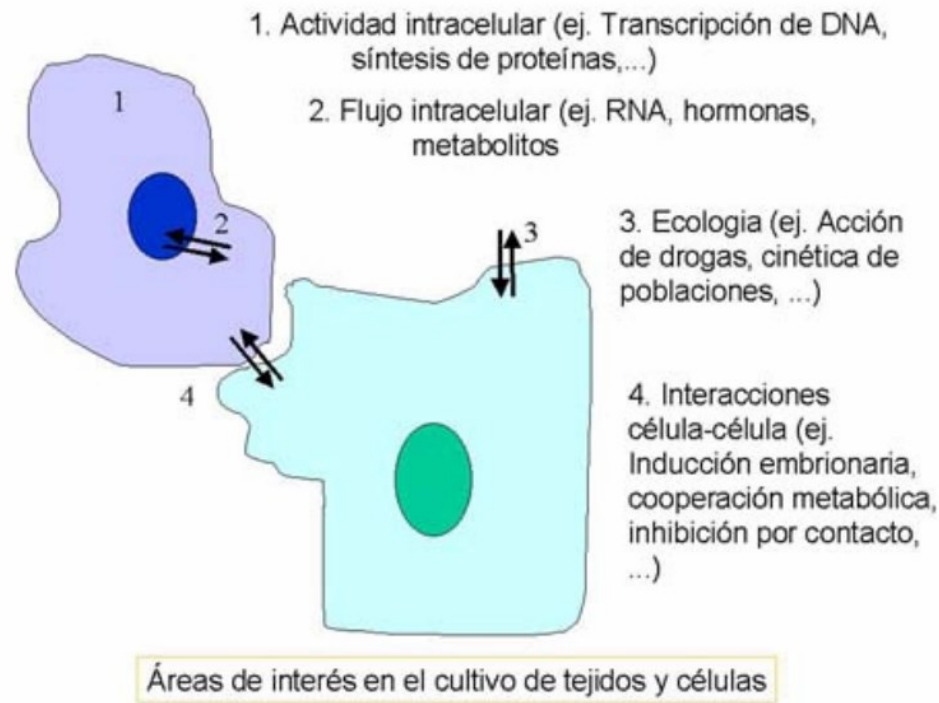


CULTIVOS CELULARES

RECOPIADO POR:
LOIS PÉREZ DIÉGUEZ
JORGE RODRÍGUEZ CASTRO
JUAN CARLOS CODESIDO
1-XULLO-2016



Imaxe tomada de CULTEC

•O **cultivo celular** é a técnica consistente na proliferación controlada dun tipo celular a partir dunhas poucas células, en condicións controladas (temperatura, nutrientes, pH, humidade e presión de CO₂ e O₂).

•Usualmente para realizar nas células **experimentos controlados** que permitan coñecer de maneira específica a **resposta dun tipo celular** homoxéneo ante **estímulos controlados e definidos**.

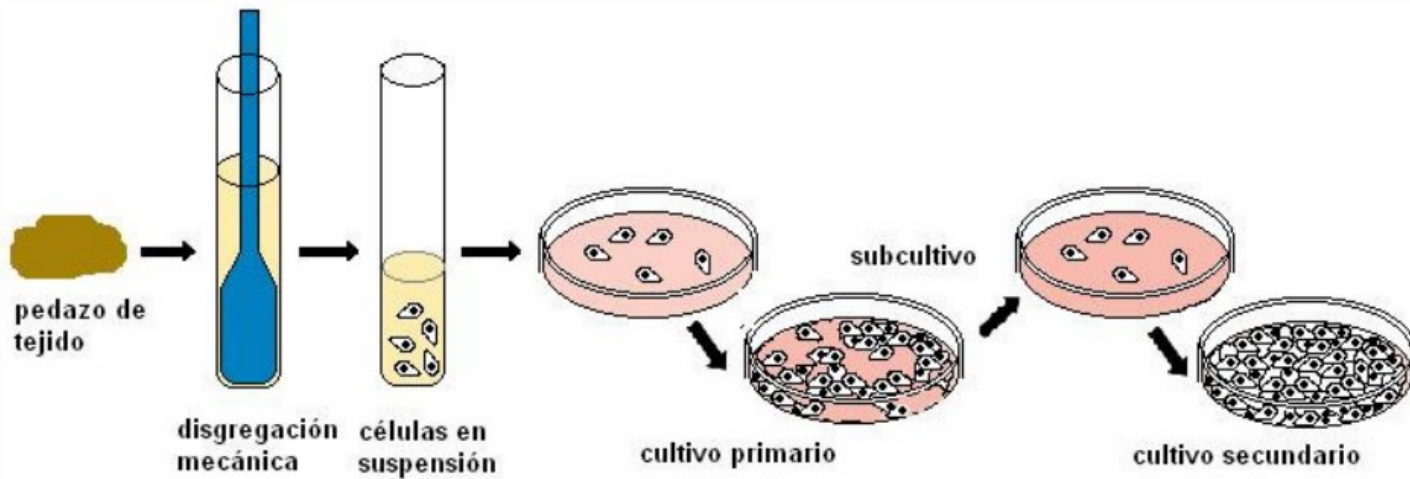


Figura 1. Esquema cultivo celular: cultivo primario y cultivo secundario. *Tomado de [2].*

Imaxe tomada de Lía Pietrasanta y Catalina von Bilderling

[2] *Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales)*. Lic. María Eugenia Segretín.

- **Cultivos primarios:** cultivos preparados directamente a partir dun tecido ou órgano. Poden iniciarse con ou sin separación previa dos distintos tipos celulares. As células conservan as súas características orixinais e a súa proliferación é limitada.

- **Cultivos secundarios:** subcultivos preparado a partir dun primario, no que os tipos de células máis prominentes se multiplican ata formar unha monocapa. O obxectivo é obter unha liña celular estable.

• **Liña celular:** é un cultivo celular homoxéneo que pode seguirse cultivando indefinidamente.

Normalmente son células tumorales (espontáneas ou inducidas).

| LÍNEA CELULAR | TIPO Y ORIGEN |
|----------------------|----------------------------------------------|
| 3T3 | Fibroblastos (ratón) |
| BHK21 | Fibroblastos (Syrian hamster) |
| MDCK | Célula epitelial (perro) |
| HeLa | Célula epitelial (humano) |
| PtK1 | Célula epitelial (rata canguro) |
| L6 | Mioblasto (rata) |
| PC12 | Célula cromafin (rata) |
| SP2 | Célula plasmática (ratón) |
| COS | Hígado (mono) |
| 293 | Hígado (humano) transformado con adenovirus |
| CHO | Ovario (Chinese hamster) |
| R1 | Embryonic stem cells (ratón) |
| E14,1 | Embryonic stem cells (ratón) |
| H1, H9 | Embryonic stem cells (humano) |
| S2 | Macrophage-like cells (Drosophila) |
| BY2 | Undifferentiated meristematic cells (tabaco) |

Tabla 1. Líneas celulares: tipo y origen.

*Muchas de estas líneas celulares son derivadas de tumores. Todas son capaces de replicarse indefinidamente en cultivo, y expresar algunas de las características especiales de sus células de origen. Las líneas BHK21, HeLa y SP2 son capaces de crecer eficientemente en suspensión. La mayoría de las otras líneas celulares necesitan de un sustrato sólido para multiplicarse. *Tomado de [1].*

Imaxe tomada de Lía Pietrasanta y Catalina von Bilderling

[1] Molecular Biology of The Cell. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Publisher: Garland Publishing Inc

LIÑA CELULAR HELA

Esta liña celular deriva dunha mostra de cáncer cérvico-uterino obtida o 8 de febrero de 1951 de Henrietta Lacks.

En 1952, Grey, Coffman e Kubicek obteñen con esta mostra a primeira liña celular continua.



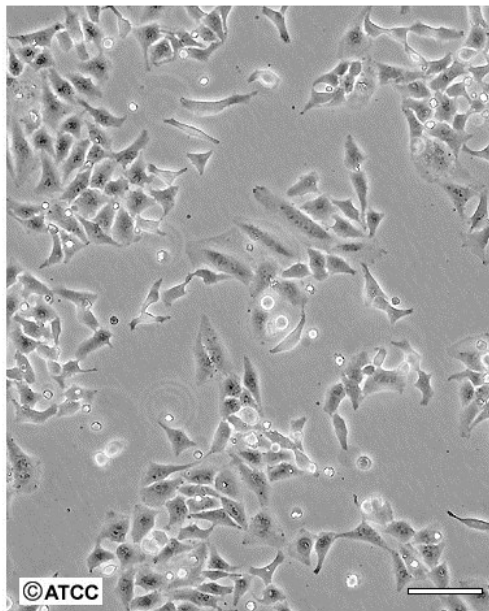
Empregaron un medio extremadamente complexo e pouco definido: plasma de polo, extracto de embrión bovino e soro de cordón umbilical humano. Inicialmente se empregou para o estudo do virus da poliometitis.

Medio de cultivo recomendado: Medio Basal de Eagle (BME). Medio elemental, só contén os aminoácidos esenciais. Precisa sempre a suplementación con soro bovino fetal ó 10 %.

Pola súa adaptabilidade ó crecemento en cultivo, as células HeLa son difíciles de “controlar”. Son unha “mala herba” persistente que contamina outros cultivos celulares realizados nos mesmo laboratorios.

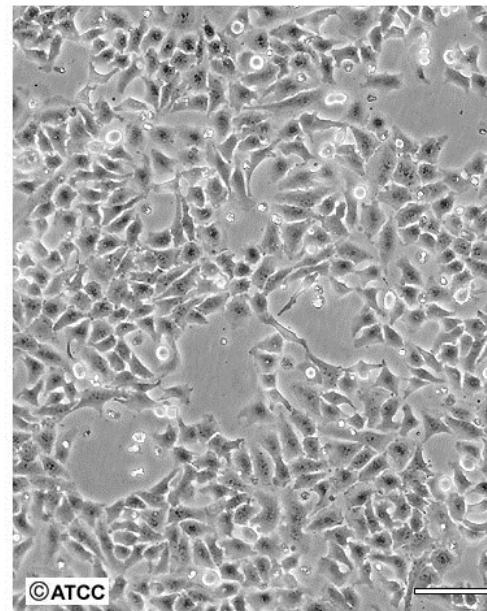
ATCC Number: CCL-2
Designation: HeLa

LIÑA CELULAR HELA



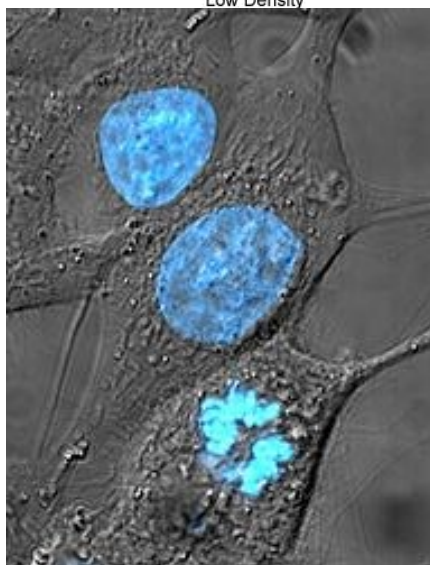
Low Density

Scale Bar = 100µm

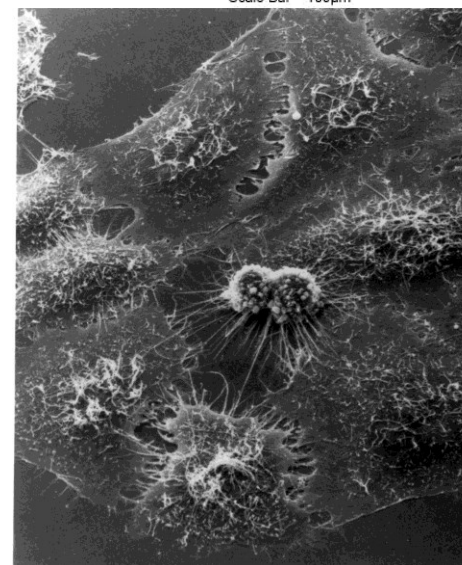


High Density

Scale Bar = 100µm



Células HeLa tinguidas con Hoechst 33258



Células HeLa en mitosis nun microscopio electrónico

LIÑA CELULAR LLC-PK1

IN VITRO
Volume 12, No. 16, 1976

THE ORIGIN AND CHARACTERISTICS OF A PIG KIDNEY CELL STRAIN, LLC-PK₁

R. N. HULL¹, W. R. CHERRY, AND G. W. WEAVER

Lilly Research Laboratories, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana 46206

