

INGENIERÍA BIOMÉDICA
Semestre IX
ELECTIVA EN INGENIERÍA II

SESIÓN #7 (Marzo 19 de 2024)

1. Llamado a lista.
2. Tarea individual #2: Técnica Aséptica.
3. Asignación temas de exposiciones grupales
4. Proyecto Integrador: aspectos generales, inquietudes, dudas.
5. Desarrollo de los temas de la Sesión #7:
 - Biología de los cultivos celulares.
 - Recipientes de cultivo y sustratos.
 - Medios y Suplementos.
 - Cultivos Primarios.

BIOLOGÍA DE LOS CULTIVOS CELULARES

Cultivo Celular → propagación de células fuera del organismo de origen.

Utilidad/Ventajas →

- a) Fácil manipulación bajo condiciones controladas.
- b) Alternativa al uso de animales.
- c) Permite trabajar en pequeña, mediana y gran escala.
- d) Las células pueden mantenerse congeladas por largos períodos de tiempo con mínima pérdida de viabilidad.
- e) Menor variabilidad debido a que se tiene un cultivo de un linaje celular definido.
- f) Se cuenta con acceso fácil a múltiples líneas celulares en bancos internacionales.

EL MEDIO AMBIENTE DEL CULTIVO

En ocasiones...

la validez del CC como modelo de funciones fisiológicas es limitada

↳ El **fenotipo** no sea el correcto

↳ por cambios en el **microambiente** ↳

Célula-Célula // Célula-MEC

- Menor heterogeneidad
- Se pierde la arquitectura 3D
- No están los mismos estímulos hormonales y nutricionales

↔ Organismo vivo ≠ *in vitro*

✓ Naturaleza del sustrato (sólido, semisólido o líquido)

✓ Contacto con otras células

✓ Constitución del medio

✓ Temperatura

Influyen en el
microambiente

SUBCULTIVO Y LÍNEAS CELULARES

o

ADHESIÓN CELULAR

Las células antes de adherirse deben secretar proteínas de MEC y proteoglicanos.

La mayoría de las células en cultivo (de tejidos sólidos) crecen en **MONOCAPA**, adheridas a una superficie, y después de subcultivar requieren volver a adherirse al sustrato antes de proliferar.

Las células cuentan con receptores de superficie específicos para moléculas en la MEC.

Hay 3 principales clases de **proteínas transmembranales de adhesión**:

- 1) **CAMs** (*cell-cell adhesion molecules*, calcio independientes) y **cadherinas** (calcio dependientes). Ambas participan en interacciones entre células homólogas.
- 2) **Integrinas** → interacciones célula-sustrato (Ej: receptores para fibronectina, laminina, colágeno).
- 3) **Proteoglicanos** → interacciones célula-sustrato (Ej: receptores de FC de baja afinidad y pueden estabilizar o translocar al factor a su receptor de alta afinidad).

