



**CULTIVOS CELULARES**

# CULTIVOS CELULARES

Conjunto de procedimientos que hacen posible el mantenimiento de células de organismos pluricelulares in vitro, preservando al máximo sus características fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

Se pueden diferenciar tres tipos de cultivos

Cultivo de órganos.

Cultivo de explantes

Cultivo de células.

# CULTIVOS CELULARES

## CULTIVO DE ÓRGANOS

Consiste en mantener un órgano entero o parte de él en la interfase entre un medio de cultivo artificial y una atmósfera controlada.

Se utilizan para estudiar interacciones y relaciones intercelulares, respuestas globales a estímulos y sustancias, estudios regenerativos, etc.

## CULTIVO DE EXPLANTES

consiste en adherir un fragmento de tejido a una superficie (placa o frasco de cultivo) y nutrirlo con un medio de cultivo.

las células periféricas del explante se multiplican y proliferan, migrando por la superficie del soporte

## CULTIVO DE CÉLULAS

Se realiza a partir de suspensiones celulares, que se introducen en un recipiente adecuado junto con un medio de cultivo y se incuban en las condiciones óptimas para que las células proliferen.

# CULTIVOS CELULARES

## CULTIVO DE CÉLULAS

Se realiza a partir de suspensiones celulares, que se introducen en un recipiente adecuado junto con un medio de cultivo y se incuban en las condiciones óptimas para que las células proliferen.

Es el tipo de cultivo más habitual y se realiza a partir de muestras de cualquier tipo de tejido, restos ovulares, líquido amniótico, sangre periférica, células hematopoyéticas, células madre, etc.

Según la procedencia de la suspensión celular de partida, los cultivos pueden ser primarios o secundarios.

- **Cultivo celular primario.** Para obtener un cultivo celular primario, **la suspensión celular de partida se obtiene disgregando las células de un tejido por métodos mecánicos o enzimáticos.** Se obtiene una mezcla celular compleja formada por los distintos tipos celulares presentes en el tejido. El cultivo primario se puede realizar a partir de esta mezcla o seleccionando un tipo celular concreto.
- **Cultivo celular secundario.** La suspensión celular de partida **se obtiene a partir de un cultivo primario o de otro secundario, mediante un subcultivo o «pase».** También se pueden obtener a partir de una línea celular mantenida en congelación.

# APLICACIONES DE LOS CULTIVOS CELULARES

En investigación básica permiten estudiar:

- **Cualquier aspecto relacionado con el metabolismo celular**: ciclo celular, rutas metabólicas, flujos intracelulares, diferenciación, transformación, etc.
- **Interacciones celulares**: entre células, con la matriz extracelular, con el medio ambiente.

En investigación aplicada, son una potente herramienta biotecnológica que se utiliza en muchas disciplinas, con importantes aplicaciones industriales:

- **Inmunología**, para producción de anticuerpos monoclonales.
- **Virología**, para producción de vacunas.
- **Farmacología**, para producción de fármacos.
- **Toxicología**, para estudios de citotoxicidad, carcinogénesis y mutagénesis.
- Dos aplicaciones relativamente modernas y muy interesantes son:
  - La **ingeniería de tejidos** que pretende conseguir la producción in vitro de tejidos (cultivos histotípicos) y órganos (cultivos organotípicos) funcionales para su uso en injertos y trasplantes.
  - **Estudios con células madre** o stem cells, enfocados a la terapia celular.

# BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

## CURVA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO

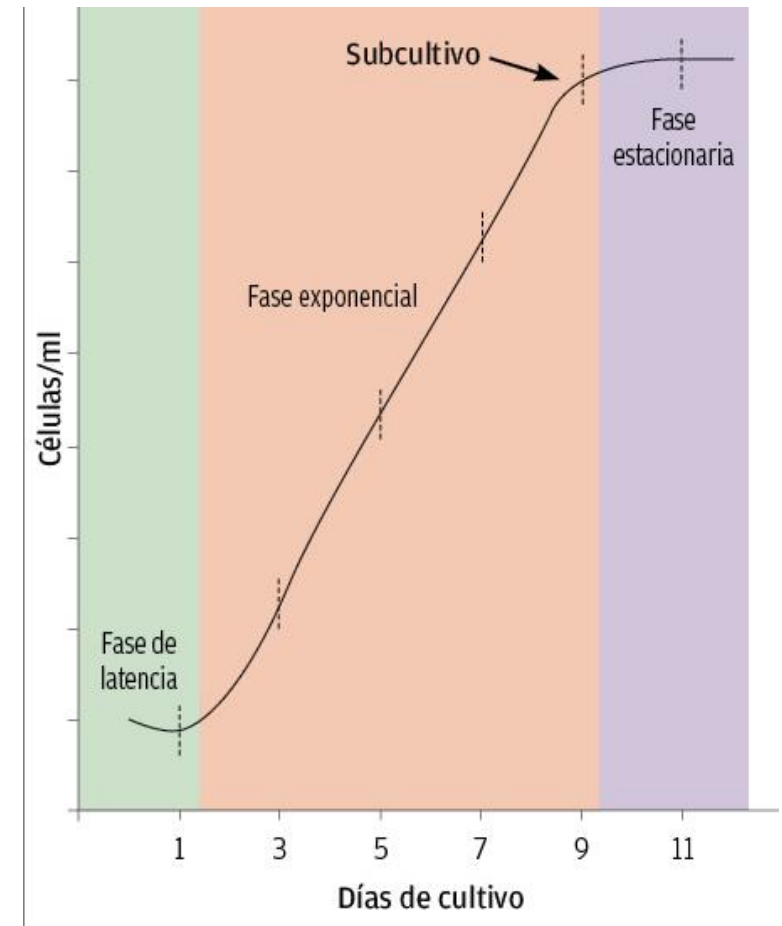
Representa la dinámica de crecimiento de un cultivo, es decir, la concentración de células por los días de evolución del cultivo

Adopta la forma de una **curva sigmoide** en la que se diferencian tres fases:

**Fase de latencia.** Es un **tramo recto** sin pendiente o con cierta concavidad. Corresponde a las **primeras 24 horas** de evolución del cultivo, en las que no se produce crecimiento y, por lo tanto, el **número de células se mantiene constante** o incluso puede disminuir ligeramente.

