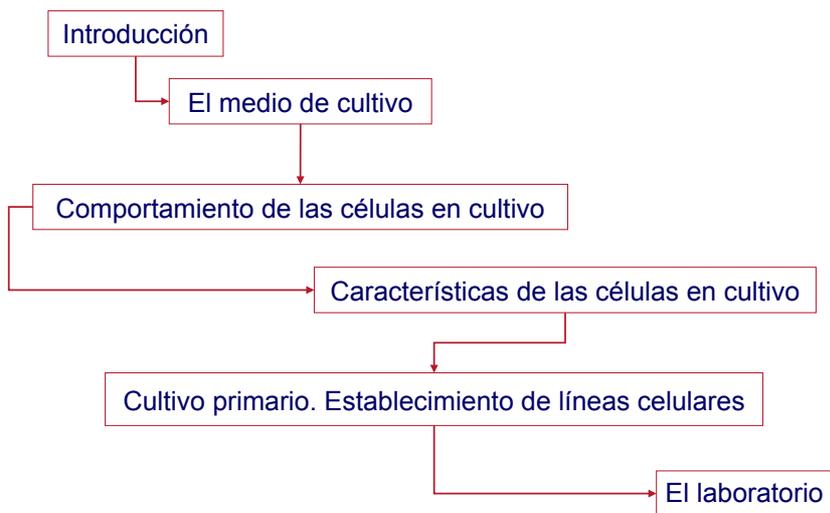


# Cultivos celulares

Mercedes Palmero  
Dpto. Óptica, farmacología, y anatomía  
Área de Farmacología  
F. Ciencias

## Cultivos celulares



# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCION

Rechlinhausen (1866): mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio  
Roux (1885): células de embrión de pollo en solución salina durante días

Harrison (1907): cultivos de tejido nervioso de rana...

1940-1950:

Medios de cultivo

Antibióticos

Tripsina

SFB

Desarrollo, aplicabilidad y mejora de los cultivos celulares  
como herramienta fundamental para la investigación

INTRODUCCION

Comercialización de esta tecnología → Auge importante de los cultivos celulares

\* 1960-1970

- Plástico desechable
- Sistema de filtración
- Medios de cultivo: líquido y polvo
- Cabinas de flujo laminar

1<sup>er</sup> objetivo → Estudio de las células →

Cómo crecen  
Qué necesitan para crecer  
Cómo/Cuando dejan de crecer

**BIOLOGIA DEL DESARROLLO  
Y DIFERENCIACIÓN CELULAR**

INTRODUCCION

- Diferencias entre células *in vivo* e *in vitro*
  - Pérdida de la geometría tridimensional
  - Pérdida de interacciones celulares específicas
  - Pérdida de la regulación homeostática por el Sistema Nervioso y Endocrino
  - Metabolismo energético → glicólisis

➡ Actualidad → Herramienta de trabajo fundamental

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ventajas <i>in vitro</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Control del medio</li> <li>– Caracterización y homogeneidad de las muestras</li> <li>– Económico</li> <li>– Motivaciones éticas</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Desventajas <i>in vitro</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Esterilidad estricta</li> <li>– Cantidad y costo</li> <li>– Inestabilidad</li> <li>– Validación del modelo <i>in vitro</i></li> </ul> </li> </ul>
--	--