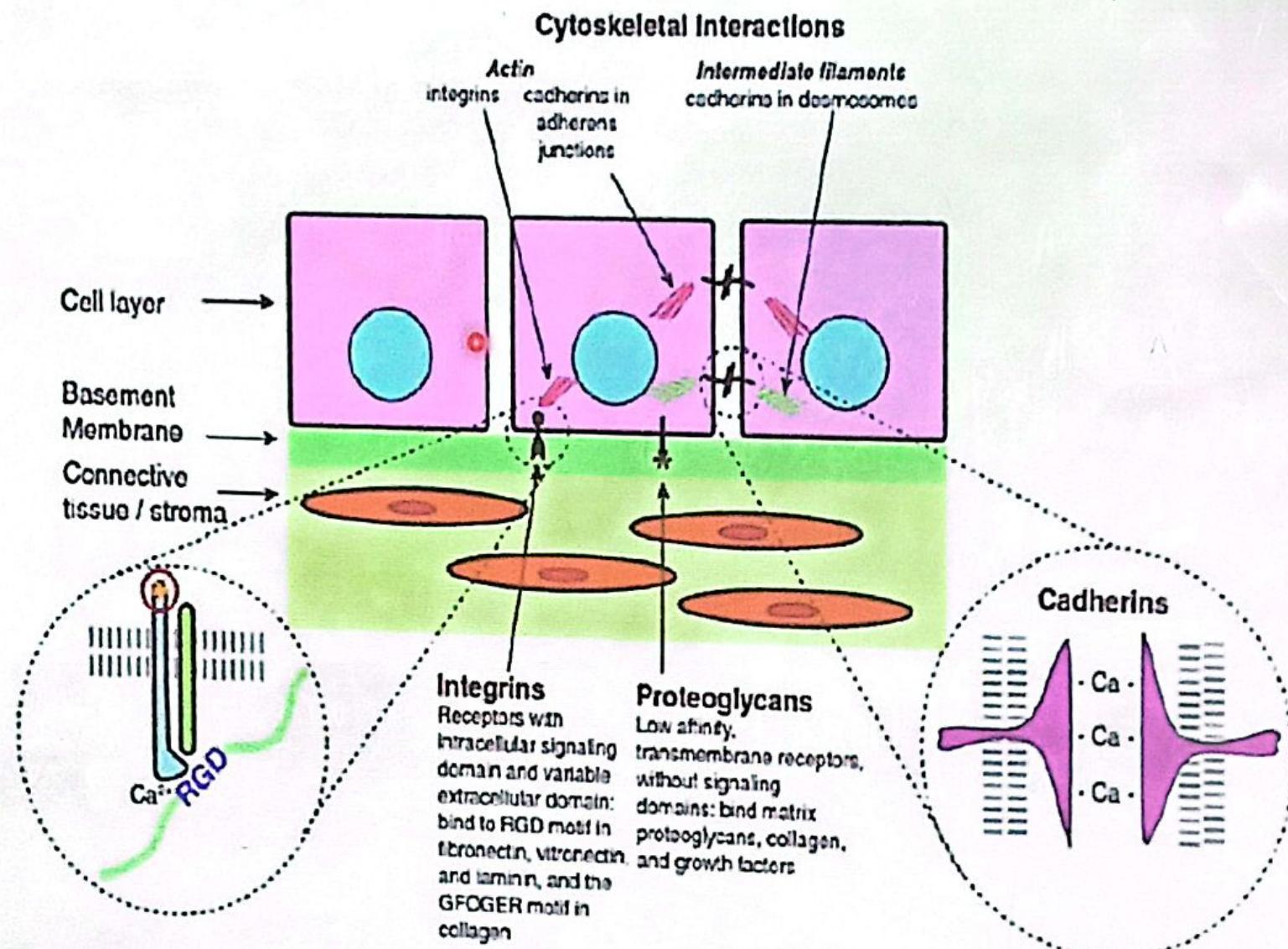


Figure 2.1 Cell Adhesion.

Diagrammatic representation of a layer of epithelial cells above connective tissue containing fibrocytes and separated from it by a basal lamina. CAMs and cadherins are depicted between like cells; integrins and proteoglycans, between the epithelial layer and the matrix of the basal lamina.

**ADHESIÓN
CELULAR**

Las proteasas → digerir la MEC.

EDTA → porque muchas de estas moléculas de adhesión dependen de Ca.

Las **UNIONES INTERCELULARES** tienen diferentes funciones:

- a) **F. Mecánica** (desmosomas y uniones adherentes) → mantienen a las células epiteliales juntas, que crecen confluentes en cultivo y van incrementando el número de desmosomas, por lo que luego es difícil desagregarlas.
- b) **F. de Sellado** (uniones estrechas) → sellan el espacio entre células epiteliales (Ej: entre células endoteliales).
- c) **F. Comunicante** (gap junctions) → permiten que iones, nutrientes y moléculas señalizadoras pasen entre las células en contacto.

MEC

- ❖ Se encuentra entre los espacios intercelulares.
- ❖ Su constitución depende del tipo celular*.
- ❖ Su composición regula el **fenotipo celular**.



Los fibroblastos secretan principalmente COL 1 y fibronectina.
Los epitelios producen laminina en mayor proporción.

* en los tejidos, hay una mezcla de tipos celulares.

Las líneas celulares en cultivo generan su propia MEC

Los **cultivos primarios**, la propagación de *algunas células especializadas* y la inducción de su diferenciación, puede requerir provisión exógena de MEC (como colágeno, laminina, fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos, matrigel®, etc.).

La MEC ➔

- Permite la unión necesaria para que ocurra la proliferación.
- Su uso en el CC puede incrementar la proliferación, sobrevida o diferenciación.

CITOESQUELETO ➔ Otro componente importante en las adhesiones intercelulares y célula-sustrato. Las moléculas de adhesión se unen a él.

Las células en cultivo se pueden mover en el sustrato.

Las más móviles son los fibroblastos a baja densidad (es decir, cuando no están en contacto). Los fibroblastos migran con polaridad.

Las menos móviles son las monocapas epiteliales densas. Las células epiteliales, a menos que estén transformadas, no muestran migración aleatoria ni se polarizan, sino que migran hasta hacer contacto con otra célula y eventualmente se acumulan en parches.

La inhibición por contacto → cese de movimiento en la confluencia, cuando toda el área de crecimiento disponible se utiliza y las células hacen contacto cercano una con la otra.