**Fase de crecimiento exponencial.** En la curva es el **tramo recto con pendiente elevada**. Dura aproximadamente **6-7 días** y corresponde a la fase en la que el **número de células aumenta de manera exponencial** hasta alcanzar un máximo.

**Fase estacionaria.** Es un **tramo recto de pendiente nula**. Sucede **a partir de los 6-7 días** de evolución del cultivo y es la fase en la que el **número de células permanece constante**.



# BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

FORMAS DE CRECIMIENTO



CRECIMIENTO EN MONOCAPA

Consiste en que las células crecen adheridas sobre una superficie sólida (plástico o vidrio).

Se pueden distinguir diferentes etapas de desarrollo:

- **Adhesión a una superficie.** Corresponde al periodo durante el cual las células se van adhiriendo al soporte.  
Coincide con el periodo de latencia de la curva de crecimiento.
- **Proliferación y formación de colonias.** Una vez que las células se han pegado a la pared del frasco de cultivo, empiezan a proliferar, expandiéndose por toda la superficie y formando colonias celulares. Esta etapa de crecimiento se corresponde con la fase exponencial de la curva de crecimiento.
- **Inhibición por contacto.** Con el paso del tiempo, las células ocupan toda la superficie disponible y entran en confluencia, estableciendo contactos entre ellas. En este momento se produce un fenómeno denominado inhibición por contacto y las células detienen su crecimiento, aunque se mantienen vivas. Se inicia la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Es en esta fase cuando la morfología y la fisiología de las células se parecen más a las de las células de origen.

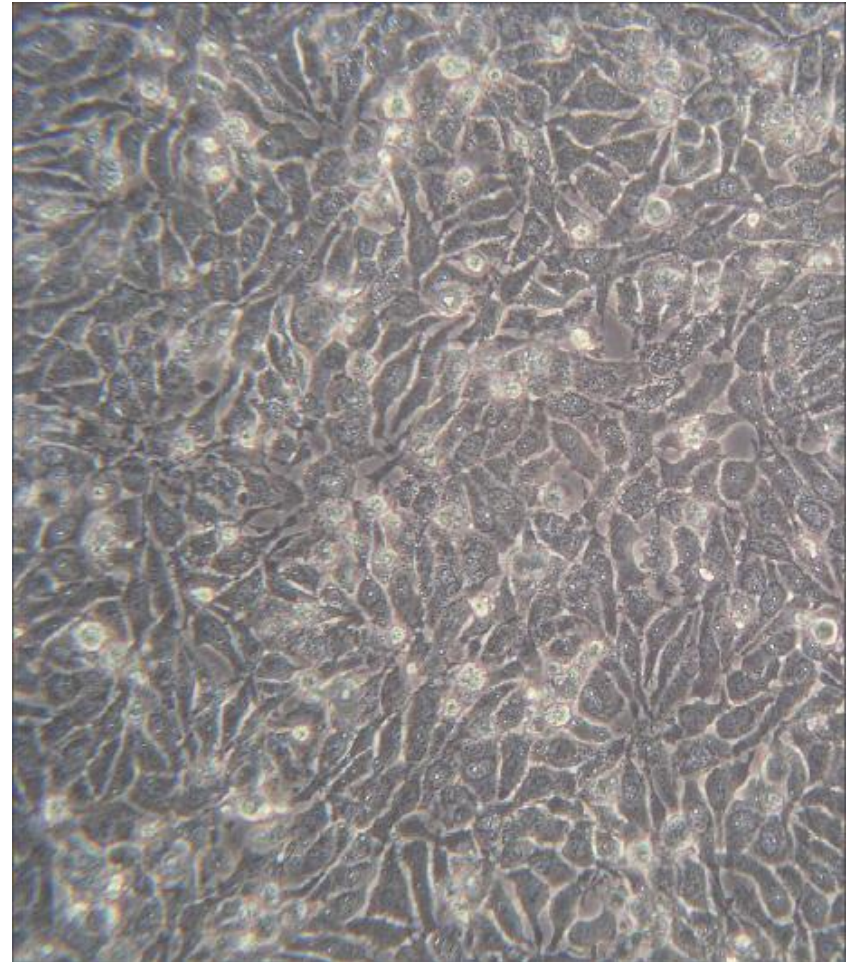
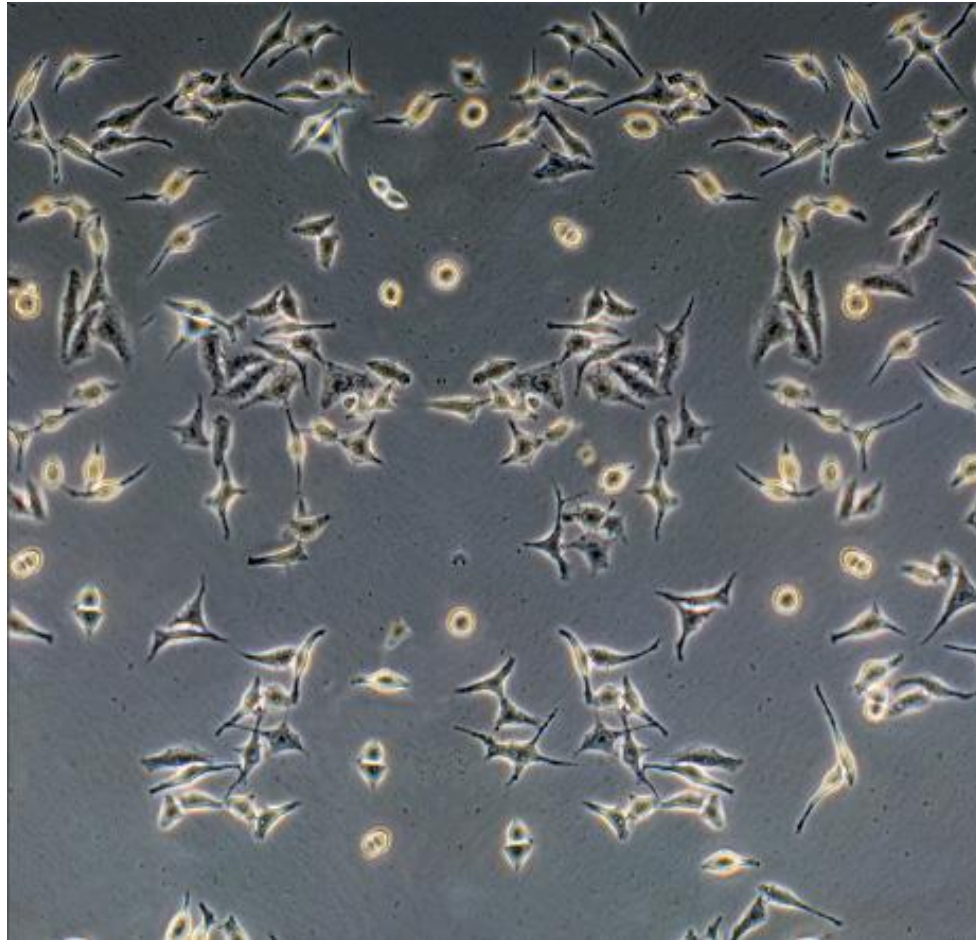
Para que las células reanuden su crecimiento se necesita hacer un subcultivo o «pase» de parte de las células a un nuevo frasco de cultivo. El momento idóneo para realizarlo es el final de la fase exponencial.

# BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

FORMAS DE CRECIMIENTO



CRECIMIENTO EN MONOCAPA



# BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

FORMAS DE CRECIMIENTO



CRECIMIENTO EN SUSPENSIÓN

Las células no necesitan pegarse a una superficie para crecer, por lo que se mantienen dispersas en el seno del medio de cultivo y proliferando.

Es típico de células sanguíneas circulantes, células hematopoyéticas, células madre, algunas líneas tumorales y algunas líneas celulares transformadas.

Se pueden distinguir diferentes momentos o etapas de desarrollo:

- **Adaptación al medio de cultivo.** Es un período, relativamente corto, en el que las células se adaptan al medio y las condiciones de cultivo, antes de iniciar la proliferación. Se corresponde con la fase de latencia de la curva de crecimiento.
- **Proliferación en suspensión.** Una vez adaptadas, las células dispersas en el medio de cultivo empiezan a proliferar aumentando exponencialmente su número (fase de crecimiento exponencial).
- **Inhibición por densidad.** Llega un momento en el cultivo en el que se alcanza un número crítico de células en relación con el volumen de medio de cultivo y los nutrientes que quedan en él. En ese momento se produce el fenómeno de inhibición por densidad y las células dejan de crecer, aunque se mantienen vivas.

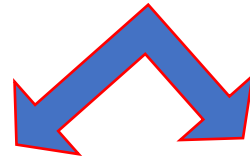
Esta etapa se corresponde con la fase de latencia de la curva de crecimiento.

Al igual que en los cultivos en monocapa, es necesario hacer un pase para que el crecimiento se reanude.

# BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

## COMPORTAMIENTO VITAL TRAS SUCESIVOS PASES

Los sucesivos pases a partir del cultivo primario dan origen a una línea celular primaria o a una línea celular continua.



La **línea celular primaria** es aquella obtenida a partir de un tejido u órgano mediante un cultivo primario y que se mantiene en cultivo mediante pases seriados durante un tiempo limitado.

Las **líneas celulares continuas** son aquellas que se obtienen a partir de un cultivo primario y que se mantienen en cultivo por tiempo ilimitado mediante pases seriados.

La aparición de líneas celulares continuas se puede también inducir por:

- **Métodos físicos:** irradiación del cultivo.
- **Métodos químicos.** Tratamiento con productos químicos carcinogénicos.
- **Métodos biológicos** (infección vírica, transfección de ADN).

# BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

## COMPORTAMIENTO VITAL TRAS SUCESIVOS PASES



## LÍNEA CELULAR CONTÍNUA

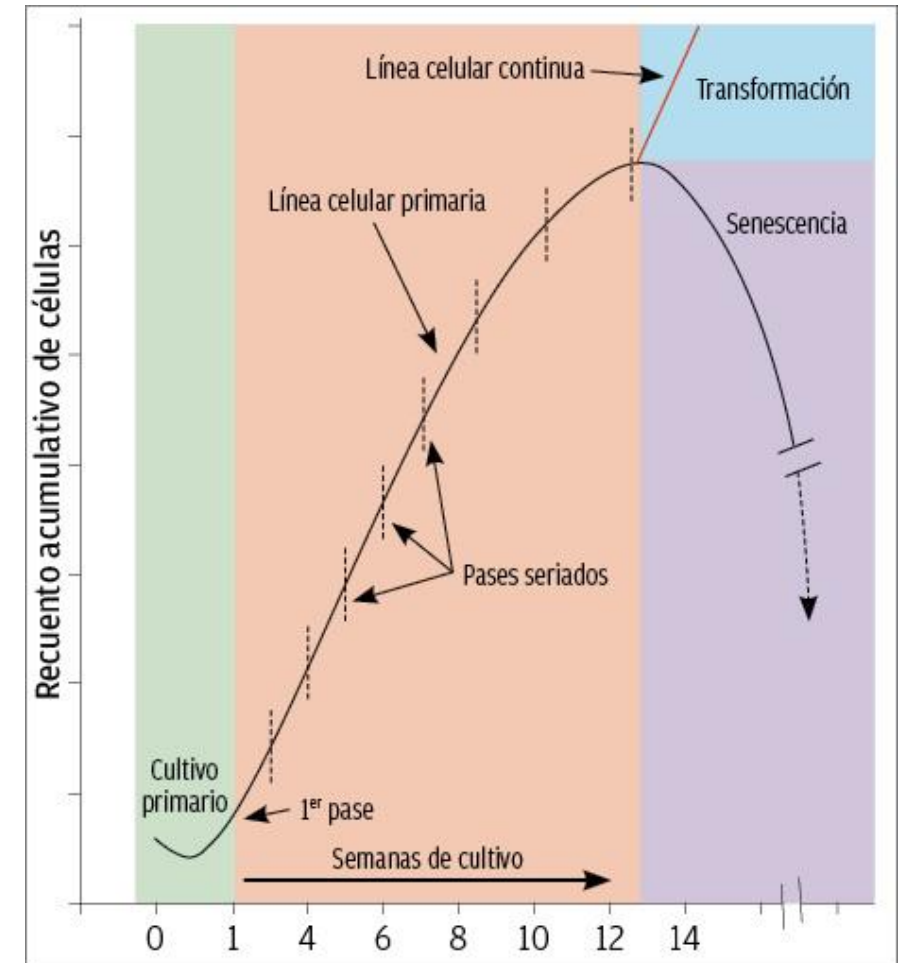
Aparecen espontáneamente en algunos cultivos, que se mantienen durante más pases de los esperados.

Se deben a la **aparición en el cultivo de células inmortales, capaces de originar líneas estables y permanentes.**

**Aparecen como consecuencia de la pérdida de los mecanismos de control celular.**

**Las células transformadas tienen características especiales:**

- Crecen indefinidamente en cultivo (son inmortales).
- Pierden la dependencia del anclaje para crecer, por lo que pueden crecer en suspensión.
- Pierden la inhibición por contacto.
- Pueden invadir tejidos y producir tumores.
- Acumulan anomalías genéticas. Normalmente son aneuploides, con múltiples aberraciones cromosómicas.



# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

El cultivo de células implica **extraerlas de su entorno tisular fisiológico**, **introducirlas en el interior de un recipiente adecuado** que las aísla del exterior, **inmersas en un medio de cultivo artificial** y, finalmente, colocar este conjunto en el interior de un **incubador** que proporciona unas condiciones ambientales adecuadas.

Para que el proceso se desarrolle adecuadamente es necesario controlar una serie de factores o condiciones:

- El soporte físico en el que van a crecer las células.
- La composición y propiedades fisicoquímicas del medio de cultivo.
- La atmósfera gaseosa.
- Las condiciones de incubación.

# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

## EL SOPORTE FÍSICO



## MATERIALES PARA CULTIVO

Debe permitir la adhesión de las células, ser fácilmente esterilizable y tener una mínima calidad óptica para poder visualizar el cultivo con un microscopio invertido.

Los más utilizados son el **vidrio** y los **plásticos**, pero hay otros materiales para situaciones particulares:

- **Vidrio**. Es reutilizable, fácil de limpiar y de esterilizar por calor en autoclave. Además, tiene muy buena calidad óptica para observaciones microscópicas.
- **Plástico desechable**. Actualmente es el material más utilizado por su bajo coste, su facilidad de esterilización por irradiación y su buena calidad óptica, además de por el ahorro de personal y tiempo de trabajo que supone no tener que reutilizarlo.
- **Matrices tridimensionales**. Se consiguen con materiales que forman estructuras tridimensionales porosas como los geles de colágeno o las esponjas de celulosa, recubiertas o no por colágeno. Se utilizan para cultivar algunos tipos celulares que se introducen en el interior de la red tridimensional y crecen organizándose de manera más parecida a como lo hacen en su tejido de procedencia.
- **Microesferas de sephadex o poliacrilamida**. Las células pueden crecer adheridas a estas microesferas, que se mantienen en suspensión en el seno del medio de cultivo.
- **Metales**. Para algunas aplicaciones muy concretas, como el cultivo de células de la glía, se pueden utilizar sustratos metálicos específicos de paladio o acero.

# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

## EL SOPORTE FÍSICO



## MATERIALES PARA CULTIVO

- Existe una amplia variedad de recipientes para cultivo.
- El parámetro más importante que los caracteriza es la superficie útil de cultivo, porque con base en ese valor se calcula la cantidad de células que se siembran y se prevé el número aproximado final de células cuando se alcanza la confluencia

Recipiente	Superficie de cultivo (cm <sup>2</sup> )	Volumen de medio (ml)	Siembra (N.º de células)	Confluencia (N.º de células)
Placa multipocillo P96	0,5	0,1	$1,5 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$
Placa multipocillo P6	10	2	$3 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^6$
Placa de Petri (Ø 3,5 cm)	10	2	$3 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^6$
Placa de Petri (Ø 10 cm)	78	10	$2,2 \cdot 10^6$	$8,8 \cdot 10^6$
Frasco roux T-25	25	5	$7 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^6$
Frasco roux T-75	75	10	$2,2 \cdot 10^6$	$8,8 \cdot 10^6$

# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

## EL SOPORTE FÍSICO

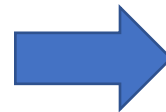
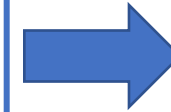
## CARACTERÍSTICAS Y TIPOS DE RECIPIENTES DE CULTIVO

### Placas multipocillo.

Son placas con un número variable de pocillos (entre 6 y 96) con fondo habitualmente plano, cubiertas por una tapa no hermética.

