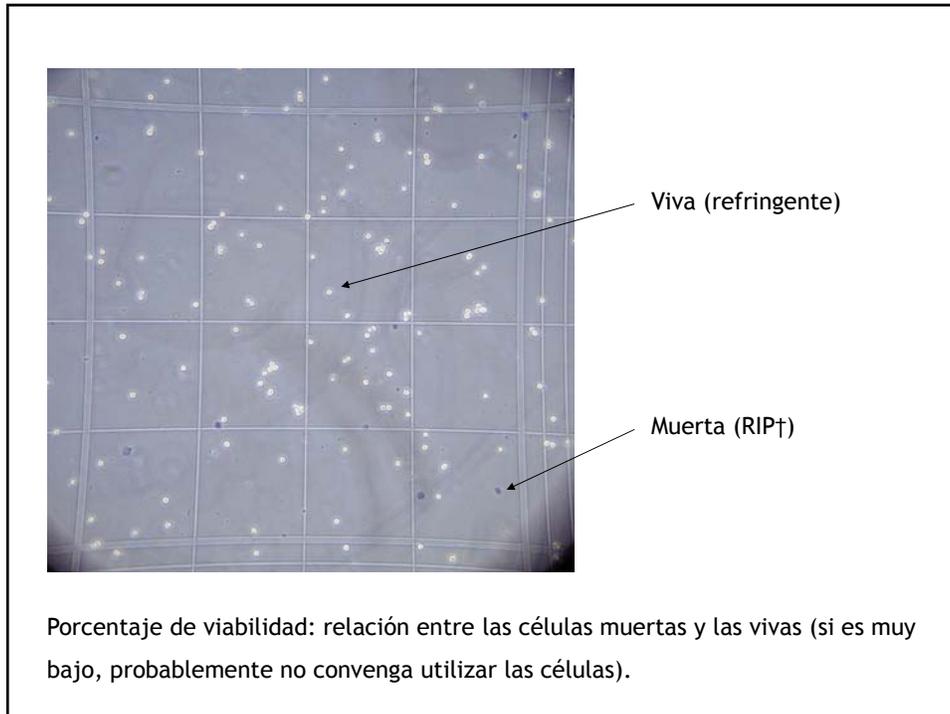


Cámara de Neubauer o hemocitómetro



4 cuadrículas con 16 cuadrados





Para obtener el número de células en mi suspensión:

1. Obtener un promedio de los 4 cuadrantes

$$\left(\text{Nro. células cuadrante 1} + \text{Nro. células cuadrante 2} + \text{Nro. células cuadrante 3} + \text{Nro. células cuadrante 4} \right) / 4$$

2. Multiplicar por el factor de dilución al agregar el azul tripán

$$\text{Promedio} \times 2$$

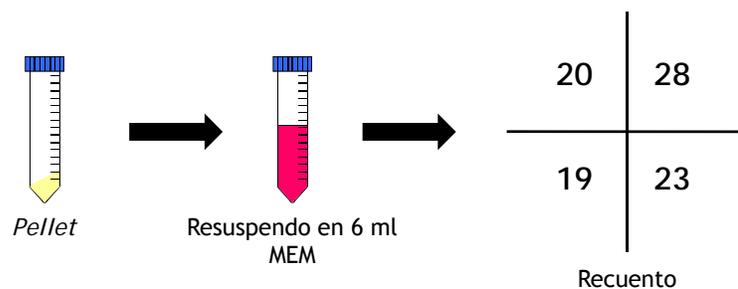
3. Multiplicar por el factor de corrección de volumen

$$(\text{Promedio} \times 2) \cdot 1 \times 10^4 \longrightarrow \text{Esto da el número de células por mililitro}$$

4. Multiplicar por la cantidad de mililitros totales de la solución (Q)

$$[(\text{Promedio} \times 2) \times 1 \times 10^4] \times Q \longrightarrow \text{Esto da el número de células totales}$$

Recuento:



¿Cuántas células hay en mi suspensión?

Técnicas básicas de cultivo celular

- Repique o pasaje
- Recuento
- Congelación**
- Descongelación

¿Por qué sirve congelar células?

- Para mantener los cultivos cuando uno no los necesita.
- Para asegurarse de tener un *stock* de una línea (frente a un evento de contaminación, pérdida, etc).
- Para mantener la línea lo más joven posible.
- Para ahorrar plata!! (es más barato mantener células congeladas que invertir reactivos y tiempo en mantenerlas en cultivo).

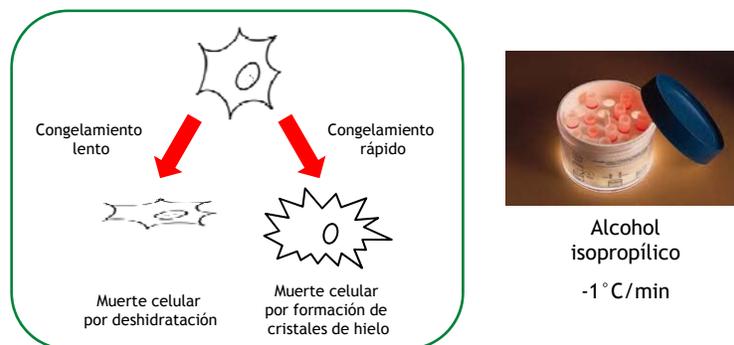
¿Cómo congelar células?