SUMMARY

A stable epithelial-like pig kidney cell strain has been established. This strain has been carried through more than 300 serial passages, has remained free of microbial and viral contaminants, and has retained a near diploid number of chromosomes. Attempts to produce tumors with these cells in immunosuppressed laboratory animals have been uniformly negative. The cells have grown rapidly in monolayer cultures with a split ratio of 1 to 15 at weekly intervals, but have failed to proliferate in suspension cultures. A subline adapted to growth on serum-free medium 199 has been carried through 145 passages on this medium. Several unusual morphologic features have been observed in these cultures including three-dimensional "dome-like" structures. These cells have been found susceptible to some viruses and have been especially useful for viruses of domestic animals. LLC-PK₁ cells have produced significant levels of plasminogen activator.

Key words: pig kidney cells; dome-like structures; chemically defined media; plasminogen activator; virus susceptibility.

INTRODUCTION

Trypsin-dispersed cells prepared from the kidneys of domestic pigs grow well in tissue culture and can readily be established as permanent cell strains. At least six such strains have been described, or mentioned, in the literature (1-6). Most of these reports deal with virus susceptibility. Several pig kidney strains have been developed in our laboratory, and one of these, LLC-PK₁, is described in detail in this report. This strain has some unique characteristics which may be of interest to investigators in several areas of research.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture preparation and origin of LLC-PK₁. The kidneys from a 17-lb juvenile male Hampshire pig were aseptically removed after exsanguination of the donor animal. Both kidneys were minced, pooled together, and trypsinized by the procedure described by Younger (7). A 1-to-400 suspension was made of the final cell pack in medium 199 containing 10% horse serum (HS) and 100 units penicillin and 100 µg streptomycin per ml. This was used as the inoculum for 16-oz bottle cultures. By 4 days of incubation at 37°C,

the cultures were essentially confluent, and were refed with medium 199 containing 5% HS and antibiotics. The first subculture was made on the 6th day by stripping the cells from the glass with 0.1% Armour's crystalline trypsin prepared in Earle's balanced salt solution. Antibiotics were discontinued at this time. Passages were made at approximately weekly intervals, and the split ratio was gradually increased until it became routine at 1 to 15. A total of 88 consecutive passages were made before the cell strain was frozen and stored in liquid nitrogen. It has been in and out of our frozen cell bank on numerous occasions over the 17 years since its origin in 1958. The highest passage to which these cells have been advanced is 318.

Media, sera and cell strains. Medium 199 (M199) was prepared in our laboratories, essentially according to the formula given by Murton in her review article (8). Hanks' balanced salt solution was used, and the following slight modifications were made: Niacin 0/0.75, inositol 0.05/0.50, Tween 80, 50/20.0 and ATP 2.0/10.0 (Lilly/Morton, mg/l). Other media were purchased from commercial sources. HS was obtained from our own horses; fetal bovine serum (FBS) was purchased. The Y-15 cells were obtained from Dr. Benjamin Sweet, and PK₁₅ was

¹To whom requests for reprints should be sent.

Designation: LLC-PK1

Origin and General Characteristics

Depositor: CLS

Organism: *Sus scrofa* (pig)

Synonym(s): Swine

Age/Stage: 3 to 4 weeks

Strain: Hampshire

Gender: Male

Tissue: Kidney

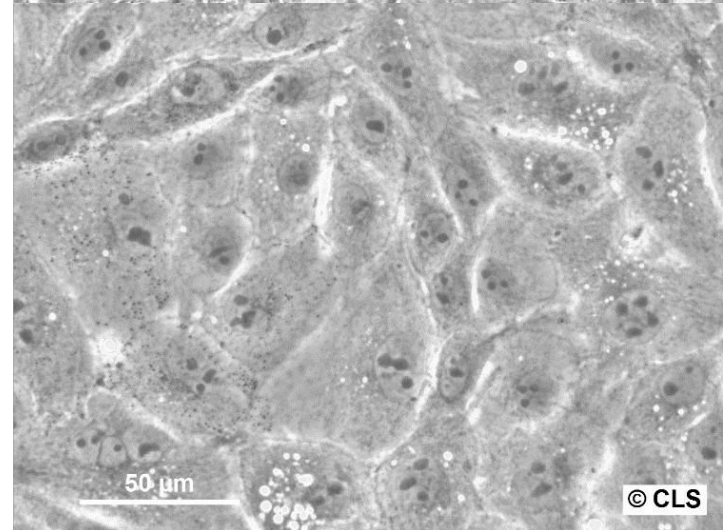
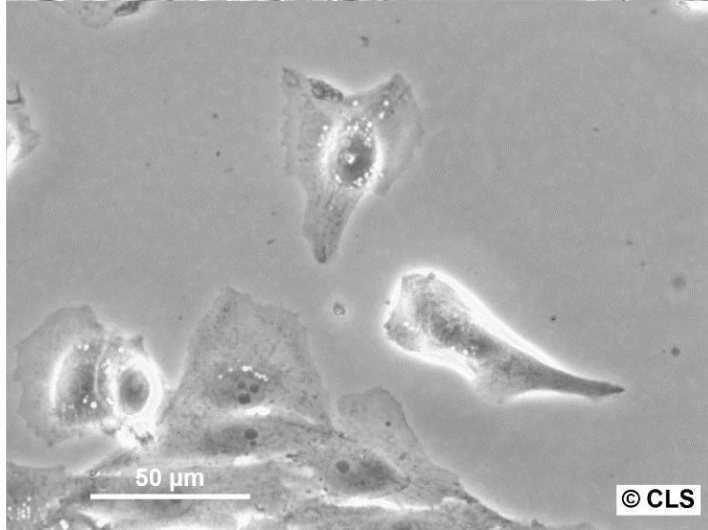
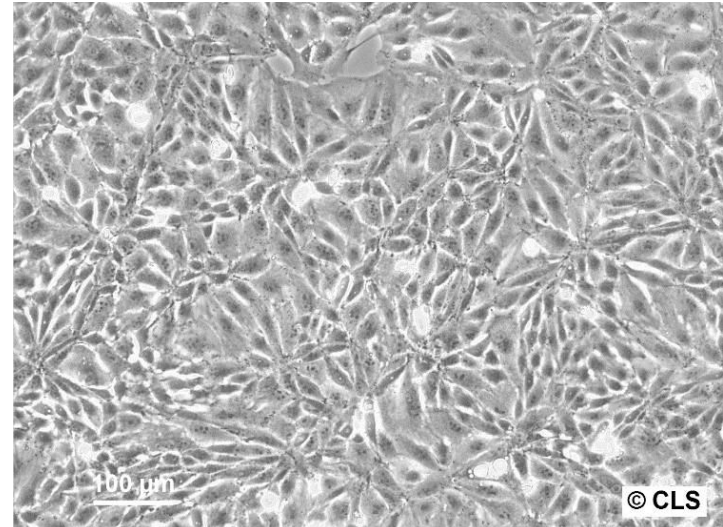
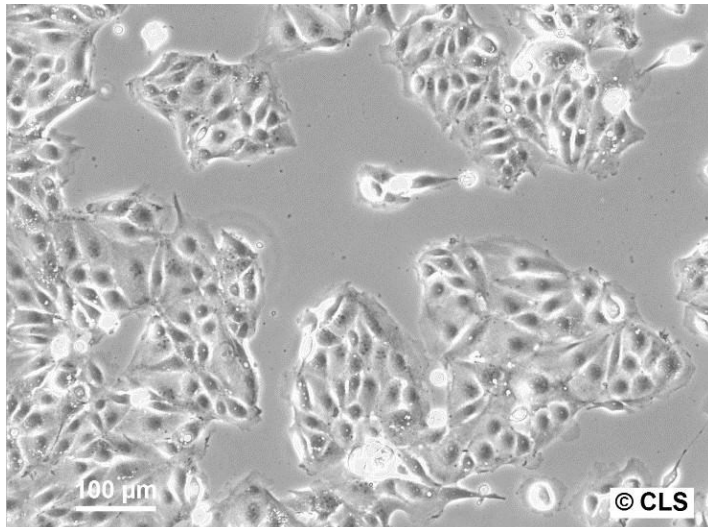
Morphology: Epithelial

Cell type: Normal

Growth Properties: Adherent

References: Hull RN et al. *The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK*. In Vitro 12: 670-7, 1976

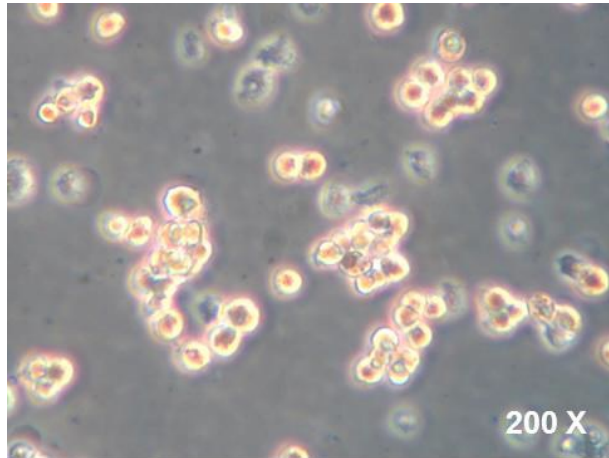
LIÑA CELULAR LLC-PK1



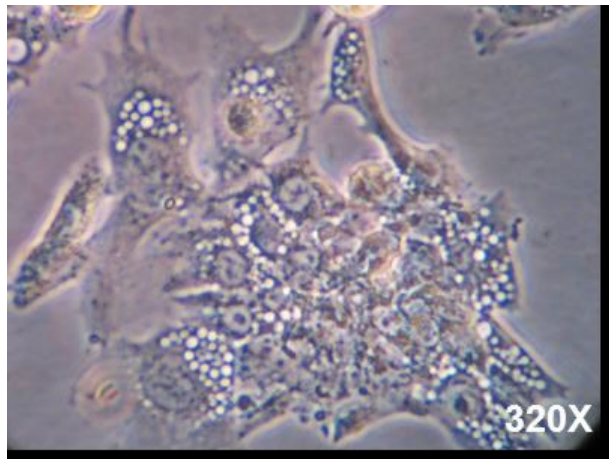
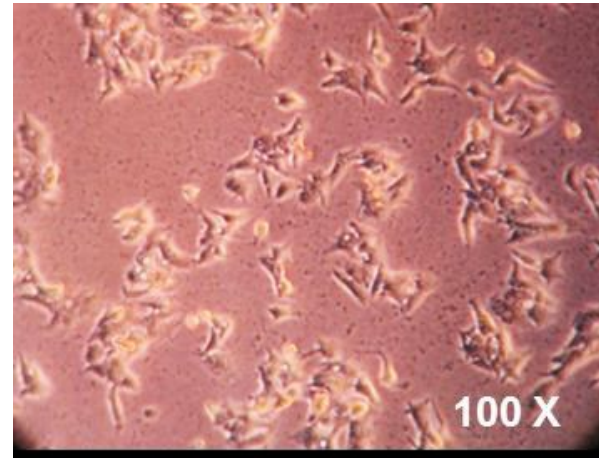
Imaxe tomada de CLS Cell Lines Service GmbH www.clsmbh.de

