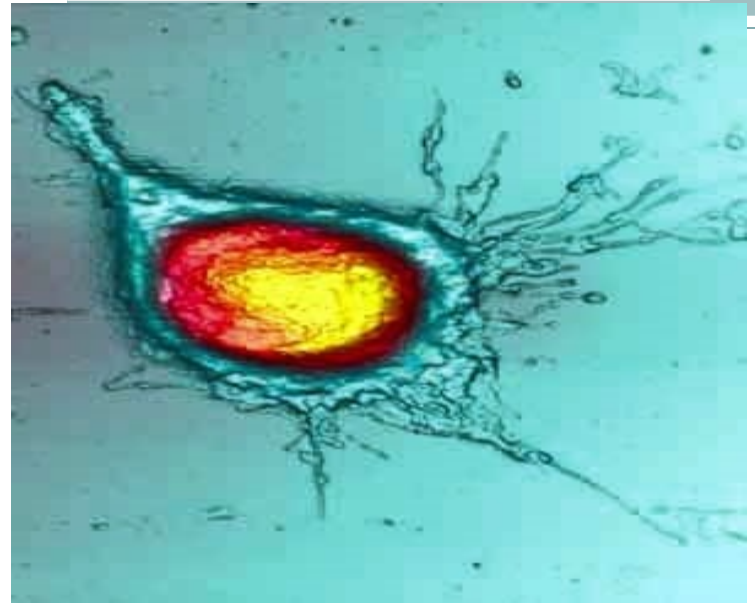


# INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR



*Cultivo celular*: Es un modelo de estudio *in vitro* constituido por células que pueden crecer y mantenerse en suspensión o en monocapa por más de 24 horas en condiciones controladas.

# Cultivo celular: Obtención

- Los cultivos celulares pueden ser obtenidos a partir de explantes de biopsias (fragmento escindido desde un órgano o tejido), por perfusión de un órgano específico, por disgregación de tejidos o a partir de fluidos orgánicos como la sangre.

# Cultivo celular

- Existen dos categorías de cultivo celular:

*Cultivo Primario*

*Línea Celular*

# Diferencias entre Cultivos Primarios y Cultivo de Líneas celulares

<b>Cultivos Primarios</b>	<b>Líneas Celulares</b>
Se obtienen de un animal recién sacrificado	Proviene de un Cultivo Primario que ha sido sometido a procesos que le conferirán capacidad ilimitada de multiplicación o tienen origen tumoral
100% cariotipo original	Aneuploides
Formado por células indiferenciadas que se diferenciarán de forma similar al tejido que le dió origen	Están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron
Su duración es aprox. 7 días	Proliferan de forma ilimitada
1 sólo pasaje	Varios pasajes

# Obtención y establecimiento de Líneas celulares

- Una línea celular queda establecida cuando se demuestra su potencialidad de replicarse indefinidamente.
- Las líneas celulares poseen propiedades conferidas por diferencias en la dotación cromosómica (aneuploidía) mutación o transformación genética que deben persistir entre sucesivos pasajes o subcultivos.
- Las líneas o cepas celulares con alguna característica puntual pueden ser seleccionadas específicamente mediante clonación.

# Cultivo celular ¿qué necesitamos?

- 1- Formación de personal
- 2- Dinero
- 3- Instalaciones adecuadas
- 4- Estudio de las células a utilizar
- 5- Preparación de material y medios
- 6- Obtención de tejidos
- 7- Realización del cultivo
- 8- Caracterización del cultivo (crecimiento, forma)
- 9- Implante y congelación

# Uso de los cultivos

- 1- Estudio virológicos
- 2- Producción de vacunas
- 3- Ingeniería de proteínas
- 4- Estudios de interacción/señalización celular
- 5- Producción para transplantes
- 6- Reproducción “in vitro” de plantas de interés comercial
- 7- **Ensayo de nuevos medicamentos**
- 8- Estudio de toxinas



# Uso de los cultivos

## **VENTAJAS:**

- 1-Control del entorno y caracterización**
- 2-Economía**
- 3-Motivaciones éticas**