✓Medio de congelación: dependiendo de la disponibilidad de suero, las células se pueden congelar en los siguientes medios: DMEM completo, DMEM con 20% suero, o en 100% suero; en cualquier caso suplementados con un agente crioprotector.

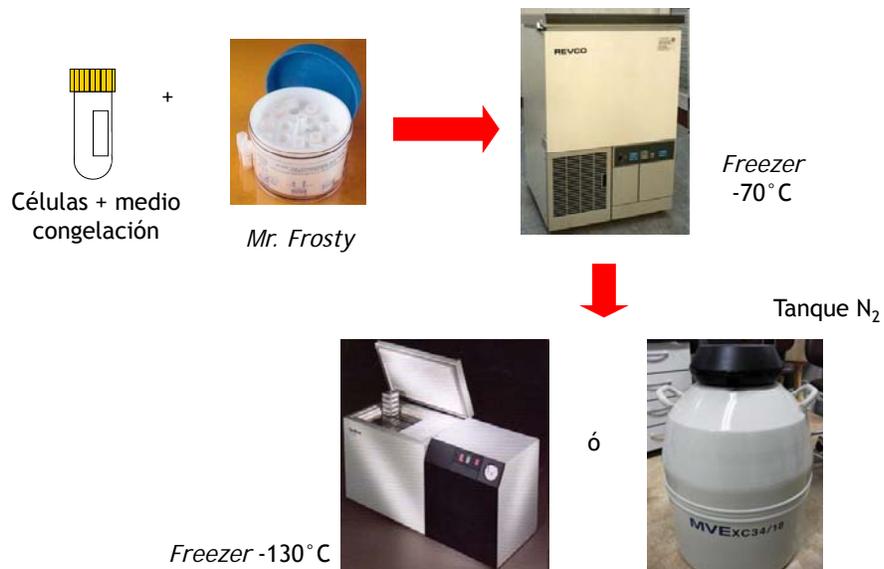


¿Cómo congelar células?

✓Gradiente de temperatura: para congelación y descongelación



Resumiendo:

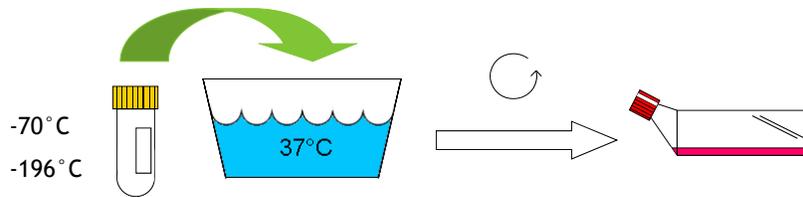


Técnicas básicas de cultivo celular

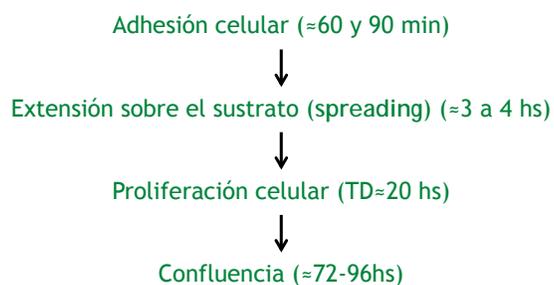
- Repique o pasaje
- Recuento
- Congelación
- Descongelación

¿Cómo descongelar células?

- Debe ser RÁPIDA. De esta manera se evita que los cristales del medio se derritan antes que los cristales intracelulares (desequilibrio osmótico y explosión de la célula).
- Se realiza colocando un vial congelado (-70°C o -196°C) en un baño a 37°C . CUIDADO! Los viales pueden explotar y el N_2 líquido QUEMA.
- Dependiendo de la línea celular, luego de la descongelación las células pueden ser centrifugadas para eliminar el criopreservante o no. Como máximo, a las 24 hs hay que hacer un cambio de medio.



Cinética del cultivo celular



Parámetros útiles:

- **Porcentaje de adhesión:** es el porcentaje de células que efectivamente se adherirán al sustrato (es una característica de cada línea).
- **Viabilidad:** es la cantidad de células vivas que poseo en un cultivo (lo obtengo durante el recuento).
- **Tiempo de duplicación:** tiempo que tarda EN PROMEDIO una población celular en duplicarse (es una característica de cada línea).
- **Densidad de saturación:** es la cantidad máxima de células que “entran” en una determinada superficie. Suele expresarse en células/cm² (es una característica de cada línea).

$$N_o = N_f / 2^{ND}$$

o su contraparte despejada

$$ND = \log_{10} (N_f / N_o) \times 3,333$$

Donde

N_o es el número inicial de células

N_f es el número final de células

ND es el número de duplicaciones que sufre la línea en un determinado tiempo

Donde

$$ND = t / td$$

ND es el número de duplicaciones que sufre la línea en un determinado tiempo

t es el tiempo en el que transcurre el ensayo (o en el que deseo obtener una monocapa confluyente, etc.).

td es el tiempo que le toma a la línea duplicarse