CRECEMENTO

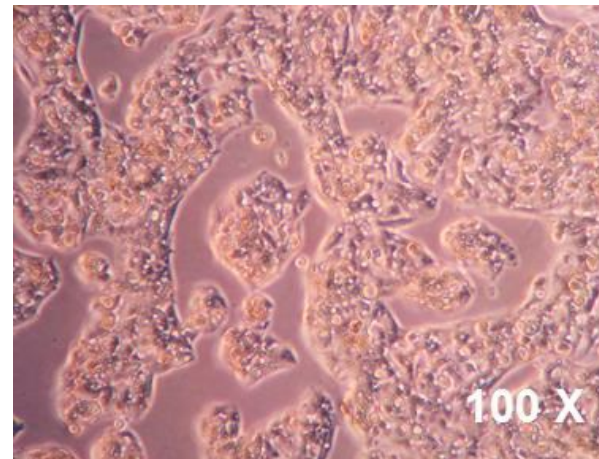
DÍA 0



DÍA 3



DÍA 5



DÍA 8

Imaxe tomada do Manual de Prácticas de cultivo de células animales, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Plantel Iztapalapa. Mexico

- **Liña celular:**

- Ventaxas: ambiente controlado, homoxenidade da mostra, aforro económico, cuestións éticas.
- Desventaxas: técnica moi sensible, inestabilidade cromosómica, indiferenciación, alto coste para grandes cantidades, validez dos modelos “in vitro”.

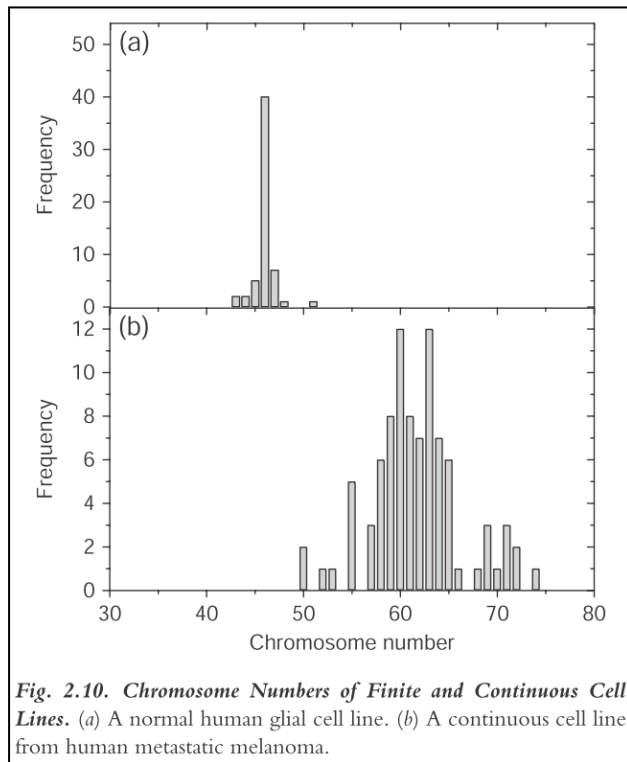
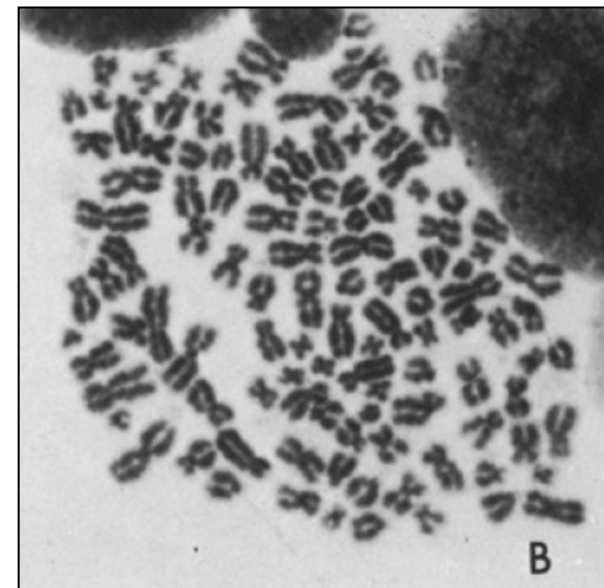
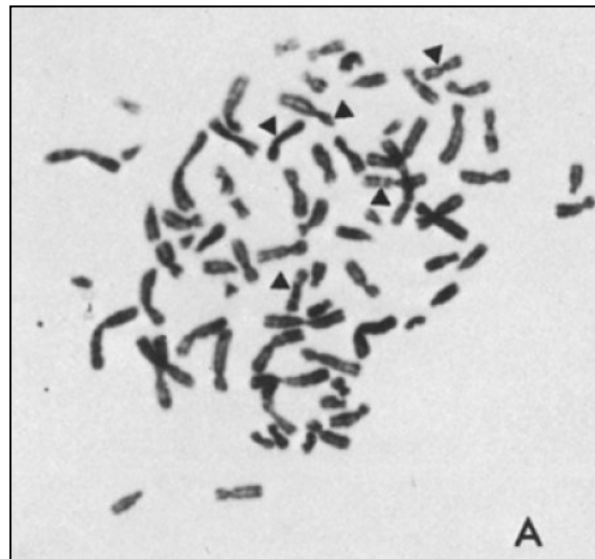
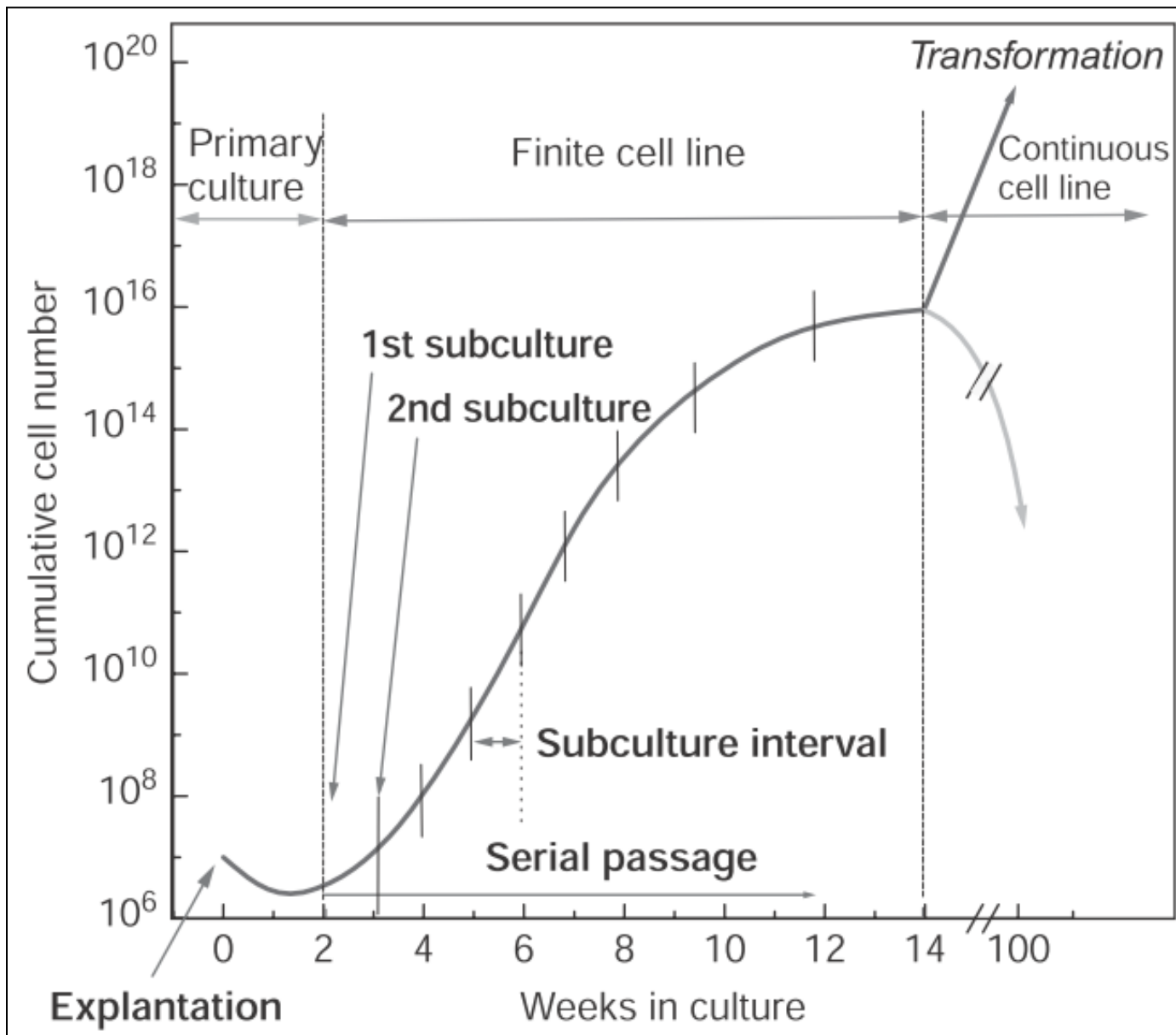


Fig. 2.10. Chromosome Numbers of Finite and Continuous Cell Lines. (a) A normal human glial cell line. (b) A continuous cell line from human metastatic melanoma.





Imaxe tomada de Juan Manuel González Mañas (UPV)

MEDIOS DE CULTIVO

O cultivo celular realízase en **medios** artificiais preparados mezclando compoñentes purificados ou solucións orgánicas complexas, no interior de **instrumentos** que manteñen as **condicións físico-químicas** adecuadas e sobre soportes ou **recipientes** que os conteñen e aíllan do medio exterior.

Propiedades do medio

- pH: arredor de 7,4. Para medilo engádeselle roxo fenol ó medio.
- Osmolaridade: nun rango óptimo de 260/330 mOsm/kg (lixeramente hipotónico)
- Solución salina equilibrada (BSS): sales inorgánicas que manteñen o medio isotónico.
- Glucosa: fonte de enerxía.
- Aminoácidos: para a síntese de proteínas.
- Vitaminas: como cofactores. Segundo o medio e as necesidades das células cultivadas poden incluírse só as do tipo B ou todas.
- Soro fetal (bovino, equino...): contén factores de crecemento, estimula a síntese de ADN, ARN e proteínas e facilita a adhesión ó sustrato por medio das globulinas.
- Antibióticos e antimicóticos: evitan o crecemento de bacterias e fungos.
- Auga: desionizada, destilada, estéril.
- Temperatura: 37°C

MEDIOS DE CULTIVO

Control dos medios

-Medindo **pH e osmolaridade**

-Control de **esterilidade**: mostra dos reactivos en caldo nutritivo

-Control de **crecemento e citotoxicidade**: avaliación dos reactivos con células.

-**Conservación** dos medios: neveira, escuridade e estériles se é posible.