## **DESVENTAJAS:**

- 1-Personal preparado**
- 2-Desdiferenciación celular**
- 3-Variabilidad genética**

**TÉCNICA SENSIBLE  
(CONTAMINACIONES)**

# Dificultades en la implantación de cultivos en un organismo vivo

- **Proliferación**
- **Diferenciarse en los tipos celulares deseados**
- **Sobrevivir en el receptor tras el implante**
- **Integrarse en el tejido circundante**
- **Funcionar apropiadamente durante toda la vida del receptor**
- **No producir daño al receptor**

# LABORATORIO NECESARIO PARA TRABAJAR CON CULTIVOS CELULARES



# UNIDAD DE CULTIVOS

- Es un centro altamente especializado; por ello han de cumplirse ciertos requerimientos:

**-FISICOS**

**-ORGANIZACIÓN**

**-MATERIAL**



# REQUERIMIENTOS FISICOS

- Acceso restringido a la unidad de cultivos
- Separación física
- Adecuado al trabajo a desarrollar
- Fácil acceso a otras zonas
- Cumplimiento con la legislación vigente



# REQUERIMIENTOS DE ORGANIZACIÓN

**Personal:** altamente especializado y en continuo reciclaje.

**Protocolos:** todos los protocolos deben estar accesibles y redactados de una manera que cualquier persona pueda entenderlos fácilmente.

# REQUERIMIENTOS DE ORGANIZACIÓN

## LIMPIEZA:

- Condiciones de extrema limpieza
- Protocolos de limpieza de suelos, paredes y área
- Cambio periódico de productos
- Material propio de limpieza en exclusividad



# REQUERIMIENTOS ORGANIZACIÓN

## PREPARACIÓN DE MEDIOS

- Tomar nota de los proveedores, medios, lotes, caducidades, fechas, recepción,.....de todos los productos
- Emplear medios lo más recientes posibles
- Controlar todos los pasos
- Rotular todo convenientemente





# REQUERIMIENTOS DE MATERIAL

## CAMPANA DE FLUJO LAMINAR:



- De flujo vertical
- De flujo horizontal
- De doble flujo
- Lámpara UV

# REQUERIMIENTOS DE MATERIAL

## INCUBADOR DE CO<sub>2</sub>:

mantenimiento de la temperatura controlada en una atmósfera con un porcentaje controlado de CO<sub>2</sub> y una humedad elevada.

- Bombonas de CO<sub>2</sub>
- Circuito general
- Bandeja de agua (Fuente de contaminación)
- Sistemas de inyección de agua estéril
- Recircularización de aire
- Filtros HEPA



# REQUERIMIENTOS DE MATERIAL

## BAÑOS TERMOSTATIZADOS:

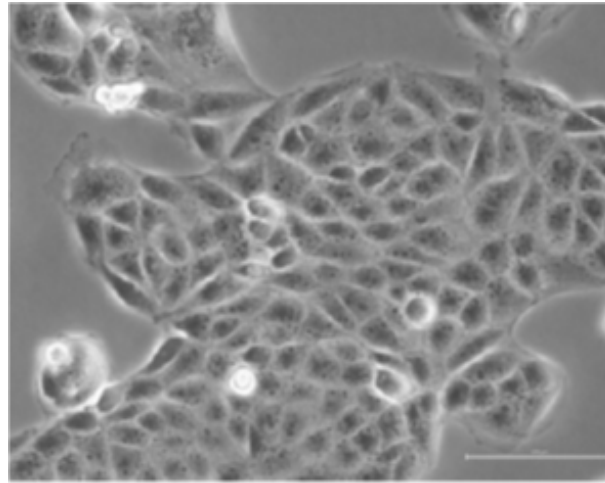
todos los medios de cultivo y líquidos que entren en contacto con las células deberán estar atemperados a la temperatura óptima de crecimiento de las células.



# REQUERIMIENTOS DE MATERIAL

**INSTRUMENTOS ÓPTICOS DE OBSERVACIÓN;  
MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES  
INVERTIDO:**

el control morfológico del cultivo se realiza mediante el uso de un microscopio.



