



Aspectos básicos sobre el manejo y preservación de los cultivos celulares

Lic. Lysbeth Brito
Departamento de Cultivo Celular
Lysbethbr@ yahoo.com

INTRODUCCIÓN A LOS CULTIVOS CELULARES

- ❖ El cultivo de células y órganos aislados del organismo constituye una vía para resolver problemas biológicos.
- ❖ Las células fuera del organismo no están reguladas por el sistema nervioso ni endocrino, comportándose totalmente independientes.
- ❖ En condiciones nutritivas y ambientales adecuadas se convierten en unidades autónomas, ideales para el estudio de la estructura y comportamiento de las células vivientes.

EVOLUCIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES

- ❖ F.D. Von Recklinhausen (1.866) ➡ mantuvo vivas células sanguíneas de anfibios durante 35 días.
- ❖ Wilhelm Roux (1.885) ➡ realizó cultivos de células de embrión de pollo en solución salina.
- ❖ Ross Harrison (1.907) ➡ cultivó tejido nervioso de rana y obtuvo crecimiento y diferenciación de los axones.
- ❖ Burrows (1.910) ➡ empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo.

EVOLUCIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES

- ❖ Alexis Carrell (1.912) ➡ demostró que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivos aplicando técnicas asépticas.
- ❖ Eagle (1.955) ➡ desarrolló medios de cultivo.
- ❖ Hayflick y Moorhead (1.961) ➡ implementaron el uso de antibióticos.
- ❖ Moscona (1.952) ➡ utilizó técnicas de tripsinización para disociar células.

CONCEPTOS Y DEFINICIONES

Cultivo Celular: Conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

Cultivo de Órganos y Tejidos: Cultivo y/o mantenimiento de órganos, tejidos o parte de ellos *in vitro*, preservando su estructura y/o sus funciones.

Cultivo de Células: Es el crecimiento *in vitro* de células no organizadas en tejidos, incluyendo el cultivo de células individuales.

CONCEPTOS Y DEFINICIONES

Tipos de Cultivos Celulares

- Cultivos Primarios
- Línea Celular

Cultivos Primarios: Cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente del organismo y puestos a crecer en un medio artificial.

CONCEPTOS Y DEFINICIONES

Línea Celular: Cultivo celular que tiene alta capacidad de multiplicarse *in vitro*, establecido a partir del primer subcultivo de un cultivo primario y que tiene las mismas características que el tejido de origen.

o **Línea celular continua:** Línea celular que ha demostrado posibilidades de ser subcultivada *in vitro* por lo menos 70 veces (≥ 70 subcultivos) indefinidamente.

o **Línea celular finita:** Línea celular que tiene un número limitado de posibles subcultivos (alrededor de 50)

CONCEPTOS Y DEFINICIONES

Líneas celulares diploides: El 75% de la población celular tiene igual cariotipo que las células normales de la especie de origen.

Líneas celulares heteroploides: Tienen menos del 75% de las células con cromosomas diploides.

Pasaje o subcultivo: Transplante de células de un envase de cultivo a otro u otros.

Número de subcultivos: Número de veces que las células han sido subcultivadas.

TIPOS DE CRECIMIENTO CELULAR

- **Crecimiento en monocapa.** Las células se adhieren al sustrato, creciendo y dividiéndose en una única capa celular (monocapa). Puede ser:
 - ★ Estacionario: Las células incubadas sin agitación, sedimentan y se adhieren al fondo del envase, usualmente liso.
 - ★ Rotatorio: Envase de cultivo cilíndrico, que gira lentamente de modo que las células se unen a la superficie interna del frasco.
- **Crecimiento en suspensión.** Las células se multiplican en medio líquido sin adherirse a ningún sustrato.

MORFOLOGÍA CELULAR

Células adherentes:

- *Células de tipo fibroblástica:* Morfología irregular o fusiforme.
- *Células de tipo epitelial:* Células de forma poligonal, tienden a agruparse en láminas de células poligonales fuertemente adheridas.