MEDIO DE CULTIVO
(Roxo de fenol)



Yellow



Red

MEDIOS DE CULTIVO

| 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 | Estreptomicina | 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 estreptomicina 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].*

MEDIOS DE CULTIVO

Los principales medios empleados y sus aplicaciones son:

- × Medio Basal de Eagle (BME). Medio elemental con sólo los aminoácidos esenciales. Se necesita siempre la suplementación con suero bovino fetal al 10 %. Crecimiento de fibroblastos de ratón y células HeLa.
- × Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM). Es el medio de uso más corriente, contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME. Se usa para cada casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero (10%).
- × RPMI 1640. Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión. Tiene un amplio rango de aplicaciones con suplementos adecuados.
- × Medio MEM modificado por Dulbeco (DMEM). Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el BME. Se usa para la selección de hibridomas suplementado con HAT o HT.
- × Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM). Es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, selenito, et... Es muy útil para el cultivo de linfocitos en medio libre de suero. También sirve para otros tipos celulares, pero en ese caso requiere suero a bajas concentraciones.
- × McCoy 5A. Medio diseñado para el crecimiento de líneas celulares diploides tanto de rata como humanas.
- × 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. Es útil para el cultivo de células amnióticas.
- × Medio F-12 de Ham. Útil para el crecimiento de líneas celulares con suplementos proteínicos. Combinado con IMDM es un medio que se usa como libre de suero.
- × Medio 199. Muy usado para el cultivo de células no diferenciadas y estudio de cromosomatías.

Todo medio de cultivo está formado por los siguientes elementos:

- × Soluciones salinas equilibradas (BSS). Una solución salina equilibrada es una mezcla de sales inorgánicas, incluyendo usualmente bicarbonato sódico, y suplementada con glucosa. Se usan para diluir medios más completos, como medio de disección o lavado, o para incubaciones cortas que requieren un medio isotónico no completo nutricionalmente. Su elección dependerá de:
 - ✓ la tensión de CO₂. La concentración de bicarbonato deberá permitir el equilibrio a pH 7,54 a 36,5°C. Así BSS-Eagle es más usada para 5% CO₂ y BSS-Hank (HBSS) es usado a la tensión atmosférica normal.
 - ✓ su uso en la disgregación de tejidos o monocapas. En ese caso deberán carecer de Ca₂⁺ y Mg₂⁺. Son recomendables los medios de Moscona, CMF, o PBS de Dulbeco o Vogt (PBSA).
 - ✓ su uso para el cultivo en suspensión o de células en monocapa. Es recomendable el uso de MEM(S), variante de MEM sin Ca₂⁺ que reduce la agregación celular y la adherencia.

Debido a su escasa capacidad tamponadora se recomienda suplementarlo con HEPES para pH en el rango 7,2 a 7,8 y

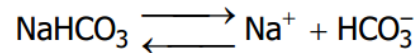
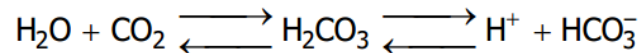
MEDIOS DE CULTIVO

Fase gaseosa

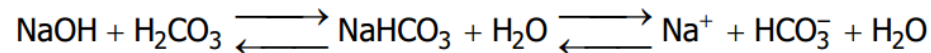
-Osíxeno: as necesidades de osíxeno para a maior parte de cultivos celulares está cuberta coa tensión atmosférica normal.

-Dióxido de carbono: Inflúe na cantidade de CO₂ disolto no medio, que mantén o pH e a cantidade de ións bicarbonato.

Cada medio ten unha concentración recomendada de bicarbonato y de tensión de CO₂ para acadar o pH correcto.



El incremento de la concentración de ión bicarbonato desplaza la ecuación [1] hacia la izquierda, de modo que el pH se establezca en 7,4. Se puede emplear asimismo otra base, por exemplo NaOH, siendo la ecuación:

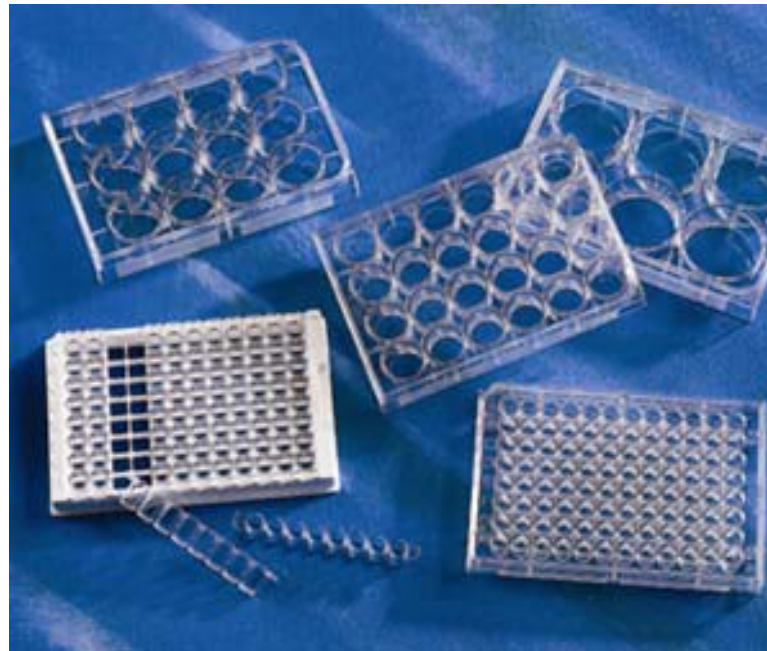


Os cultivos que medran a baixa densidade ou nun recipiente aberto precisan unha atmósfera de CO₂ (normalmente dun 5%), cuia concentración esté en equilibrio co bicarbonato sódico do medio pra manter o pH estable en 7,4.

Os cultivos de alta densidade cultivados nun recipiente pechado poden non precisar atmósfera de CO₂, pero quizáis sí ter un medio de cultivo con HEPES que regule a súa cantidade no medio.