# REQUERIMIENTOS DE MATERIAL

## CENTRÍFUGAS:

harán falta para poder formar un pellet de células en el fondo del tubo y poder eliminar el sobrenadante y resuspender las células en el medio deseado



# REQUERIMIENTOS DE MATERIAL

## OTROS INSTRUMENTOS :

contadores de células electrónicos ("cell counter"), equipos de purificación de agua, balanzas, pH-metro, pipeteadores automáticos, micropipetas...

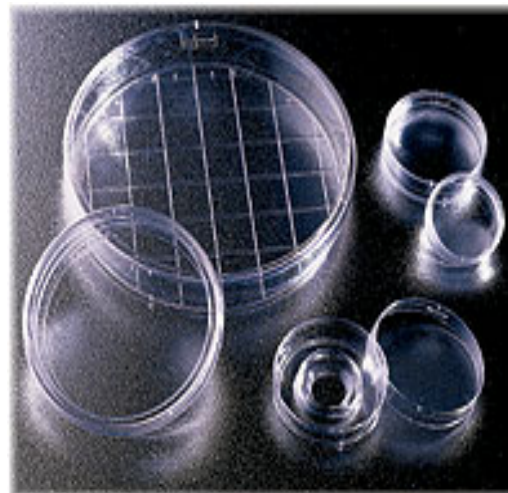
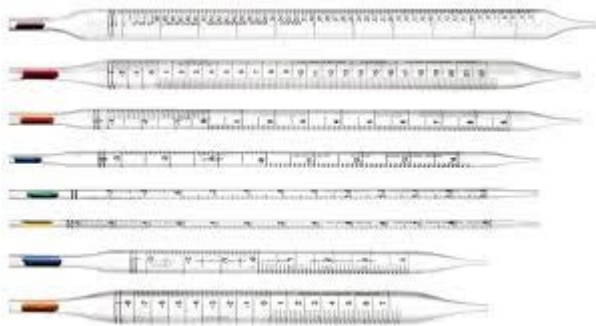




# REQUERIMIENTOS DE MATERIAL

## MATERIAL FUNGIBLE:

frascos de cultivo, placas, pipetas de cristal, tubos falcon, tubos eppendorf...



# REQUERIMIENTOS DE MATERIAL

## ALMACENAMIENTO:

- Frío eléctrico (4°C, -20°C, -80°C)
- Nitrógeno Líquido
- Liofilización/Deshidratación





# REQUERIMIENTOS DE MATERIAL

## ESTERILIZACIÓN

- Con maquinaria apropiada y homologada
- Con protocolos actualizados
- Con personal especializado



AUTOCLAVES  
Y OLLAS

# RUTINAS EN CULTIVOS CELULARES: BUENOS HÁBITOS



# Rutinas en cultivos

**LA EXPERIENCIA  
ES  
FUNDAMENTAL**

# Rutinas en cultivos

- **APRENDER SOBRE EL CULTIVO EN CONCRETO:**

**Morfología y ciclo celular**

**Forma y tiempos de digestión**

**Densidad de siembra**

**Selección de medios a emplear: suero**

**Cuando hacer y cambiar medios**

# Rutinas en cultivos

- **DE LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR**

- 1-Luz ultravioleta siempre que no se trabaje.
- 2-Encender la campana al menos 10 min antes de comenzar el trabajo.
- 3-Limpieza de zona de trabajo con etanol 70% al inicio y al final.
- 4-Esterilizar todo lo que entre dentro de la campana y rociar con etanol 70% por el exterior

# Rutinas en cultivos

- **DE LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR**

5-Habilitar espacio suficiente para trabajar.

6-Dominar el campo de trabajo.

7- No pasar por encima de placas, botellas o recipientes abiertos.

8- Poner tapones boca arriba y hacia la parte trasera de la campana para evitar pasar por encima de ellos.

# Rutinas en cultivos

- **DE LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR**

9- No tocar con las pipetas ni puntas estériles ninguna superficie.

10- Utilizar una pipeta o una punta cada vez.