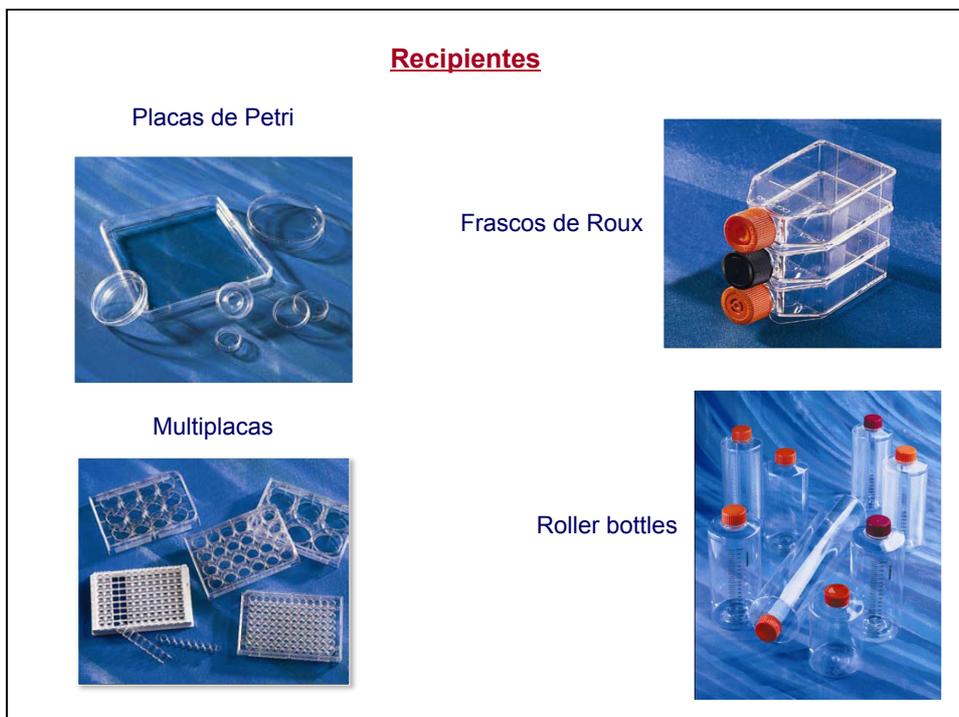
## EL MEDIO DE CULTIVO

Medio de cultivo = Medio artificial

1. Mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas
2. En instrumentos que mantienen las condiciones físico químicas adecuadas
3. Sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior

1ª Limitación para establecer un CC → Medio nutritivo adecuado

- ▶ Sustrato
- ▶ Condiciones fisiológicas y físico químicas
- ▶ Naturaleza y composición de la fase gaseosa
- ▶ Condiciones de incubación



**La fase gaseosa**

Oxígeno

Dioxido de carbono



**Propiedades físicas**

**pH** optimo 7.2-7.5 → indicador **Rojo Fenol** (pH 7.4)

**Osmolaridad:** medios ligeramente hipotónicos

**Temperatura** → 35-37°C → influye en la tasa de crecimiento celular

**Viscosidad** → protección daño celular

**Tensión superficial** → ↓ para evitar desnaturalización de proteínas  
y riesgo de contaminación

**Condiciones fisiológicas**

Composición del medio = Nutrientes

Aminoácidos (glutamina)  
Vitaminas (grupo B)  
Minerales  
Carbohidratos (glucosa)

→ Adición de factores de crecimiento y hormonas = **SUERO**

- “Problemas”
- Composición
  - Lote
  - Coste
  - Dependencia del suministro

→ Adición de Inhibidores del crecimiento de contaminantes  
= **Aniboticos y/o Antifungicos**

**Para definir un medio de cultivo**

**SUPLEMENTOS:**

1. Soluciones salinas equilibradas (BSS).
2. Aminoácidos (Glm)
3. Vitaminas (Vit B)
4. Glucosa
5. Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular (Pyr, lípidos...)
6. Hormonas y factores de crecimiento (suero).
7. Inhibidores del crecimiento de los contaminantes (antibióticos y antifúngicos).

**Si se reemplaza el Suero**

+ factores de adhesión	+ factores de crecimiento
+ inhibidores de proteasas	+ nutrientes
+ hormonas	+ proteínas y poliamidas

**1. Medio Basal de Eagle (BME).**

Aminoácidos esenciales.

**2. Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM).**

Contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME.

**3. R.P.M.I. 1640.**

Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas.

**4. Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM).**

Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el B.M.E.

**5. Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM).**

Es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, etc

**6. McCoy 5A.** Medio diseñado para el crecimiento de líneas celulares diploides.

**7. Medio L-15 de Leibovitz.** Utilizado para el cultivo de virus.

**8. Medio F-10 de Ham.** Para el crecimiento de líneas celulares humanas.

Debe ser suplementado con proteínas y hormonas. Contiene Fe, Cu, Zn.