**Son útiles** para realizar experimentos puntuales simultáneos con distintas líneas celulares o diferentes condiciones de cultivo.

**No son aconsejables** para el mantenimiento de líneas celulares por su mala estanqueidad y porque presentan mayor riesgo de contaminación.



### Placas de Petri.

Son las clásicas placas de cultivo circulares con tapa, en tamaños que oscilan entre 3,5 y 10 cm de diámetro, y que corresponden a superficies de cultivo entre 10 y 78 cm<sup>2</sup>.

Tienen las mismas utilidades y limitaciones que las placas multipocillo.

# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

## EL SOPORTE FÍSICO

## CARACTERÍSTICAS Y TIPOS DE RECIPIENTES DE CULTIVO

### **Frascos o botellas roux.**

Son frascos planos con tapón de rosca disponibles en muchos tamaños. Se caracterizan por su superficie de crecimiento; los más habituales son los de 25 y 75 cm<sup>2</sup>, aunque los hay hasta de 225 cm<sup>2</sup>.

Son idóneos para todo tipo de cultivo en monocapa y en suspensión, y para el mantenimiento de líneas celulares.



### **Botellas para incubadores tipo roller.**

Son botellas cilíndricas, de distintos tamaños, con una gran superficie de crecimiento, específicas para incubarlas sobre rodillos que las hacen girar lentamente, de manera que las células pueden crecer en toda la superficie interior de la botella.

# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

## COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DEL MEDIO DE CULTIVO

Son medios nutritivos que sustituyen al medio natural en el que se encuentra la célula fisiológicamente.

Son mezclas complejas que deben:

- Aportar a la célula nutrientes para su mantenimiento como organismo vivo, y todo tipo de sustancias necesarias para el completo desarrollo metabólico que permita a la célula proliferar.
- Reunir una serie de características fisicoquímicas que:
  - Generen condiciones microambientales adecuadas para el desarrollo celular.
  - Permitan acumular temporalmente productos de desecho del metabolismo celular.

# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

## COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DEL MEDIO DE CULTIVO



## COMPOSICIÓN

- **Sales minerales.** La base de un medio de cultivo es una solución salina equilibrada en la que se disuelven el resto de los componentes. Entre las sales minerales que forman parte habitual de los medios de cultivo están el **cloruro sódico**, **cloruro potásico**, **cloruro cálcico**, **cloruro magnésico**, **fosfatos sódicos** y **bicarbonato sódico**. La concentración de bicarbonato sódico es especialmente importante por su papel en la regulación del pH en conjunción con la concentración de CO<sub>2</sub> ambiental.
- **Tampón.** El medio de cultivo tiene que estar tamponado, puesto que las células son muy sensibles a los cambios de pH. El tampón más utilizado ha sido el **bicarbonato**, sin embargo, en la actualidad se aconseja el uso del tampón **HEPES** debido a su gran poder tamponador en el rango de pH óptimo para el crecimiento celular (7,2-7,6).
- **Glucosa.** La glucosa se incluye en los medios de cultivo como fuente de energía, como componente único o junto con otros hidratos de carbono.
- **Aminoácidos.** El medio de cultivo debe contener, como mínimo, todos los aminoácidos esenciales. Se puede suplementar además con otros aminoácidos, dependiendo de las necesidades de las células que se quiere cultivar
- **Vitaminas.** Las vitaminas son necesarias porque influyen en la tasa de crecimiento y en la supervivencia de las células

# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

## COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DEL MEDIO DE CULTIVO



## COMPOSICIÓN

- **Suplementos orgánicos de bajo peso molecular.** En esta categoría se incluyen ácidos grasos esenciales y otros lípidos, nucleósidos, piruvatos, etc.
- **Indicador de pH.** Dado que el pH del medio es un parámetro fundamental para la supervivencia del cultivo, en la composición del medio se incluye un indicador de pH que registre cambios mínimos en el rango de pH óptimo para el crecimiento.  
El más usado es el **rojo fenol**, que es púrpura a pH 7,8, rojo a pH 7,4, naranja a pH 7,0 y amarillo a pH 6,5.
- **Hormonas y factores de crecimiento.** Esta categoría incluye multitud de componentes esenciales para el crecimiento de las células, pero cuya proporción en el medio de cultivo es muy difícil de estandarizar. Los más usados son el suero de ternera y el suero bovino fetal
- **Antibióticos y antifúngicos.** La suplementación del medio de cultivo con antibióticos y antifúngicos es esencial para prevenir la contaminación por bacterias, levaduras y hongos.
  - **Gentamicina** a una concentración de 50 µg/ml.
  - Combinación de **penicilina/estreptomicina** a concentraciones 100 U/ml\_100 µg/ml, respectivamente.
  - El antifúngico más utilizado es la **anfotericina B** a una concentración de 2-5 µg/ml.

# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

## COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DEL MEDIO DE CULTIVO



## CARACTERÍSTICAS FISICO QUIMICAS

- **pH.** Las células en cultivo suelen crecer en un margen de pH relativamente estrecho. El pH óptimo para la mayoría de las células es de 7,4 (rango 7,2-7,6), El pH del medio se fija con tampones y se controla con un indicador de pH,
- **Osmolaridad.** Los medios de cultivo deben ser **isotónicos o ligeramente hipotónicos** respecto de las células que se cultivan. En general, las células en cultivo toleran valores de osmolaridad en el rango de 260-320 mOsm/kg.
- **Viscosidad.** La viscosidad no suele ser un parámetro limitante para el crecimiento de las células. Depende principalmente de la concentración de suero que se use. Una viscosidad ligeramente elevada tiene efecto protector durante la tripsinización y agitación del cultivo
- **Tensión superficial.** La tensión superficial debe mantenerse baja y no suele ser problema en los cultivos tradicionales. Únicamente en ciertos cultivos especiales en suspensión en los que se burbujea CO<sub>2</sub> puede producirse espuma en el cultivo. Para evitarlo se añaden agentes antiespumantes.

# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

## LA ATMÓSFERA GASEOSA

Es la mezcla de gases en que se mantienen los cultivos; sus dos componentes más importantes son el O y el CO<sub>2</sub>.

Los componentes de la atmósfera del cultivo son controlados y suministrados por el incubador.

- **Oxígeno.** En general, la concentración de oxígeno atmosférico es suficiente para cubrir las necesidades de cualquier cultivo celular. Solo algunos cultivos de órganos requieren una mayor concentración de oxígeno (hasta un 95%) por la mala difusión de este elemento al interior del órgano.
- **CO<sub>2</sub>.** El CO<sub>2</sub> tiene un papel muy importante en los cultivos celulares puesto que la fracción disuelta en el medio está en equilibrio con el ion bicarbonato.
  - Cada medio de cultivo tiene una concentración recomendada de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa, en función de la cantidad de bicarbonato sódico que contiene.
  - La concentración más habitual, es del 5%, con un rango entre 2% y 8%.
  - Los incubadores llevan acopladas botellas de CO<sub>2</sub> y un dispositivo que permite controlar la concentración de este componente en la atmósfera de incubación.

# FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO

## CONDICIONES DE INCUBACIÓN

El incubador es el responsable de mantener las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento de las células, controlando dos parámetros: **temperatura** y **humedad**.

- **Temperatura.** La temperatura influye en gran medida en la tasa de crecimiento de las células. La temperatura óptima de crecimiento suele ser la misma a la que están sometidas fisiológicamente en los organismos de procedencia. Las células de mamíferos crecen bien a 37 °C.
- **Humedad.** La humedad ambiental es también un parámetro importante para el buen crecimiento de las células. Debe ser suficientemente elevada para evitar la evaporación del medio de cultivo, lo que produciría aumento de la concentración de los componentes y de la osmolaridad, y variaciones de pH.

Los incubadores actuales tienen dispositivos que inyectan agua estéril para conseguir humedades relativas alrededor del 95%.

# PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

DISGREGACIÓN CELULAR



MÉTODOS DE DISGREGACIÓN CELULAR

**métodos mecánicos** se basan en cortar, picar e incluso triturar suavemente fragmentos de órgano o tejido colocados en un placa de Petri con tampón o medio de cultivo, en el que se recogen las células disgregadas tras filtrarlo para retirar los restos de tejido.

**métodos enzimáticos** se basan en el tratamiento del tejido con enzimas proteolíticas que digieren las proteínas de la matriz extracelular, liberando las células englobadas en ella.

Entre las proteasas más utilizadas están la tripsina, la colagenasa, la dispasa, la papaína, la elastasa y la pronasa.

Las soluciones enzimáticas se pueden combinar con EDTA, que al retirar los cationes de  $\text{Ca}^{2+}$  que estabilizan las uniones entre las proteínas de matriz y las células, favorece su disgregación

# PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

## DISGREGACIÓN CELULAR



## SELECCIÓN DE CÉLULAS

Tras la disgregación de un tejido se obtiene una mezcla compleja de células en suspensión.

La selección de células se basa en:

- **Propiedades específicas** de las células. Las células se pueden separar por su distinta adhesión a sustratos, tanto naturales (endotelios, colágeno) como artificiales (lana de vidrio, plástico).
  - La suspensión celular se hace pasar por columnas o filtros con estos sustratos, de manera que las células de interés quedan retenidas en ellos.
  - Posteriormente se eluyen con un tampón adecuado que disminuya la adhesión.
- **Métodos inmunológicos** de selección de células. Se basan en el uso de anticuerpos específicos que reconocen las células de interés anclados a un soporte sólido. Hay varias posibilidades:
  - Recubrir los pocillos de una placa mutipocillos con el anticuerpo específico.
  - Recubrir esferas de material inerte de cierto tamaño con el anticuerpo. Estas esferas se introducen en la suspensión con la mezcla de células, de manera que las células de interés quedan retenidas sobre la superficie de las esferas.
  - Recubrir esferas magnéticas con el anticuerpo.

En los tres casos, las células se separan del soporte sólido cambiando el pH o digiriendo los anticuerpos con enzimas.

# PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

## RECuento Y VIABILIDAD CELULAR

Una vez obtenida la suspensión celular de partida, para iniciar el cultivo celular es imperativo conocer su **densidad celular**, es decir, el número de células por ml.

- Esto es debido a que el cultivo se inicia con un número concreto de células, dependiendo de la superficie del recipiente que se vaya a utilizar.
- Es necesario comprobar la viabilidad de esas células, es decir, confirmar que están vivas.
- Ambos procesos se realizan simultáneamente diluyendo las células con un colorante vital y contándolas en una cámara de recuento.

# PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

RECuento y Viabilidad Celular



El Colorante Vital

El colorante vital permite distinguir las células vivas de las muertas.

- El colorante más habitual es el **azul tripán**, un coloide de color azul que penetra en el interior de las células que tienen la membrana rota, pero que no atraviesa las células con las membranas intactas.
- Cuando se observa al microscopio **una población de células teñida con azul tripán**, se ven dos tipos de células:
  - **Células de color azul**, que se han teñido porque tienen rota su membrana citoplásmica. Estas células se consideran no viables.
  - **Células blancas**, en las que el colorante no ha podido penetrar porque su membrana citoplásmica está intacta. Se considera que estas células están vivas y son viables para un cultivo.

# PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

RECuento Y VIABILIDAD CELULAR



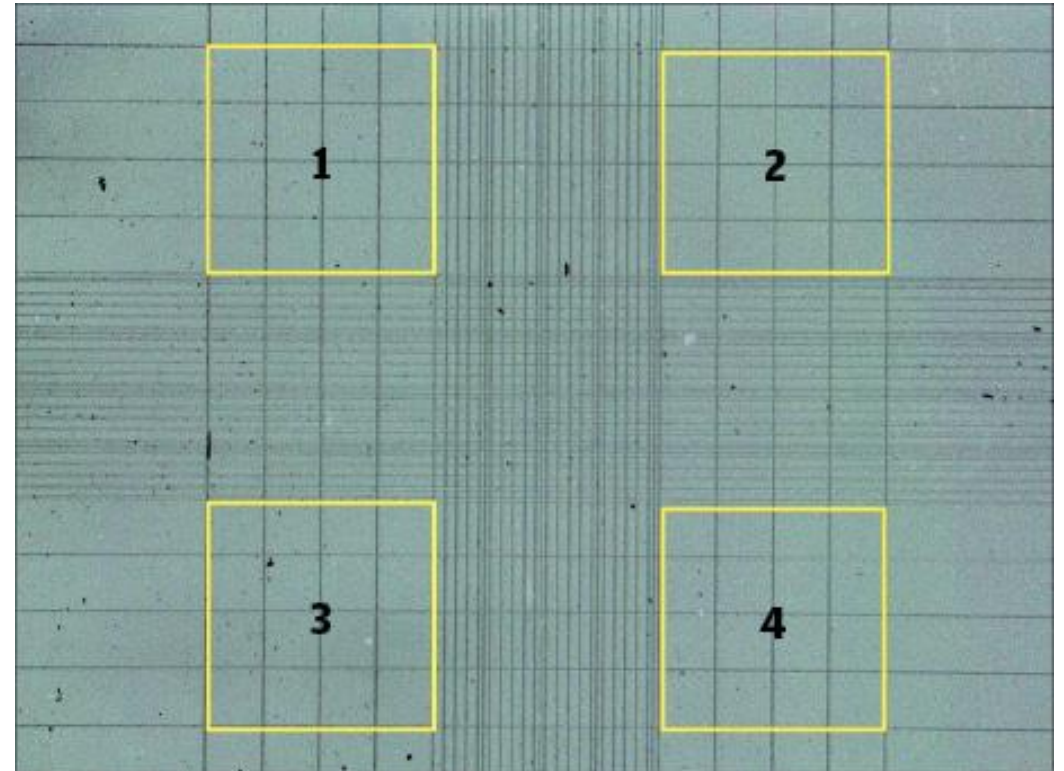
EL CONTAJE

El conteo consiste en el proceso de recuento de las células blancas (viables) y azules (no viables).

- Este procedimiento se lleva a cabo en la cámara de conteo celular o hemocitómetro.
- La más utilizada es la cámara de Neubauer
- Se cuentan en los cuadrados de las esquinas
- Se cuentan las células blancas A (viables) y azules B (no viables) presentes en las cuatro esquinas de  $0,1 \text{ mm}^3$

Se realizan los siguientes cálculos:

- Densidad celular en la suspensión: (células totales/ml) =  $(A + B) \cdot 2 \cdot 10^4 / 4$
- Densidad celular viable: =  $A \cdot 2 \cdot 10^4 / 4$
- Densidad celular no viable: =  $B \cdot 2 \cdot 10^4 / 4$



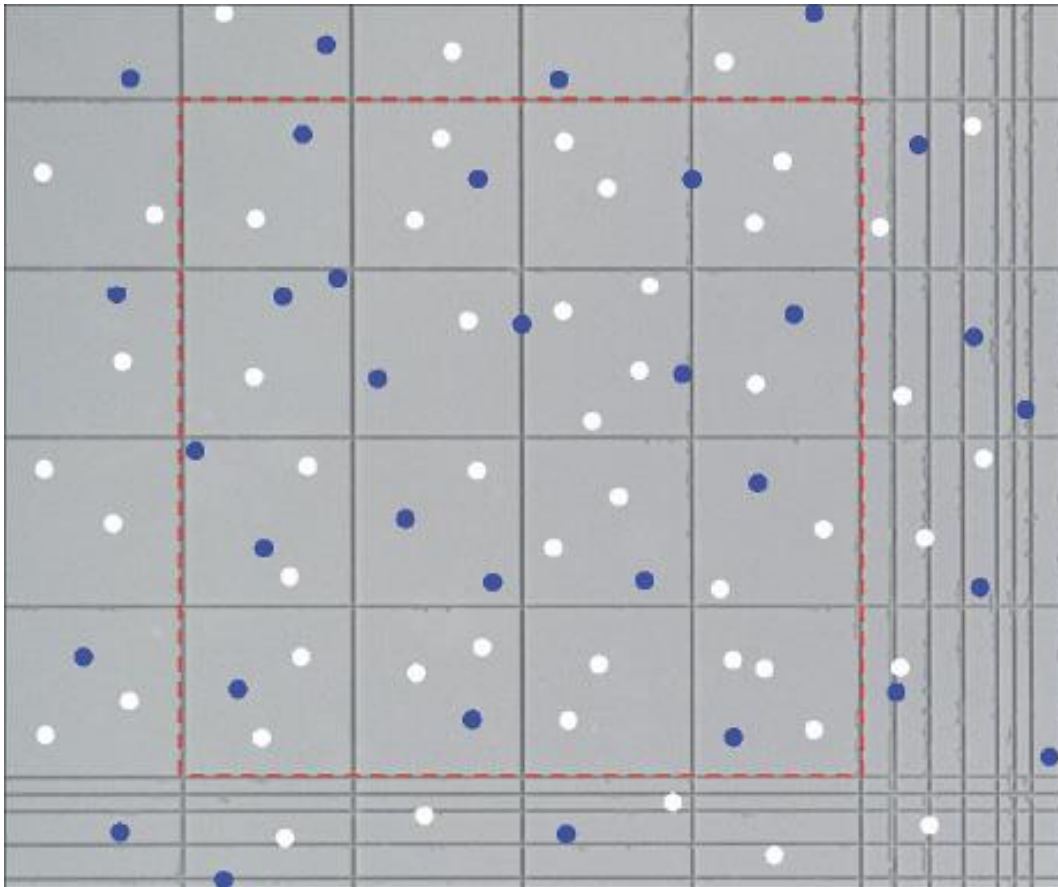
# PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

RECuento Y VIABILIDAD CELULAR



EL CONTAJE

El conteo consiste en el proceso de recuento de las células blancas (viables) y azules (no viables).