Células no adherentes: Las células suspendidas en el medio son redondas.

VENTAJAS DE LOS CULTIVOS CELULARES

- ❖ Control de factores fisicoquímicos y fisiológicos del medio en el que se cultivan las células.
- ❖ Las células en cultivo asumen una constitución homogénea, evitando el problema inherente a la heterogeneidad de las muestras asociado al uso de animales de experimentación.
- ❖ Economía en ensayos de reactivos o drogas a estudiar.

DESVENTAJAS DE LOS CULTIVOS CELULARES

- ❖ Estrictas condiciones de asepsia.
- ❖ Altos costos para producir una pequeña cantidad de células.
- ❖ Pérdida irreversible de las propiedades funcionales de las células.
- ❖ Dificultad en relacionar células cultivadas con las células funcionales del tejido original.
- ❖ Problemas de inestabilidad genética cuando se realizan varios pases.
- ❖ Validez del modelo *in vitro*.

LOS CULTIVOS CELULARES Y SU MEDIO AMBIENTE

Factores:

- ✓ La naturaleza del sustrato
- ✓ Las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas del medio de cultivo
- ✓ La naturaleza y composición de la fase gaseosa
- ✓ La temperatura de incubación

Naturaleza del sustrato

Capacidad de las células para adherirse al sustrato depende de las propiedades físicas del envase.

Tipos de sustrato

- a. **Vidrio.** Bajo costo, fácil limpieza y esterilización.
- b. **Plástico desechable.** Material descartable y estéril por irradiación.
- c. **Microsoportes.** Soportes plásticos esféricos a los que se unen las células.

Condiciones fisicoquímicas y fisiológicas del medio de cultivo

- pH
- Osmolaridad
- Sales inorgánicas (mantienen el medio isotónico)
- Glucosa (fuente de energía)
- Aminoácidos (balance de nitrógeno, precursores de la síntesis de proteínas)
- Vitaminas (cofactores)

Condiciones fisicoquímicas y fisiológicas del medio de cultivo

- Suero (biosíntesis celular, promueve el crecimiento, estimula la síntesis de ADN, ARN y proteínas, y facilita la adhesión al sustrato por medio de las globulinas).
- Antibióticos: (evita el desarrollo de contaminantes microbianos en el cultivo).
- Agua (deionizada, destilada y esterilizada).

Naturaleza y composición de la fase gaseosa

La supervivencia de las células depende de la presencia de oxígeno y dióxido de carbono disueltos en el medio de cultivo.

Oxígeno: El área de superficie del medio debe ser bastante grande para facilitar una absorción adecuada de oxígeno.

Dióxido de carbono: Influye en la cantidad de CO_2 disueltos, mantiene el pH y la cantidad de iones bicarbonato.

Temperatura de Incubación

- ✓ Temperaturas por encima de la temperatura óptima de crecimiento destruyen a las células.
- ✓ Temperaturas por debajo de la temperatura óptima son toleradas por las células.
- ✓ La temperatura óptima para el crecimiento celular depende del tejido u órgano animal de origen.

Tejidos de aves y mamíferos: 36°-38°C

Tejidos de anfibios, peces, insectos y reptiles: 20°-36°C

CONTROL DE LOS MEDIOS

- ◆ Medición del pH y osmolaridad
- ◆ Control de esterilidad
- ◆ Control del crecimiento y citotoxicidad
- ◆ Conservación de los medios

Control de esterilidad

Procedimientos controlados y estandarizados que detecten posibles contaminantes: bacterias aerobias y anaerobias, levaduras, hongos y micoplasmas.

Medios de cultivo más utilizados:

***Caldos:** thioglicolato, infusión cerebro-corazón, triptosa fosfato, tripticasa de soya, maltosado Sabouraud.

***Agares:** nutritivo, sangre, Sabouraud glucosado.

Control de esterilidad

- ❖ Se inoculan los medios con muestras (medios de cultivo u otras soluciones) y se incuban a 37°C y temperatura ambiente, durante un período no menor de 10 días.
- ❖ Para grandes cantidades de medio, la muestra es de un 10%.
- ❖ Se efectúan pruebas confirmatorias, incluyendo una coloración Gram para determinar retrospectivamente la fuente de contaminación.