**9. Medio F-12 de Ham.** Útil para el crecimiento de líneas celulares con suplementos proteínicos.

**10. Medio 199.** Muy usado para el cultivo de células no diferenciadas y estudio de cromosopatías

## COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

**Dependencia de sustrato**

Adhesión al sustrato para multiplicarse



**Crecimiento en MONOCAPA**

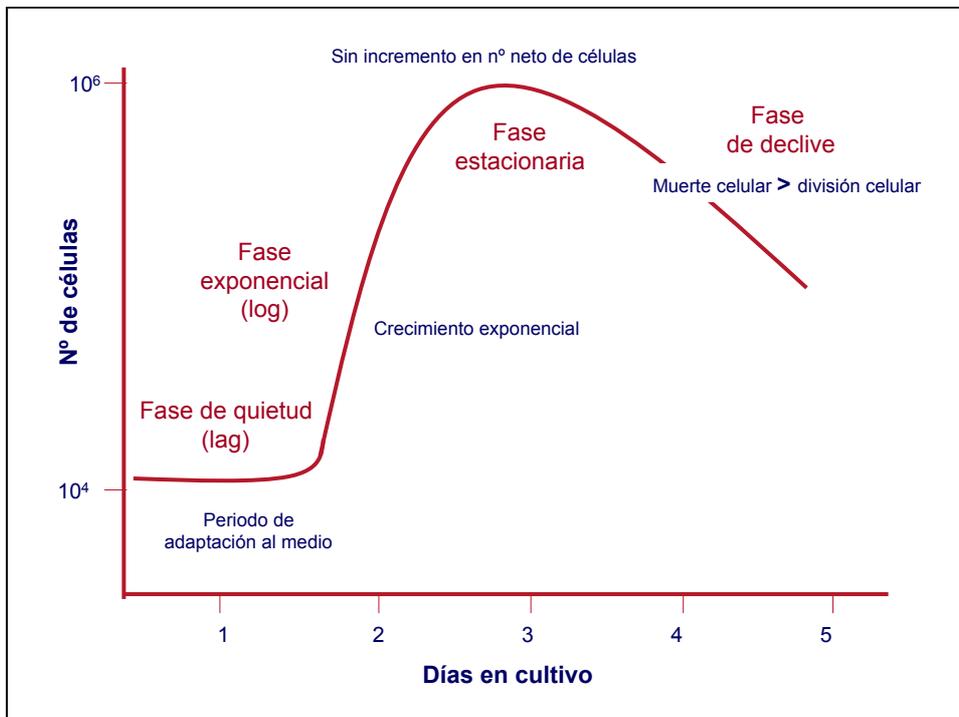
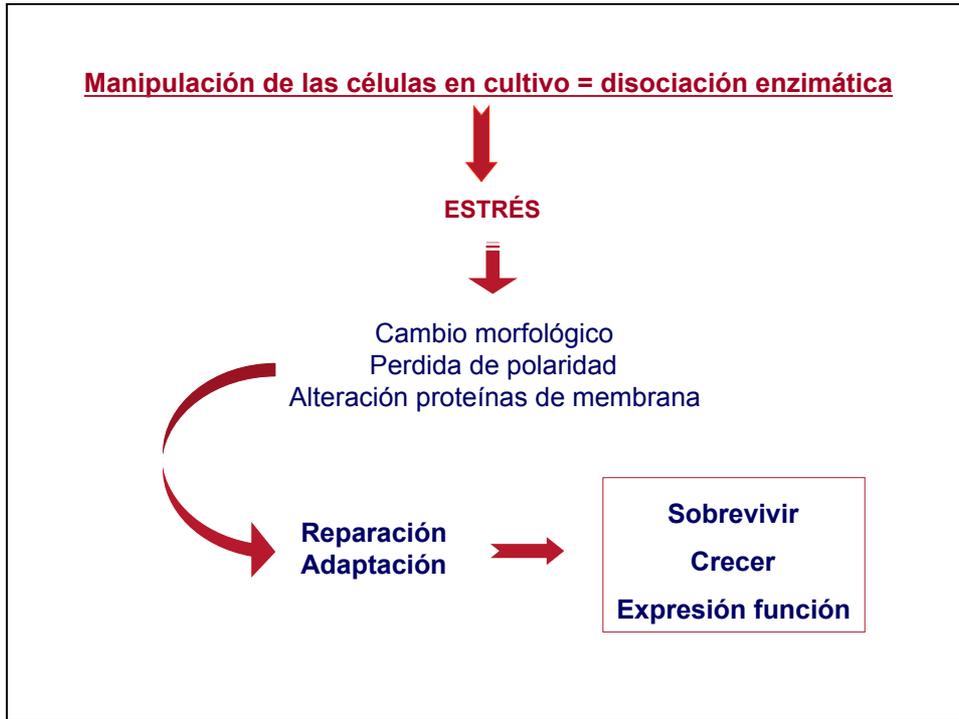