11- Tener cuidado de que no se produzcan contaminaciones cruzadas.

# Rutinas en cultivos

## **DEL CULTIVO CELULAR**

- 1-No mezclar nunca dos cultivos diferentes.
- 2-No tener mucho tiempo fuera de estufa los cultivos.
- 3-No invadir campos.
- 4-Tapar rápidamente los frascos.
- 5-Agitación del cultivo sembrado de dcha/izq y de arriba/abajo. Nunca agitar en círculo.



# Rutinas en cultivos

- **Manipulación de las células en cultivo**

Las células están en continua **división** durante el cultivo, crecen hasta ocupar todo el **área** disponible. Esto puede generar varios problemas:

- Agotamiento de los **nutrientes del medio**
- Acumulación de células **apoptóticas** o **necróticas**
- Inhibición de la división celular por contacto

# Rutinas en cultivos

- **Cambios de medio**

El objetivo de los cambios de medio es renovar los nutrientes y evitar la acumulación de productos metabólicos potencialmente tóxicos y de células muertas.

- Cultivos en suspensión (centrifugación)
- Cultivos adherentes (aspiración)

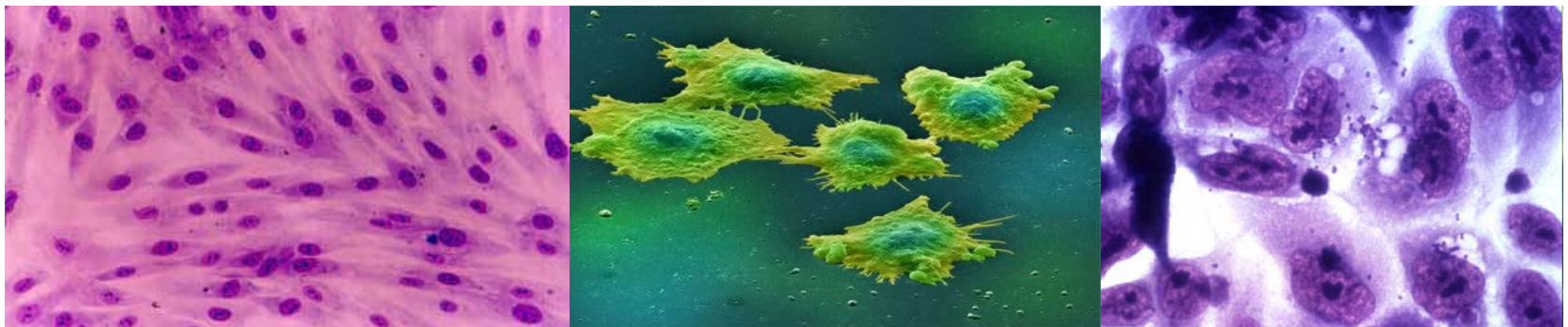


# Rutinas en cultivos

- **Pase de las células**

Transferir un pequeño número de células a un nuevo continente. Las células pueden cultivarse más tiempo si se pasan regularmente, ya que así se evita la senescencia asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular.

- Cultivos en suspensión (tomar unas pocas y resuspender en medio fresco)
- Cultivos adherentes (despegar y pasar)



# Rutinas en cultivos

## **DEL MATERIAL, MEDIOS Y OTROS**

1-Controles periódicos

2-El fungible de un único uso

3-Ante la duda desecharlo

4-Que sea fresco

# Rutinas en cultivos

## **DEL MATERIAL, MEDIOS Y OTROS**

5-Atemperarlo antes de trabajar con él

6-No emplear nunca el medio/producto sobrante

7-Desechos a contenedores específicos

8-Registrar todo por marcas/lotos/caducidades

# Rutinas en cultivos

## **DEL MATERIAL, MEDIOS Y OTROS**

- 9-Alicuotar todos los productos por “medidas a usar”
- 10-Usar cada tanda de trabajo una alícuota
- 11-No usar material caducado
- 12-Trabajar con productos con certificados de calidad
- 13-No quedarse sin material por parte del suministrador

MUCHAS GRACIAS