EQUIPAMENTO

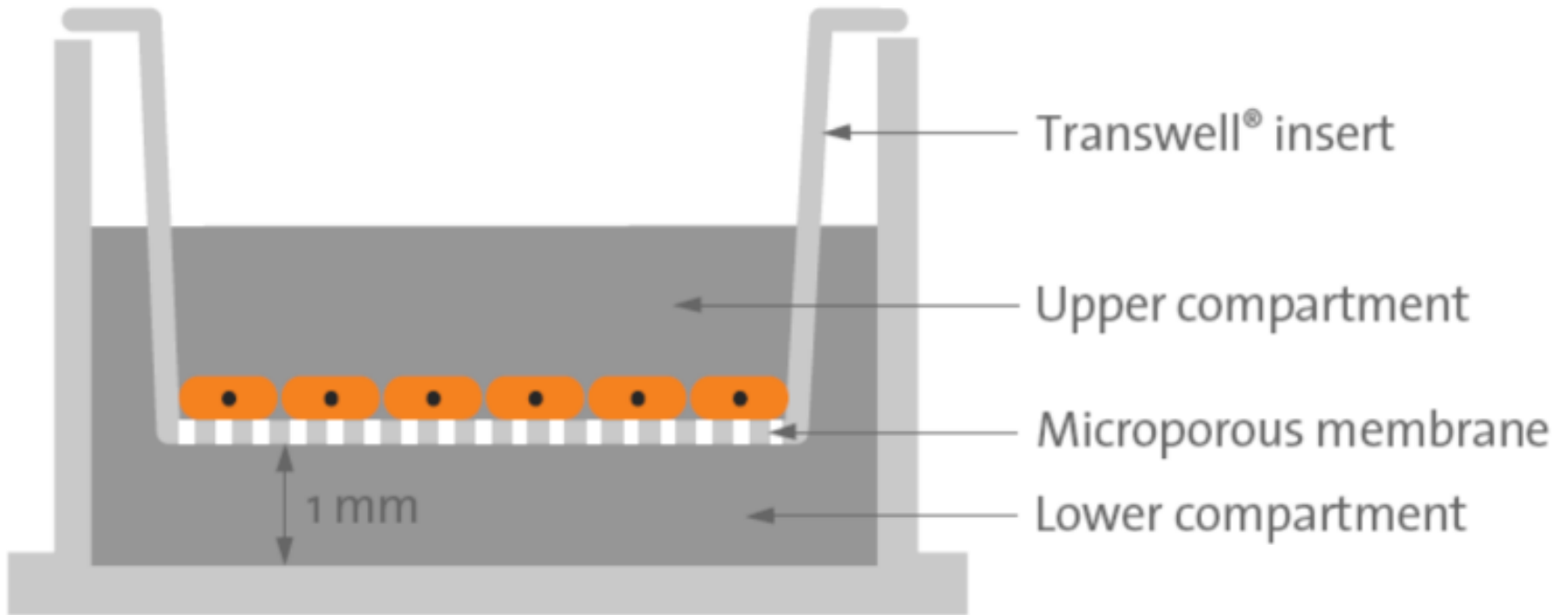
BOTES E PLACAS



FLASK: TAPÓN INTERCAMBIO DE GASES



MEMBRANAS PLÁSTICAS POROSAS



EQUIPAMENTO

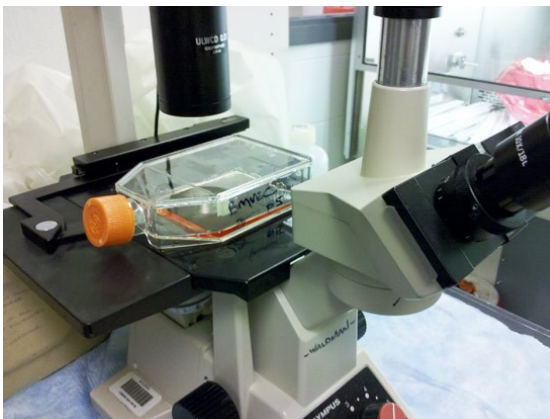
CAMPANA DE FLUXO LAMINAR



INCUBADORA DE CO2



MICROSCOPIO INVERTIDO



CENTRÍFUGA



EQUIPAMENTO

AUGA ULTRAPURA DESIONIZADA



BAÑO



ESTERILIZACIÓN: FILTRACIÓN



ESTERILIZACIÓN: AUTOCLAVE



EQUIPAMENTO

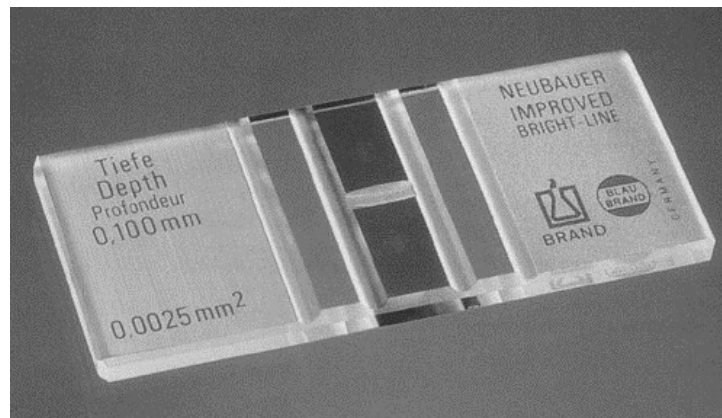
CONXELADOR -80 °C



TANQUE DE NITRÓXENO LÍQUIDO

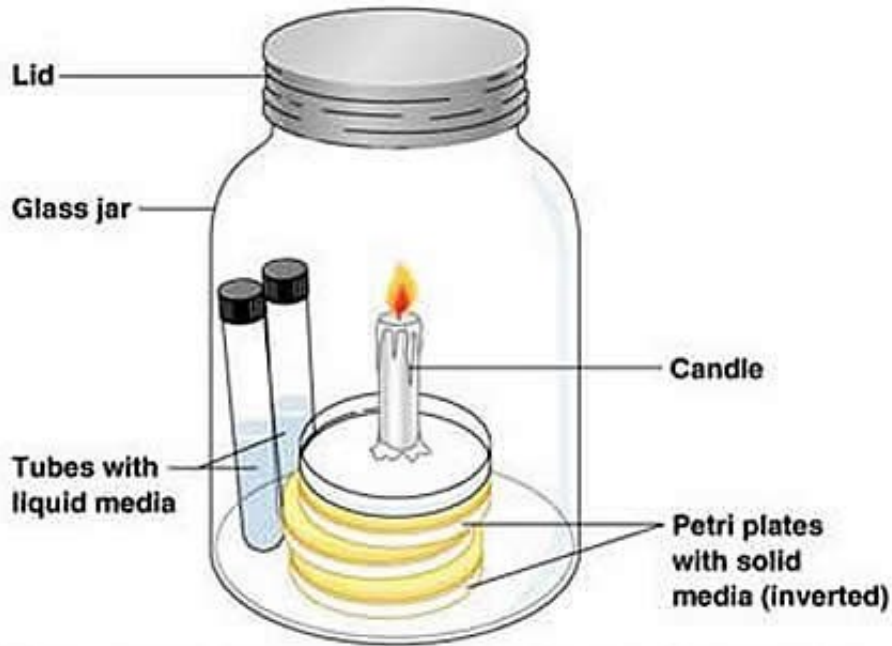


CÁMARA DE NEUBAUER

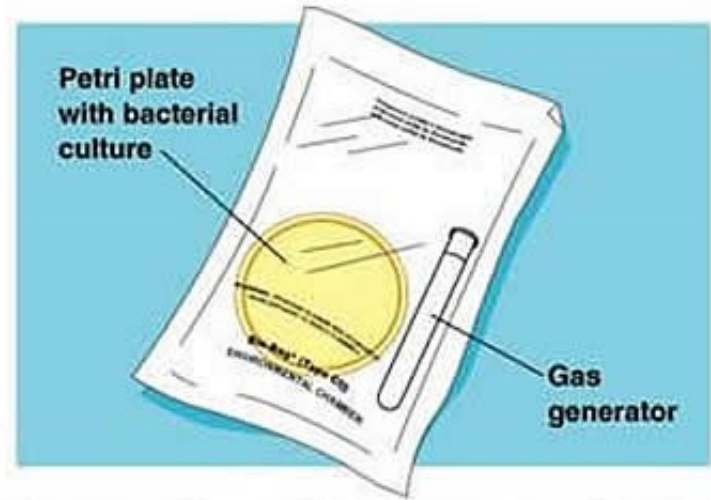


INCUBADORA

Sen CO₂



(a) Candle jar. Plates and tubes inoculated with, for example, *Neisseria meningitidis* are placed in a jar with a lighted candle, and the jar is sealed. The burning candle reduces the O₂ concentration to a point where the flame goes out. This will provide a CO₂ atmosphere of approximately 3%.



(b) CO₂-generating packet. The packet consists of a bag containing a Petri plate and a CO₂ gas generator. The gas generator is crushed to mix the chemicals it contains and start the reaction that produces CO₂. This gas reduces the O₂ concentration in the bag to about 5% and provides a CO₂ concentration of about 10%.

INCUBADORA

Sen CO2

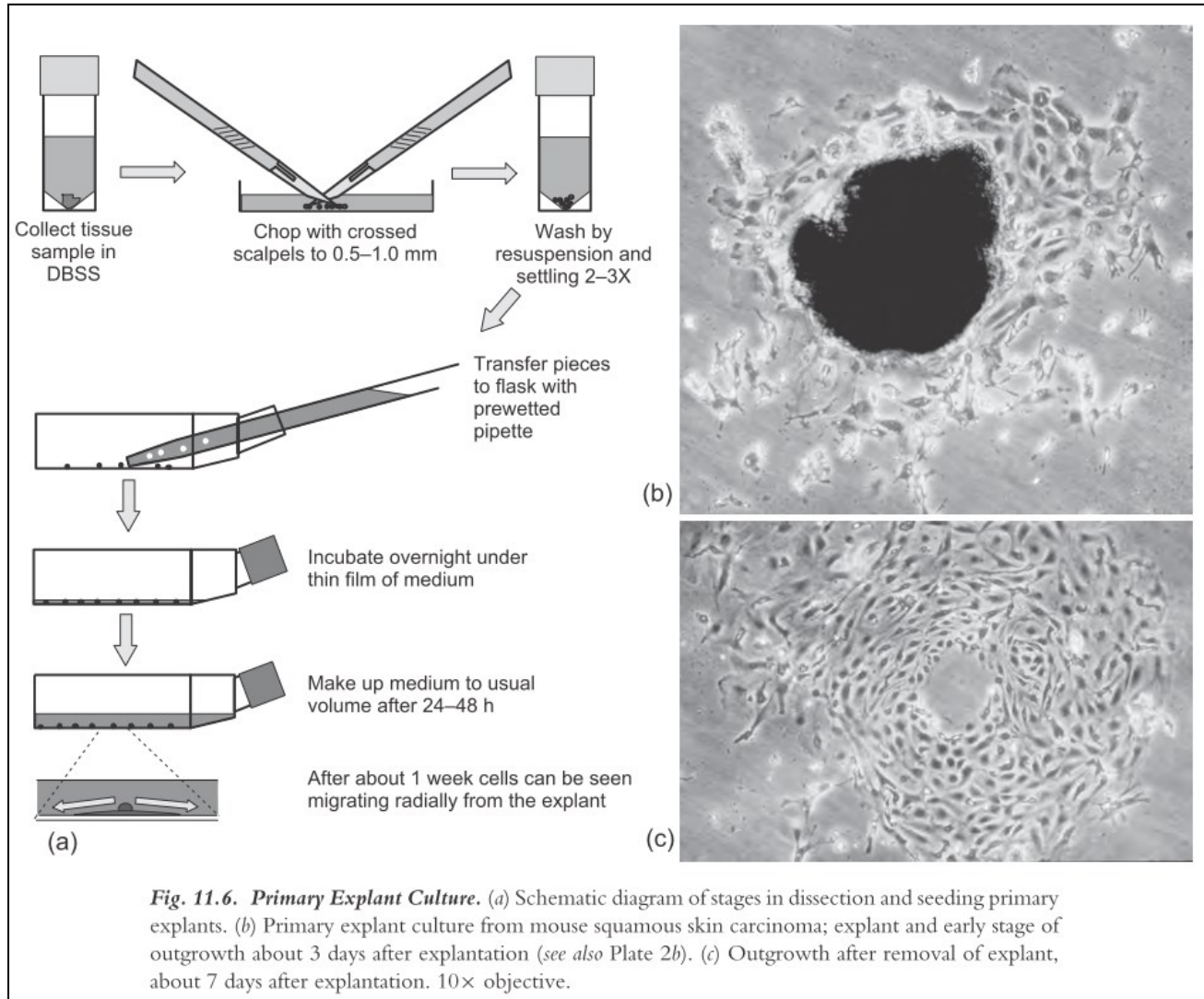


EQUIPAMENTO

ZONAS DO LABORATORIO:

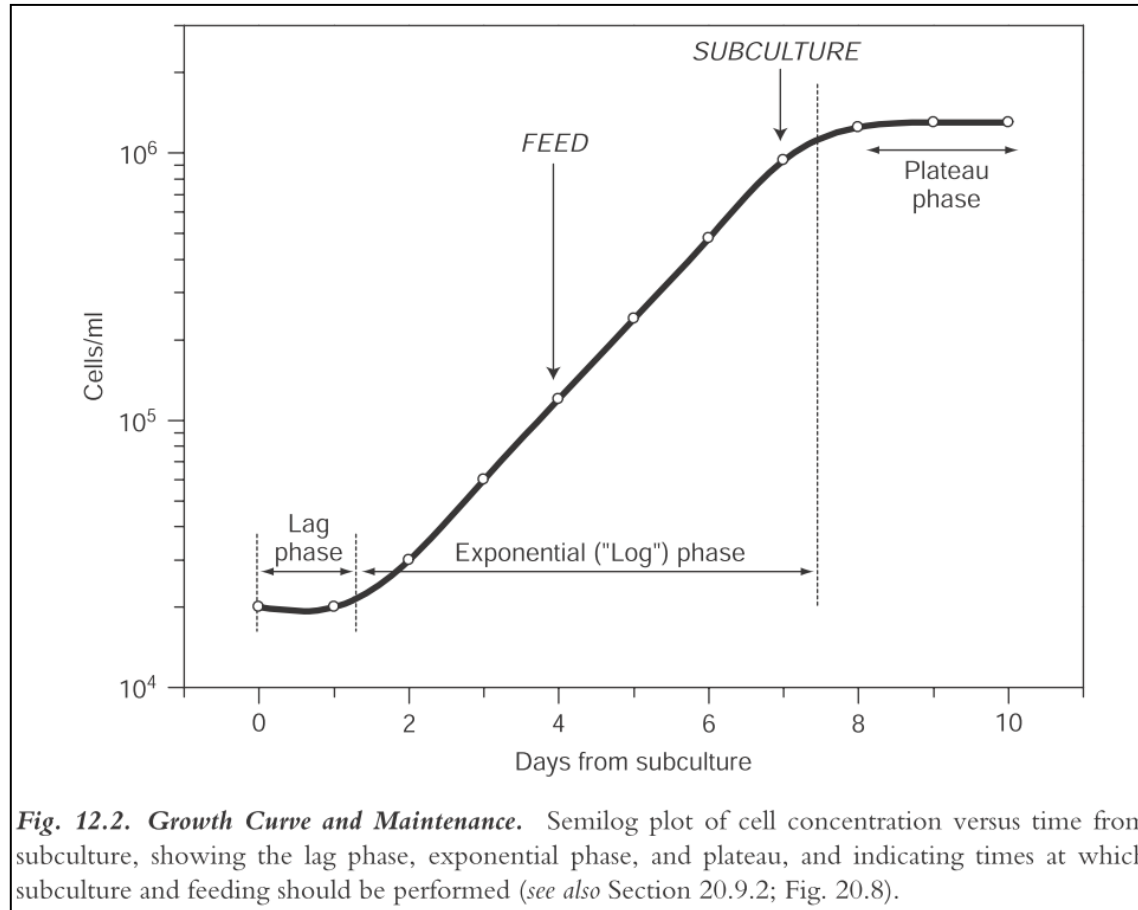
- **Sala de cultivo:** Sala “limpa”. Procedementos relacionados directamente co cultivo celular. Campanas de fluxo, incubadores e microcopio invertido. Preferentemente con filtrado do aire e presión positiva para evitar a entrada de contaminantes.
- **Sala de laboratorio:** Sala “sucia”. Resto dos equipamentos e procedementos (tincións, cariotipado, citoxenética, microscopio de fluorescencia).
- **Sala de frío:** Cos conxeladores e o equipo de crioxénia, Separada da de cultivo polas turbulencias que xeneran estes equipos.