**Confluencia (Inhibición por contacto)**

**Independencia de sustrato**



**Crecimiento en SUSPENSIÓN**



## CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS EN CULTIVO

**CULTIVO CELULAR** Crecimiento de células in vitro,

**CULTIVO PRIMARIO** Cultivo iniciado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo.

**DENSIDAD DE SATURACIÓN** máximo nº de células mantenibles bajo condiciones específicas de cultivo en un recipiente.  
Nº cels/cm<sup>2</sup> . Nº cels/mm<sup>3</sup>

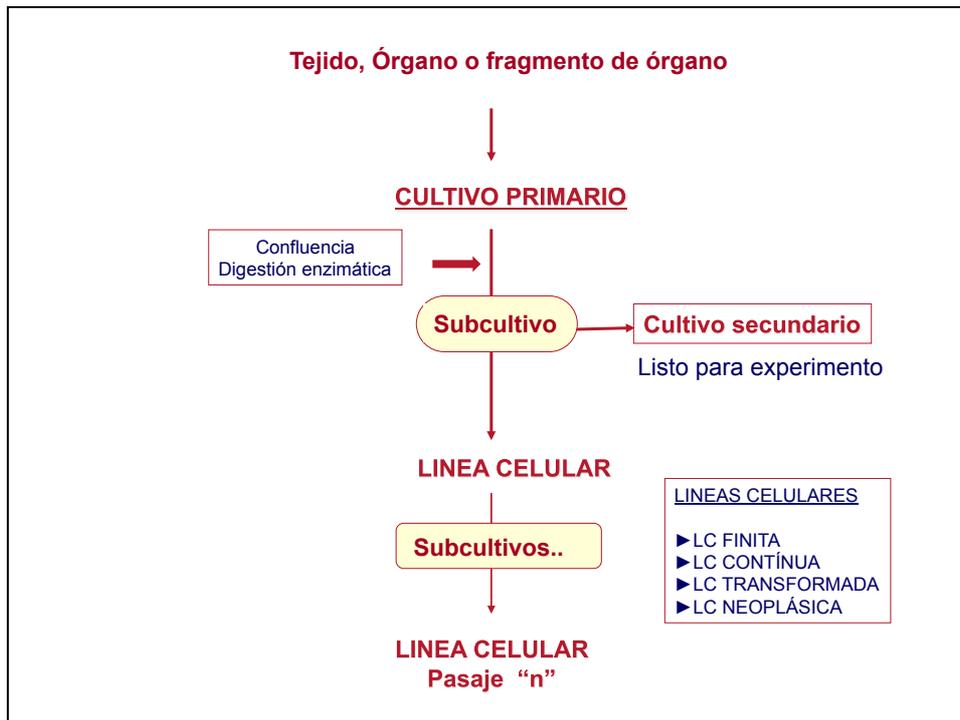
**EFICIENCIA DE SIEMBRA** El % de células sembradas que se adhieren a la superficie del recipiente de cultivo en un tiempo determinado.

**MEDIO QUIMICAMENTE DEFINIDO** Solución nutritiva para el cultivo de células, en el que se conoce de cada componente: su estructura química y los datos analíticos de los posibles contaminantes.

**LINEA CELULAR** Se origina a partir de un cultivo primario en el momento del primer subcultivo exitoso.

**PASAJE (REPLIQUE)** Transferencia o trasplante de células de un recipiente de cultivo a otro. Sinónimo del término subcultivo.