Control del crecimiento y citotoxicidad

- ★ Sueros, medios de cultivo y soluciones deben ser evaluados.
- ★ Para evidenciar citotoxicidad, deficiencias en el crecimiento o características morfológicas no usuales.
- ★ Se utiliza como control un lote de medio evaluado con anterioridad.

Conservación de los medios

- Los medios son almacenados a bajas temperaturas (4-8°C).
- Soluciones que favorezcan el crecimiento bacteriano deben almacenarse estériles.
- Evitar o acortar la exposición de los medios a la acción de la luz.

LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

- ❖ Área limpia destinada al trabajo con cultivos celulares.
- ❖ Área de preparación y esterilización de medios de cultivo, reactivos y soluciones.
- ❖ Área de lavado y preparación de material.

Áreas de producción de cultivos celulares y preparación de medios

- Ambiente controlado de presión, temperatura, humedad relativa y partículas en el ambiente.
- Sin corrientes de aire, con un flujo unidireccional de aire filtrado (filtros HEPA).
- Presión atmosférica positiva (entre 15 y 20 mm de Hg).

Áreas de producción de cultivos celulares y preparación de medios

- Desinfecciones periódicas con limpiezas profundas, además de desinfecciones diarias con luz uv.
- Equipos y materiales utilizados sólo para cultivo celular.
- Uso de cabinas de seguridad biológica.

Área de lavado y preparación de material

- ◆ Lavado y embalaje del material de vidrio y plástico para ser esterilizado y posteriormente utilizado en el cultivo de las líneas celulares.
- ◆ El material debe ser puesto en agua inmediatamente después de su uso, se lava con detergente especial para cultivo celular y se enjuaga con agua destilada y bidestilada.

Equipos que debe tener un laboratorio de cultivo celular

Cabinas de flujo laminar

Centrífugas refrigeradas

Microscopios o lupas invertidas

Estufas con y sin CO₂

pHmetro

Pipeteadores

Equipos de purificación de agua

Tanques de N₂ líquido y congeladores

Baños de María

Agitadores magnéticos

Equipos de esterilización: hornos, autoclaves

Equipos de filtración

Neveras

Normas de Bioseguridad

- a. Utilizar batas o uniformes apropiados. Para ciertas actividades utilizar guantes, tapabocas, gorros y cubrezapatos.
- b. Usar calzado cerrado.
- c. Los uniformes y batas contaminadas se deben colocar en recipientes identificados, para proceder a su esterilización.
- d. Proteger los ojos y la cara de salpicaduras con lentes de seguridad u otros dispositivos de protección.

Normas de Bioseguridad

- e. Lavarse las manos antes y después de haber manipulado materiales y animales infecciosos, al abandonar el laboratorio y cuantas veces sea necesario.
- f. No tocarse partes del cuerpo como cara, ojos, boca, mientras se está manipulando material biológico.
- g. No pipetear con la boca. Emplear las pipetas automáticas o propipetas.
- h. No se permite comer, beber, fumar, guardar alimentos, ni aplicar cosméticos en el laboratorio.

CRIOPRESERVACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

1. Evitar continuos subcultivos de una línea celular que no es de uso rutinario, reduciendo tiempo y esfuerzo.
2. Mantener un “stock” de células, en previsión de pérdida accidental de un cultivo.
3. Tener células de referencia contra las cuales controlar mutaciones, sensibilidad a virus etc., de las células en uso.
4. Mantener un “pool” de células diploides con bajo nivel de pase.

CRIOPRESERVACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Banco Celular: Colección de envases que contienen material celular de composición uniforme, almacenada en condiciones definidas, donde cada envase contiene una alícuota de un pool de células.