CULTIVO DUN EXPLANTE PRIMARIO



CURVA DE CRECEMENTO DUN CULTIVO CELULAR

- Fase de latencia
- Fase de crecemento exponencial: Facer subcultivo ó final da mesma
- Fase estacionaria: Inhibición pos contacto (en suspensión é por densidade)



SUBCULTIVO DUNHA MONOCAPA

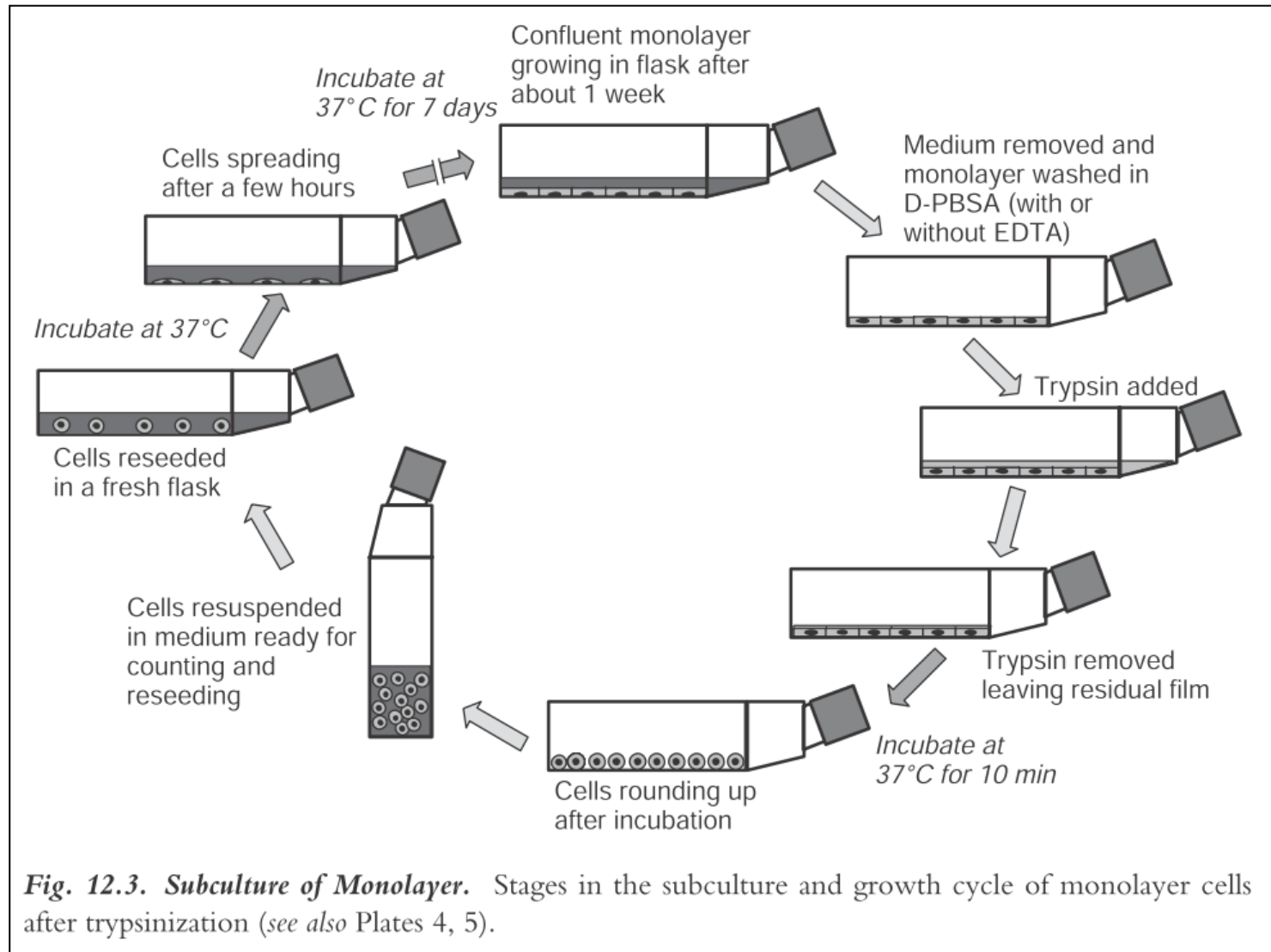
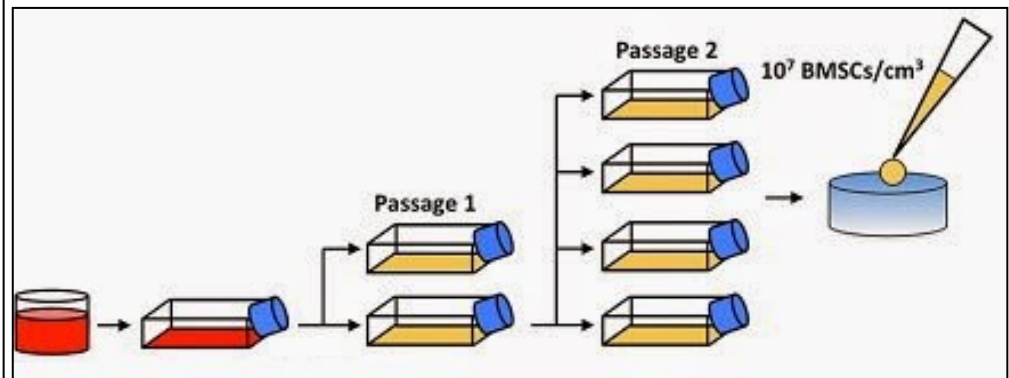
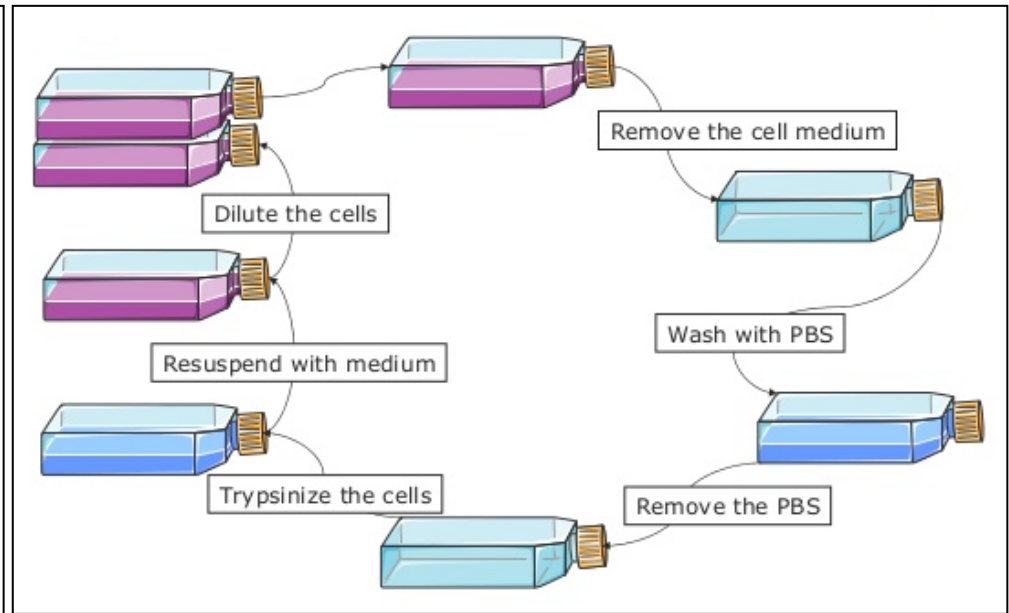
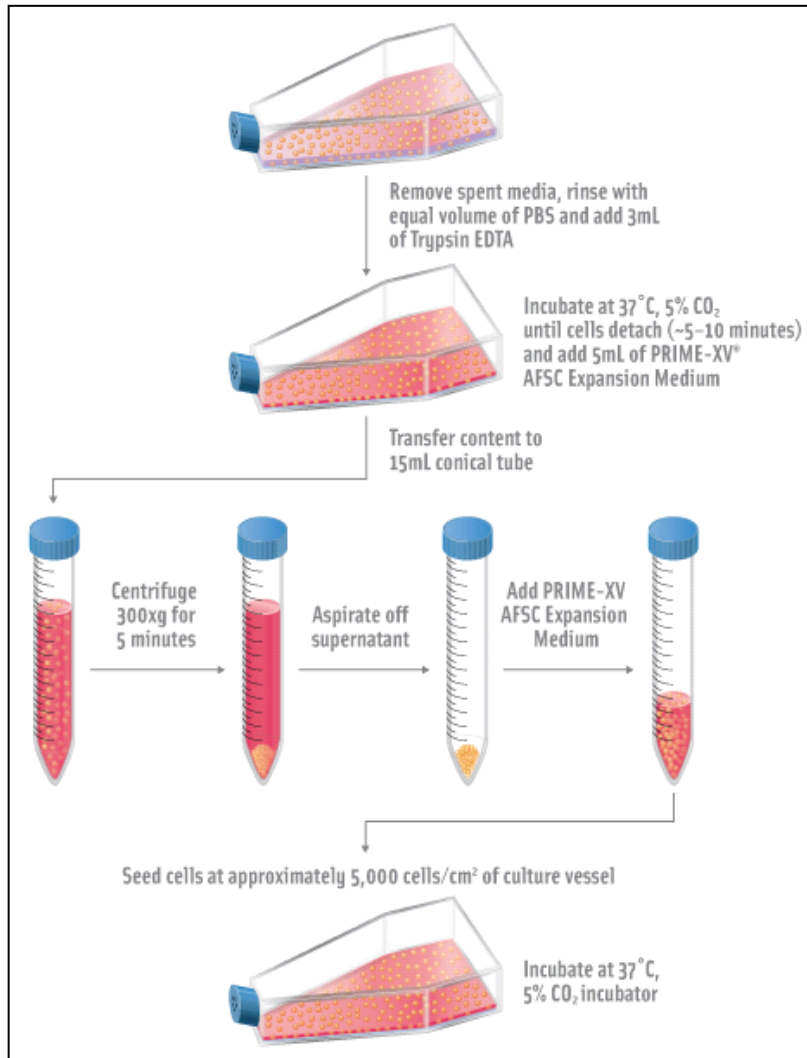
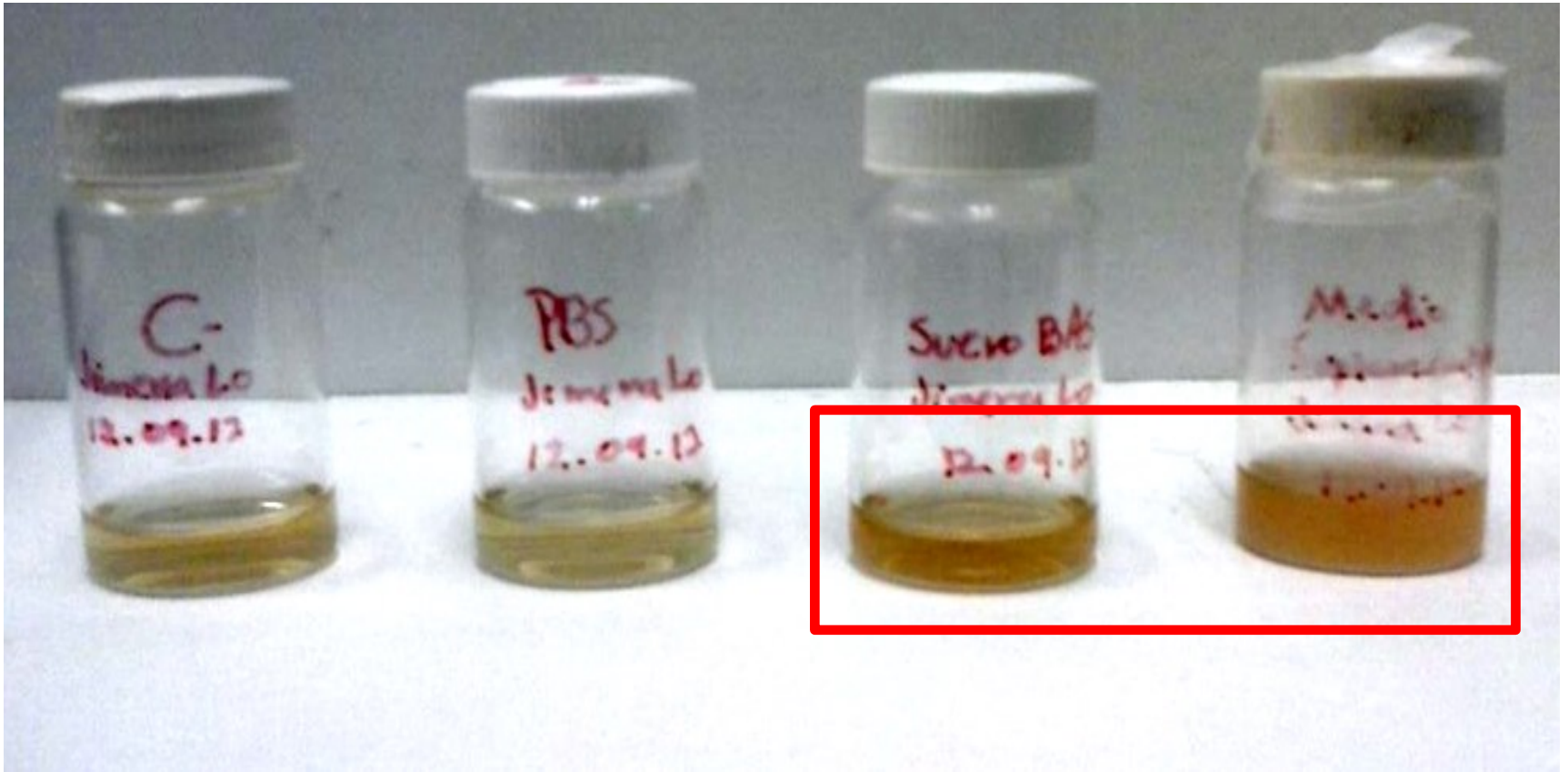