Visualización microscópica de uno de los cuadrados de esquina de la cámara de Neubauer (línea discontinua roja) cargada con una suspensión celular teñida con azul tripán.

En el cuadrado se observan:

- 30 células blancas (viables)
- 18 células azules (no viables)

$$\text{Viabilidad del cultivo} = \frac{n^{\circ} \text{ células viables}}{n^{\circ} \text{ células totales}} \times 100$$

# PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

## INICIO DEL CULTIVO (SIEMBRA)

Partiendo de una suspensión celular obtenida por **disgregación**, **selección** o **descongelación**, el cultivo se inicia sembrando un número determinado de células.

Este procedimiento implica:

- Elegir el tipo de recipiente que se va a utilizar para el cultivo.
- En virtud del recipiente, establecer el número de células que se van a sembrar inicialmente.
- Hacer recuento de células viables en la suspensión.
- Transferir un volumen de suspensión que contenga el número de células deseado a un tubo falcon y lavarlas con medio de cultivo completo precalentado a 37 °C.
- Diluir las células con el volumen adecuado de medio de cultivo completo e introducir las en el recipiente de cultivo.
- Colocar el recipiente de cultivo en un incubador a la temperatura adecuada (normalmente 37 °C), con la proporción de CO<sub>2</sub> requerida (del 5%, habitualmente) y 95% de humedad.

# PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

MANTENIMIENTO DEL CULTIVO



CONTROL PERIÓDICO MICROSCÓPICO

Los cultivos **se controlan microscópicamente** normalmente cada **1-3 días**, se retiran del incubador y se examinan con un microscopio invertido para observar la apariencia y el crecimiento de las células.

MANTENIMIENTO DEL CULTIVO



CAMBIO DE MEDIO

Es la **operación de mantenimiento más frecuente, para renovar los nutrientes consumidos por las células y retirar los productos de desecho generados por el metabolismo celular.**

- El cambio de medio se suele realizar **cada 2-3 días** o siempre que se observe un cambio de color del medio (viraje del indicador de pH).
- El cambio de medio nunca es total, sino que se cambian sólo  $\frac{2}{3}$  de su volumen. De esta manera se consigue que posibles sustancias beneficiosas para el cultivo producidas y secretadas por las células se mantengan en él.
  - En **cultivos en monocapa** el cambio de medio consiste en retirar con pipeta  $\frac{2}{3}$  de medio de cultivo y sustituirlo por medio nuevo.
  - En **cultivos en suspensión**, se centrifuga a 700-800 rpm el cultivo, se retiran  $\frac{2}{3}$  del volumen del medio y se sustituye por medio nuevo.

Una vez cambiado el medio se reanuda la incubación en condiciones adecuadas

# PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

MANTENIMIENTO DEL CULTIVO



SUBCULTIVO O PASE

Tras un cierto tiempo de cultivo (6-7 días), los cultivos en monocapa se encuentran en situación de confluencia y los cultivos en suspensión alcanzan una densidad crítica. En ambos casos el crecimiento se detiene y hay que realizar un subcultivo o pase.

## ➤ Cultivos en suspensión

En los cultivos en suspensión, se realiza un recuento de viables y se calcula el factor de dilución necesario para que la densidad celular sea la adecuada para reiniciar el crecimiento.

Por ejemplo, supongamos que la dilución adecuada es  $1/5$ . En ese caso se preparan 5 recipientes con  $4/5$  de medio nuevo y se añade a cada uno  $1/5$  del cultivo viejo.

Los 5 subcultivos se pasan al incubador para reiniciar el crecimiento celular. De esta forma se va expandiendo la población celular.

## ➤ Cultivos en monocapa

En los cultivos en monocapa es necesario despegar las células de la superficie del recipiente para poder hacer el pase.

Esto se puede hacer por métodos mecánicos, con un rascador, pero el procedimiento más habitual es la tripsinización. (es el procedimiento de despegado de una monocapa de células de la superficie del recipiente mediante una solución de tripsina/EDTA).

# PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

## CONSERVACIÓN DE CÉLULAS

- Las líneas celulares continuas o inmortales se pueden mantener en el tiempo mediante pases seriados.
- El método habitual de conservación de líneas celulares es la congelación.
- Para llevarla a cabo se procede como si se fuese a realizar un pase:
- Cuando se ha obtenido una suspensión de células, se lavan con medio de cultivo y se hace un recuento de viables.
- Se retira el medio de cultivo por centrifugación y se sustituye por un volumen adecuado de suero animal con un 10% de DMSO. Una densidad celular final en el medio de congelación aceptable es alrededor de  $10^6$  células/ml.
- Esta suspensión se alicuota en criotubos (aproximadamente 1ml/criotubo) y se procede a congelación progresiva:
  - $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.
  - $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h más.
  - En nitrógeno líquido indefinidamente.

# CONTAMINACIONES

Las contaminaciones en los cultivos celulares se refieren principalmente a la alteración del cultivo por la presencia de microorganismos no deseados y que son omnipresentes en el ambiente.

Estos contaminantes, según la mayor frecuencia en la que se presentan se pueden agrupar en:

- Bacterias,
- Levaduras
- Hongos
- Micoplasmas
- Virus.