Semilla Celular: Cantidad de células bien caracterizadas de humanos, animales u otro origen, almacenadas por congelación a -100°C o menos en alícuotas de composición uniforme, derivada de un tejido único o células.

CRIOPRESERVACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Banco Celular Maestro: Cantidad de células de origen humano, animal u otro tejido, caracterizadas y almacenadas por congelación a -100°C o menos, en alícuotas de composición uniforme derivadas de una semilla celular.

Banco Celular de Trabajo: Cantidad de células de composición uniforme derivada de un Banco Maestro con un número de pase finito, dispensado en alícuotas en envases individuales almacenados y congelados a -100°C o menos.

CONGELACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

- * Las células
- * El medio de conservación
- * El procedimiento de congelación
- * Las condiciones de almacenamiento
- * El proceso de descongelación

Preparación de las células

❖ Tomar en cuenta:

- Tipo de célula
- Condiciones de crecimiento
- Estado fisiológico de las células
- Cantidad de células presentes en la suspensión celular

❖ Efectuar pruebas de esterilidad que detecten bacterias, hongos, levaduras y micoplasmas.

Preparación de las células

- ❖ Reducir el número de pases a partir de la muestra original certificada.
- ❖ Ajustar las poblaciones de células animales a concentraciones que garanticen recuperar una muestra representativa de la población.

Medio de conservación

- Medio de crecimiento con 2 veces la concentración normal de suero + glicerina y/o DMSO al 5-10%.
- El agente crioprotector debe ser diluido previamente a la concentración deseada en el medio de crecimiento para minimizar los efectos nocivos.

Procedimiento de congelación

- ❖ Al tripsinizar las células, se resuspenden en el medio de congelación.
- ❖ La suspensión celular se distribuye en ampollas, frascos y/o viales plásticos o crioviales.
- ❖ La congelación debe ser lenta para evitar la formación de cristales que rompan las células



Disminuir 1°C por minuto hasta llegar a -20°C o 25°C y luego congelando rápidamente hasta -70°C o temperaturas inferiores

Condiciones de almacenamiento

Condiciones de almacenamiento

Sobrevivencia

❖ Nitrógeno

Líquido -196°C

Gas -150° a -180°C



Años

❖ Congelador

-70° a -80°C

6 meses a 1-2 años

-45° a -65°C

6 meses a 1 año

Proceso de descongelación

- ✓ La descongelación debe ser rápida (agitar en baño de María a 37°C).
- ✓ Limpiar los envases con alcohol al 70%.
- ✓ Resuspender las células en el medio de crecimiento con una jeringa o con una pipeta Pasteur.
- La descongelación se realiza cada cierto número de pases para evitar cambios morfológicos, pérdida de susceptibilidad viral y pérdida de las células por contaminarse.

CONGELACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

- ❖ Selección de los cultivos en la fase logarítmica activa
- ❖ Congelación lenta
- ❖ Uso de D.M.S.O o glicerina al 5% o 10%
- ❖ Medio de congelación conteniendo suero
- ❖ Temperatura ultra baja
- ❖ Descongelación rápida

CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES

- 1) Correlación con el tejido de origen para:
 - a. identificar el linaje al que la célula pertenece
 - b. determinar la posición de las células dentro de ese linaje
 - c. si son células transformadas o no
- 2) Monitoreo de inestabilidad genética y variación fenotípica.
- 3) Verificación de contaminación cruzada y confirmación de las especies de origen.
- 4) Identificación de líneas celulares específicas dentro de un grupo del mismo origen.

CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES



CONTAMINACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Los agentes más usuales de contaminar los cultivos celulares son:

- ❖ Bacterias
- ❖ Hongos y levaduras
- ❖ Micoplasmas
- ❖ Virus
- ❖ Protozoarios
- ❖ Contaminación cruzada

Fuentes de Contaminación

- Tejidos y células contaminadas
- Medios de cultivo
- Personal de laboratorio
- Equipos y cristalería
- Medio ambiente

Se pueden controlar con:

- ✓ Empleo de procedimientos efectivos, estandarizados y eficaces para prevenir, detectar y eliminar las posibilidades de contaminación.
- ✓ Mantener una vigilancia continua para verificar el manejo adecuado de los cultivos celulares.