Fig. 12.3. Subculture of Monolayer. Stages in the subculture and growth cycle of monolayer cells after trypsinization (see also Plates 4, 5).

SUBCULTIVO DUNHA MONOCAPA

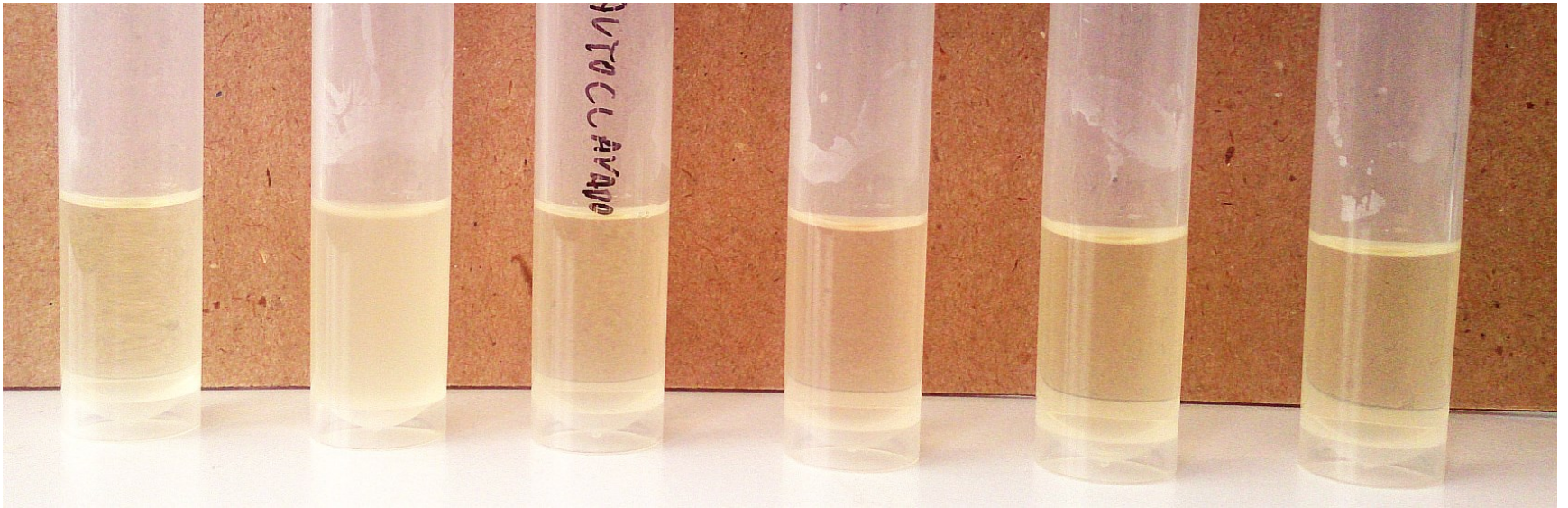
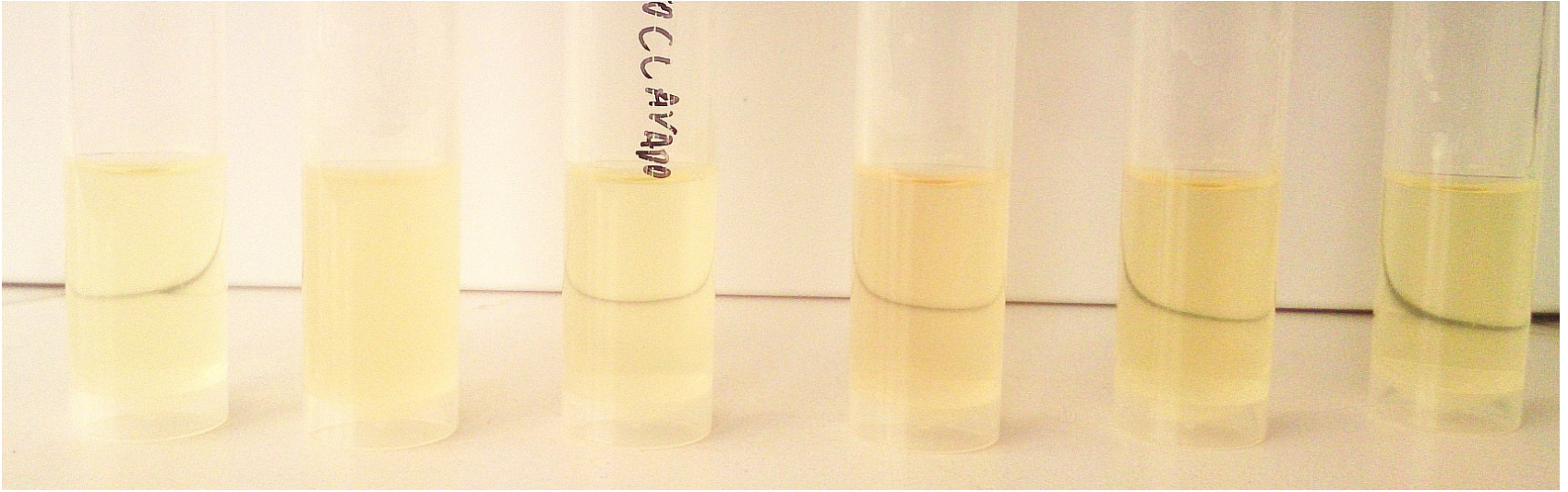


CONTAMINACIÓN

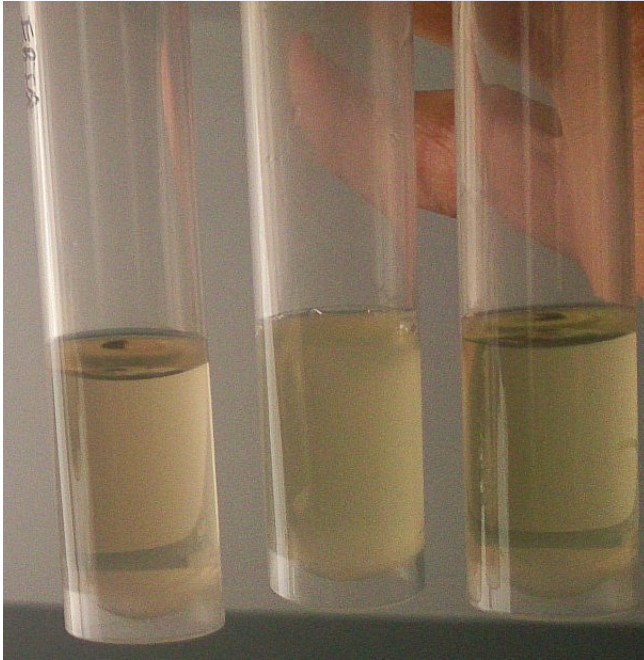


Imaxe tomada do Manual de Prácticas de cultivo de células animais, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Plantel Iztapalapa. Mexico

CONTAMINACIÓN

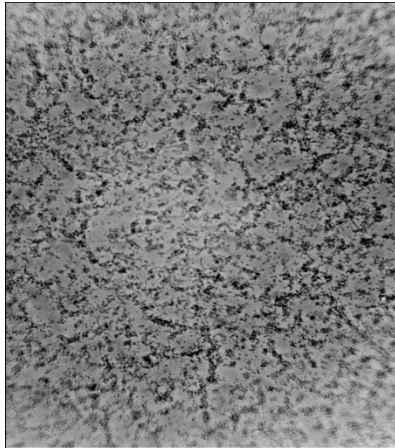


CONTAMINACIÓN

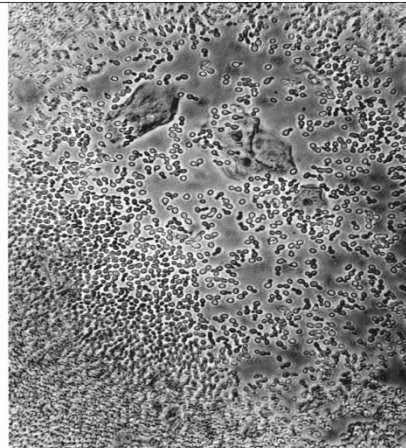


CONTAMINACIÓN

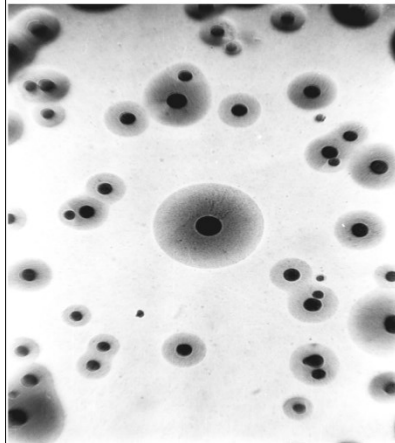
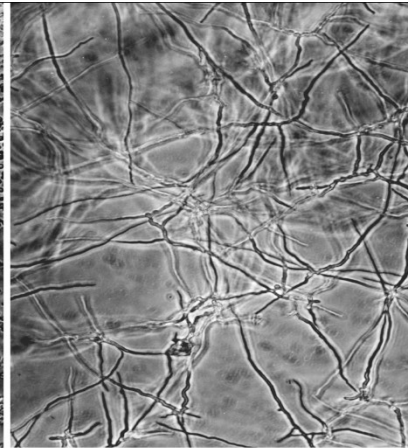
Bacteria



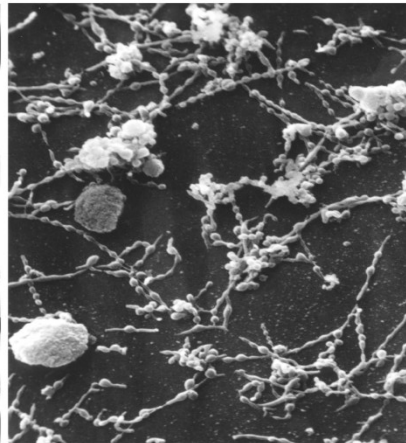
Levadura



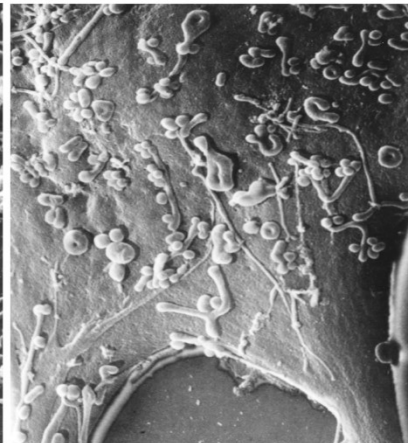
Hongo (Moho)



Colonias de Micoplasmas
crecidas sobre un agar
nutritivo especial



Micrografia electronica de micoplasmas creciendo sobre
la superficie de las celulas en cultivo.