**PASAJE NUMERO (REPLIQUE NUMERO)** El número de veces que las células en cultivo han sido subcultivadas.



### CARACTERÍSTICAS DE LAS CELULAS EN CULTIVO

Dependencia de anclaje

Inhibición por contacto

Limitación de crecimiento por densidad

Mantenimiento cíclico

Requerimientos de suero elevado

Mantienen sus funciones especializadas

Tasa de crecimiento baja (24 a 96 h tiempo de replicación)

Rendimiento en cultivo bajo (<math>10^6</math> células/ml)

# CULTIVO PRIMARIO ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

## 1. Establecimiento de un cultivo primario

### Origen

Biopsia  
Animales grandes (matadero)  
Animales pequeños

- a) Órgano o tejido no patológico o Tumor
- b) Tejido embrionario o adulto
- c) Especie



CONTENEDOR estéril: medio de cultivo + Antibióticos (4°C)

## 2. Aislamiento de las células

a) **Células circulantes** (sanguíneas) → separar las que interesan

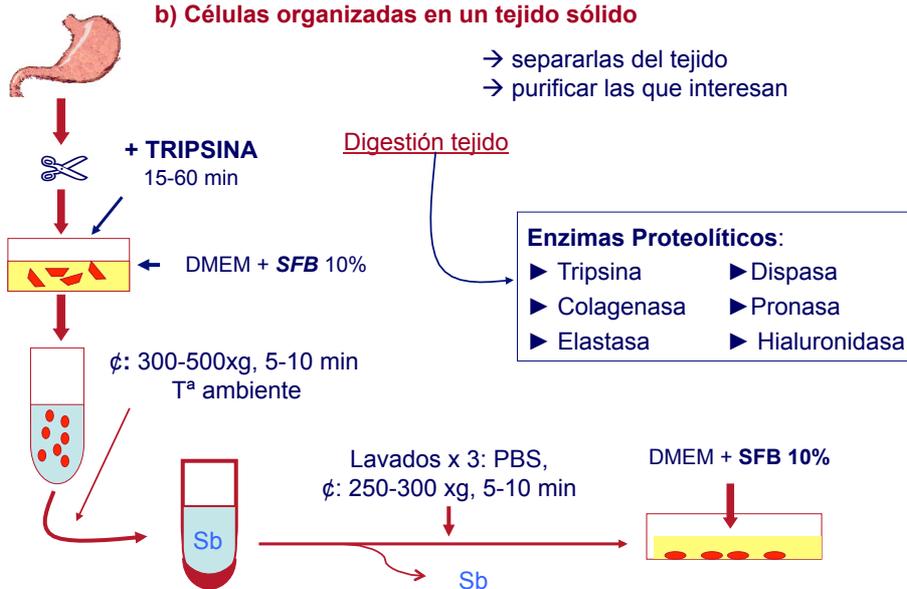
### AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (MNC)