Características de la Contaminación

1. Cambios bruscos de pH
2. Turbidez del medio
3. Se observan gránulos en los espacios intercelulares de la monocapa y en el sobrenadante.
4. Contaminación bacteriana se observa uniforme y abundante.

DetECCIÓN DE LOS CONTAMINANTES

❖ No existe un medio único que permita el crecimiento de todos los contaminantes.

Se requiere de una combinación de técnicas:

- Observación del cultivo a simple vista o a través del microscopio.
- Uso de múltiples medios de cultivo para la siembra de muestras.
- Empleo de procedimientos que aumenten el desarrollo de los microorganismos contaminantes.
- Identificación por técnicas especiales.

Micoplasmas

Células procariotas que miden entre $0.2\mu\text{m}$ a $0.5\mu\text{m}$ de diámetro, pleomórficas y carentes de pared celular.

Pueden estar presentes en:

- ✿ Suero bovino
- ✿ Tripsina
- ✿ Operador
- ✿ Líneas celulares

Pueden producir:

- Interferencia con la tasa de crecimiento celular.
- Inducción de alteraciones morfológicas.
- Alteraciones del metabolismo celular y funciones bioquímicas.
- Inhibición o incremento de la tasa de multiplicación viral.

Métodos de Detección de Micoplasmas en Cultivos Celulares

Métodos de cultivo microbiológicos:

- Siembra previa de la muestra en medio líquido y posteriormente pase en medio agar.
- Siembra directa en agar.
- Siembra en medios semisólidos.
- Adición de “agar–overlay” sobre la monocapa celular.
- Inoculación de grandes volúmenes de muestra en medio líquido.

Métodos de Detección de Mycoplasmas en Cultivos Celulares

Métodos indirectos

- ★ Métodos morfológicos e histoquímicos
- ★ Métodos inmunológicos
- ★ Métodos bioquímicos
 - Ensayos enzimáticos
 - Métodos autorradiográficos
 - Empleo de sondas genéticas (hibridización del ADN)
 - Determinación del tamaño del genoma.

Normas de Prevención y Control de Contaminantes

1. Adquirir líneas celulares de fuentes que garanticen que están libres de contaminación.
2. Evaluar periódicamente todos los cultivos que se llevan en el laboratorio.
3. Prohibir el uso de la boca en el pipeteo, emplear sólo dispositivos especiales.
4. Equipar un área separada para el manejo de líneas celulares de dudosa procedencia.

Normas de Prevención y Control de Contaminantes

5. Desinfectar la superficie de trabajo cada vez que se manipule un cultivo diferente.
6. Almacenar pases bajos de células, una vez que se compruebe que no están contaminadas
7. Realizar controles de calidad para detectar contaminaciones en sueros, agua destilada y medios de cultivo.
8. Evaluar periódicamente la efectividad en el funcionamiento de hornos y autoclaves.

Normas de Prevención y Control de Contaminantes

9. Reforzar la limpieza y desinfección del área de trabajo.
10. Utilizar técnicas de asepsia durante el manejo de los cultivos celulares.
11. Educar al personal y hacer revisiones periódicas de las técnicas de asepsia.



Departamento de Cultivo Celular

- Elaborar vacunas antirrábicas de uso veterinario, donde se utiliza la línea celular BHK-21.
- Realizar el Diagnóstico de enfermedades infectocontagiosas.
- Apoyar Programas de investigación.



Departamento de Cultivo Celular

Controlar productos biológicos donde se utilizan las líneas celulares:

Hep-2C	→	V. Antipoliomelítica
RK-13	→	V. Rubeola
VERO	→	V. Sarampión/parotiditis
Ma-104	→	V. Rotavirus



GRACIAS!