Imaxe tomada de

www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/119009/mod_resource/content/0/Contaminaciones%2021-5.pdf

VÍDEO: Cell Culture Attached Cell

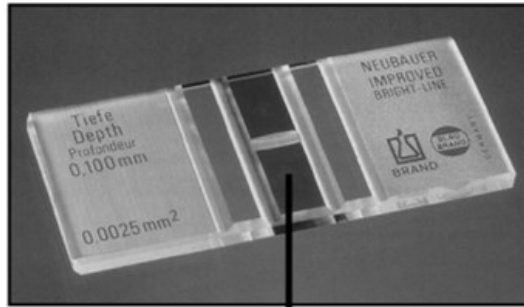
VÍDEO: Primary Cell Culture Protocols Guidance

VÍDEO: How To Change Cell Culture Media

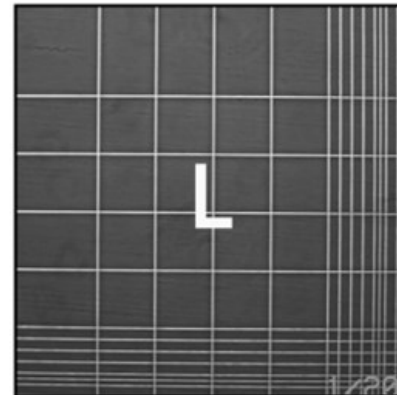
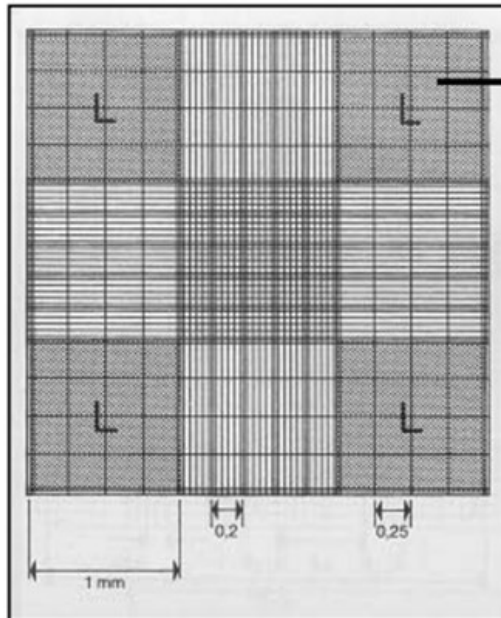
CUANTIFICACIÓN

Cálculo:

- * cada compartimiento: 1 mm X 1 mm X 0,1 mm (largo X ancho X fondo)
= $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$
- * se obtiene el número de células en un volumen constante de $0,1 \mu\text{l}$.
- * se cuentan los 4 compartimientos y se obtiene la media aritmética.



Cámara de Neubauer



CONXELACIÓN

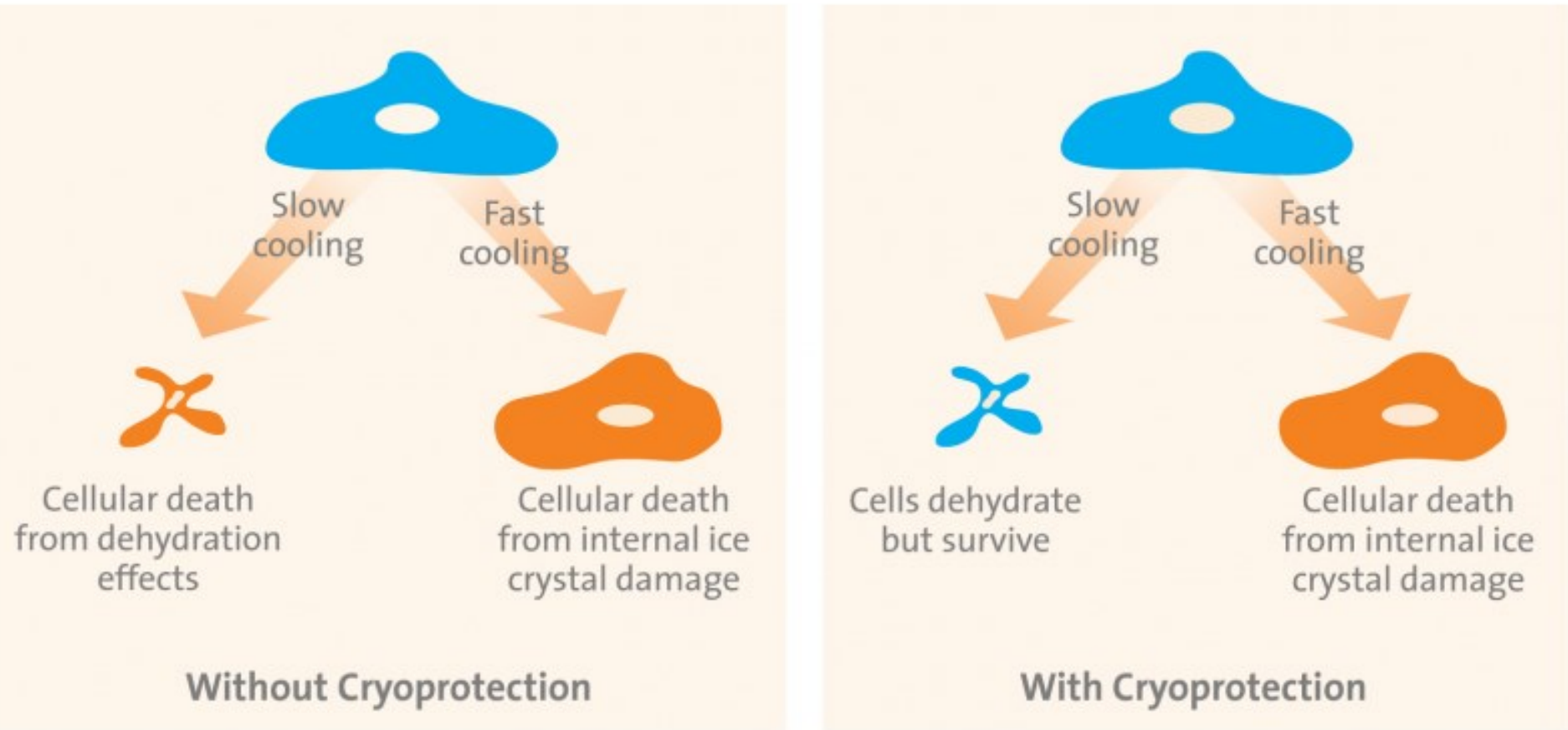


Figure 1. Effects of Freezing Rates on Cells

Imaxes tomada de General Guide for Cryogenically Storing Animal Cell Cultures
Authored by: John Ryan, Ph.D., Corning Incorporated Life Sciences

CONXELACIÓN

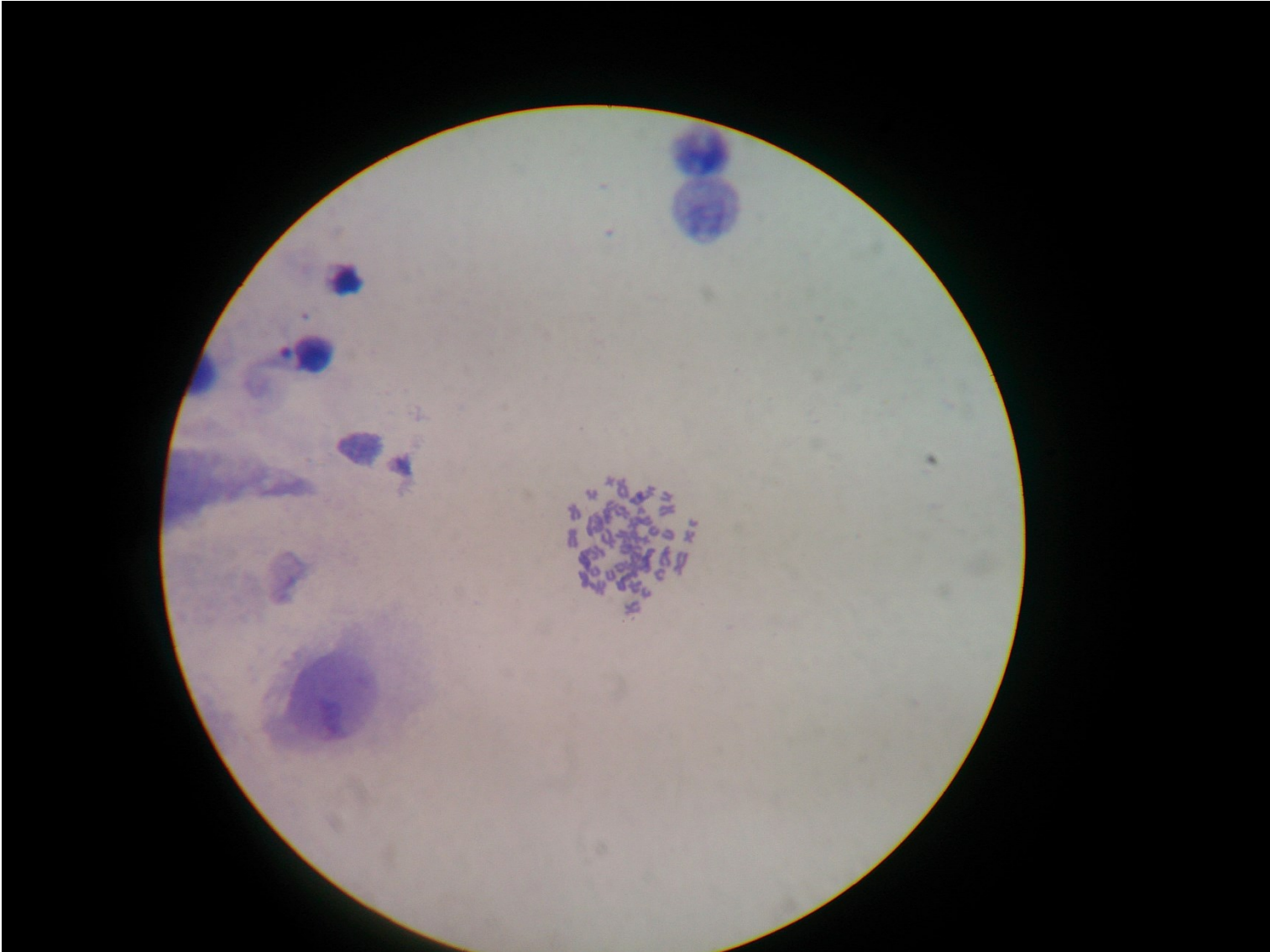
CONXELADOR -80 °C



TANQUE DE NITRÓXENO LÍQUIDO



CROMOGRAMA



CROMOGRAMA