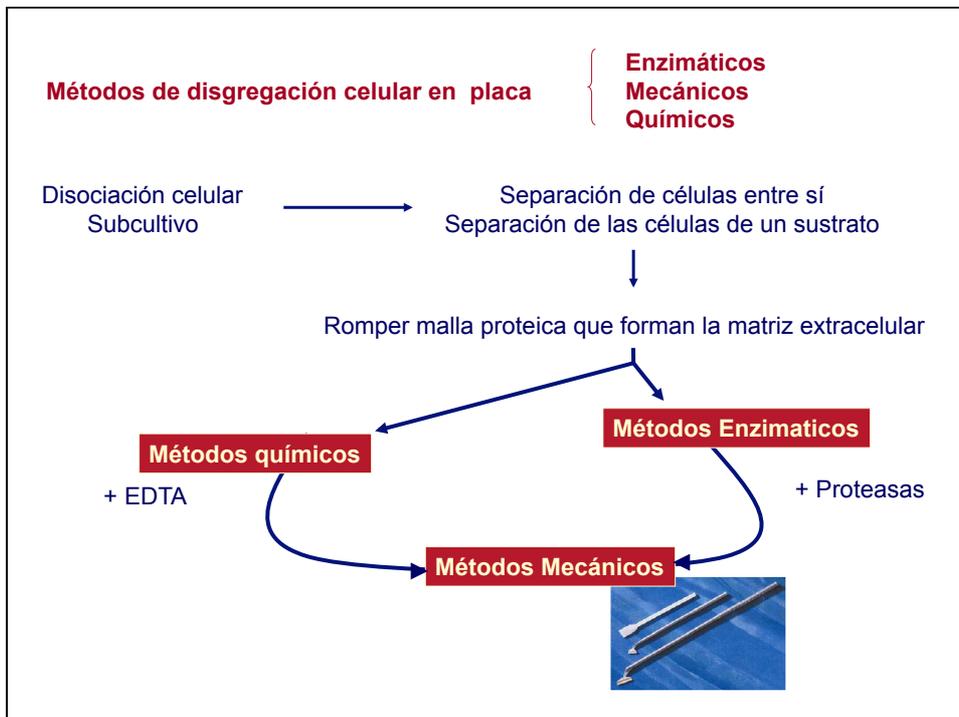
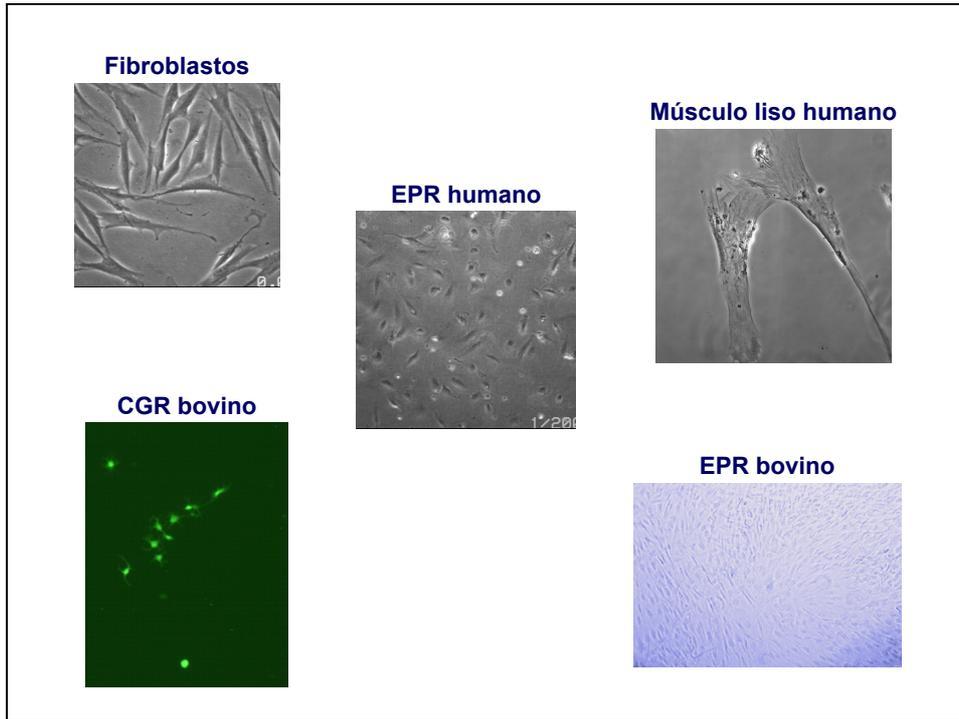
1. Obtención muestra de sangre (jeringa heparinizada)
2. Gradiente (percoll, sacarosa, metrizamida...)
3.  $\phi$ : 400xg, 30 min T<sup>a</sup> ambiente
4. Colectar interfase (b → MNC) → tubo de centrifuga
5. Lavados x 3: PBS,  $\phi$ : 250-300 xg, 5-10 min
6. Resuspender en medio de cultivo + SFB
7. Plantar

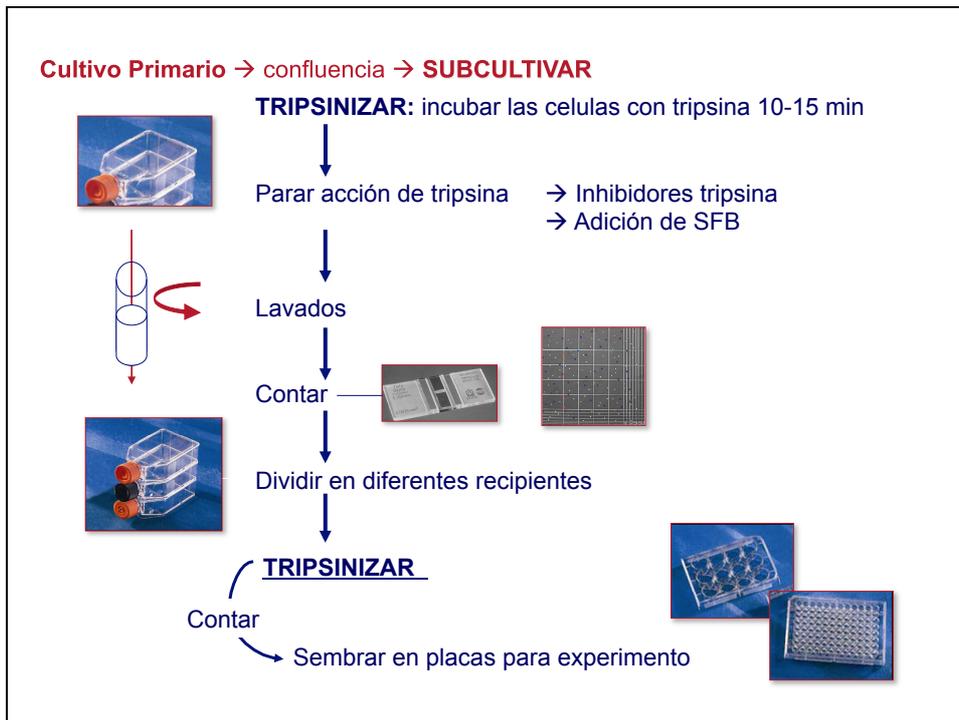


## 3. Digestión enzimática

b) **Células organizadas en un tejido sólido**







## EL LABORATORIO UNIDAD DE CULTIVOS

Tasa de crecimiento de las células en cultivo << contaminaciones habituales

Evitar aparición de microorganismos indeseados



**ASEPSIA**

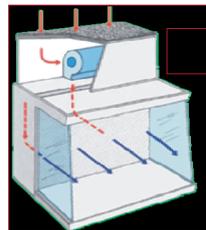
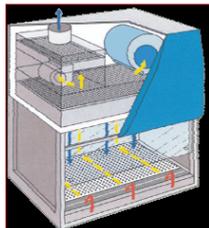
**Área de trabajo**

- Alejada de zona de paso
- Habitación aislado:
  - Aire filtrado:
    - Equipo de filtración
    - Regulador de temperatura

**El laboratorio de cultivos celulares**

- \* Cabinas de flujo laminar
- \* Incubadores
- \* Instrumentos ópticos
- \* Equipo de esterilización
- \* Otros instrumentos

**Cabinas de flujo laminar** → Horizontal  
→ Vertical



**OBJETIVO**

- Protección personal manipulador
- Protección cultivo, experimento..
- Protección del medio ambiente

### Incubadores

#### → Incubador de CO<sub>2</sub>

Mantener Temperatura  
Tensión CO<sub>2</sub> controlada  
Humedad elevada



#### → Incubador Tipo Roller



Incubador o Estufa: rotor de baja velocidad  
Botellas cerradas → No requieren CO<sub>2</sub>

### Equipo de esterilización



#### → Autoclave

Esterilización por calor tanto de sólidos como de líquidos.  
Se realiza a 121°C, 1 atmósfera de sobrepresión  
(t>20 min.)

#### → Equipos de filtración

- Fuente de vacío conectada a un kitasato dotado de una unidad de filtración (esterilizada por autoclavado)
  - Bomba peristáltica que fuerza el flujo de solución a través de una unidad de filtración hermética.
- En ambos casos la esterilización se produce al atravesar la solución un filtro de poro 0.22 µm.

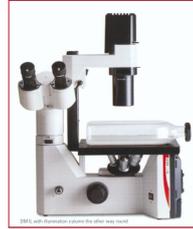


#### → Mechero Bunsen

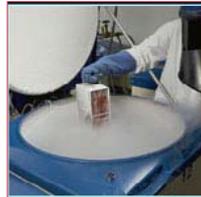


**Instrumentos ópticos**

→ MO de contraste de fases



**Congeladores e instalación de criogenia (depósito de N<sub>2</sub> líquido)**



**Otros instrumentos**

- Contador electrónico de células
- Centrifugas
- Equipo de purificación e agua
- Balanzas
- pHmetro
- Pipeteadores