La progresión a través de estas fases es controlada por **ciclinas** y regulada a través de **puntos de control**, en los que participan proteínas supresoras de tumores como p53 y Rb.

Cuando las células detectan un **daño en los puntos de control** que no les es posible reparar, recurren a la muerte celular por **apoptosis**.

La baja densidad celular y la presencia de FC mitogénicos → la entrada al ciclo celular.
La alta densidad **inhibe** la proliferación de células normales.

Condiciones para la inducción de **diferenciación** son:

- Alta densidad celular
- Incremento en las interacciones célula-célula y célula-MEC
- Presencia de factores de diferenciación
- Medio de cultivo (**libre de suero**)

Si se requiere diferenciación, puede ser necesario definir 2 distintos grupos de condiciones: uno para proliferación y otro para diferenciación.



Todo cultivo celular inicia con un **cultivo primario**



Células seleccionadas



muy inestable → las células que lo constituyen se están **modificando continuamente** para adaptarse (no son poblaciones homogéneas).

- ✓ su capacidad para **migrar** dentro de un fragmento de tejido
- ✓ su capacidad para **sobrevivir** a la técnica de disgregación y adherirse al sustrato.

Alcanzar la **CONFLUENCIA** es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos.

Es en este estado cuando su **morfología y fisiología** son más parecidas a su estado original.

Es también el momento en el que se **detiene el crecimiento** y se hace necesario dividir, replaquear o propagar las células.





Después de alcanzar la **confluencia** →

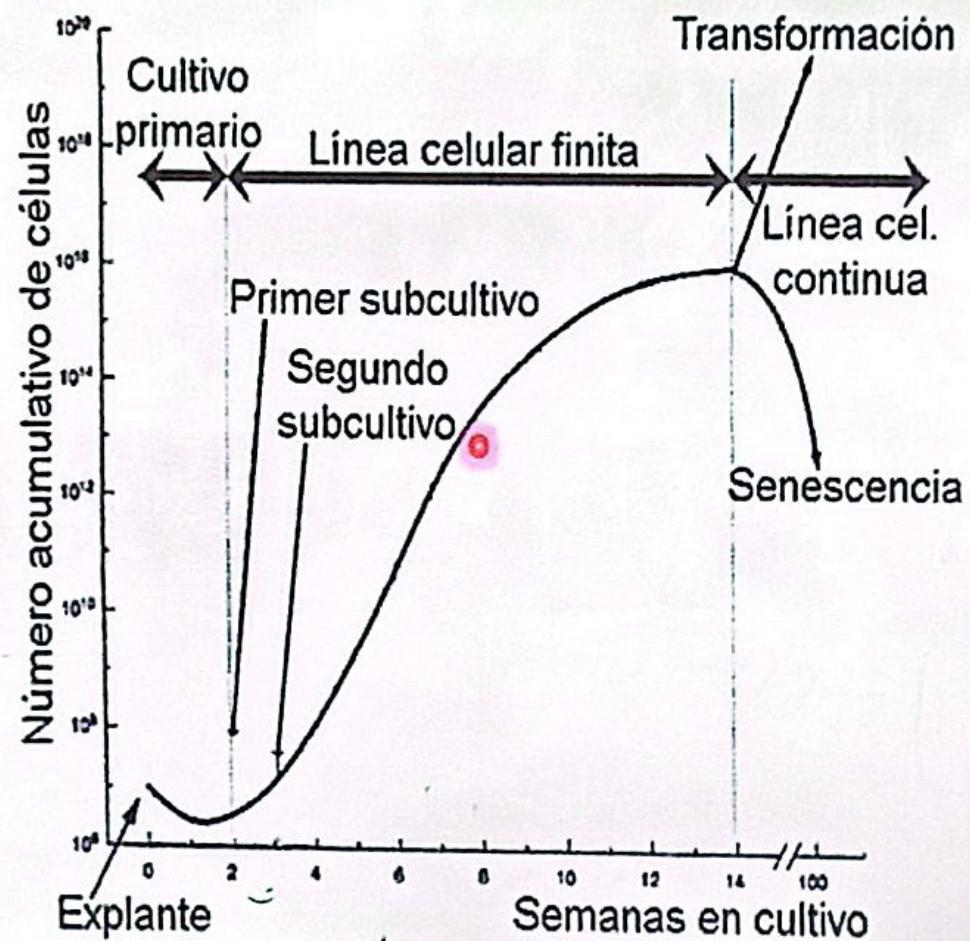
las células cuyo crecimiento es sensible a la inhibición por contacto dejarán de dividirse, mientras que cualquier célula que haya sufrido transformación (insensibles a la limitación por densidad) tenderá a proliferar más.

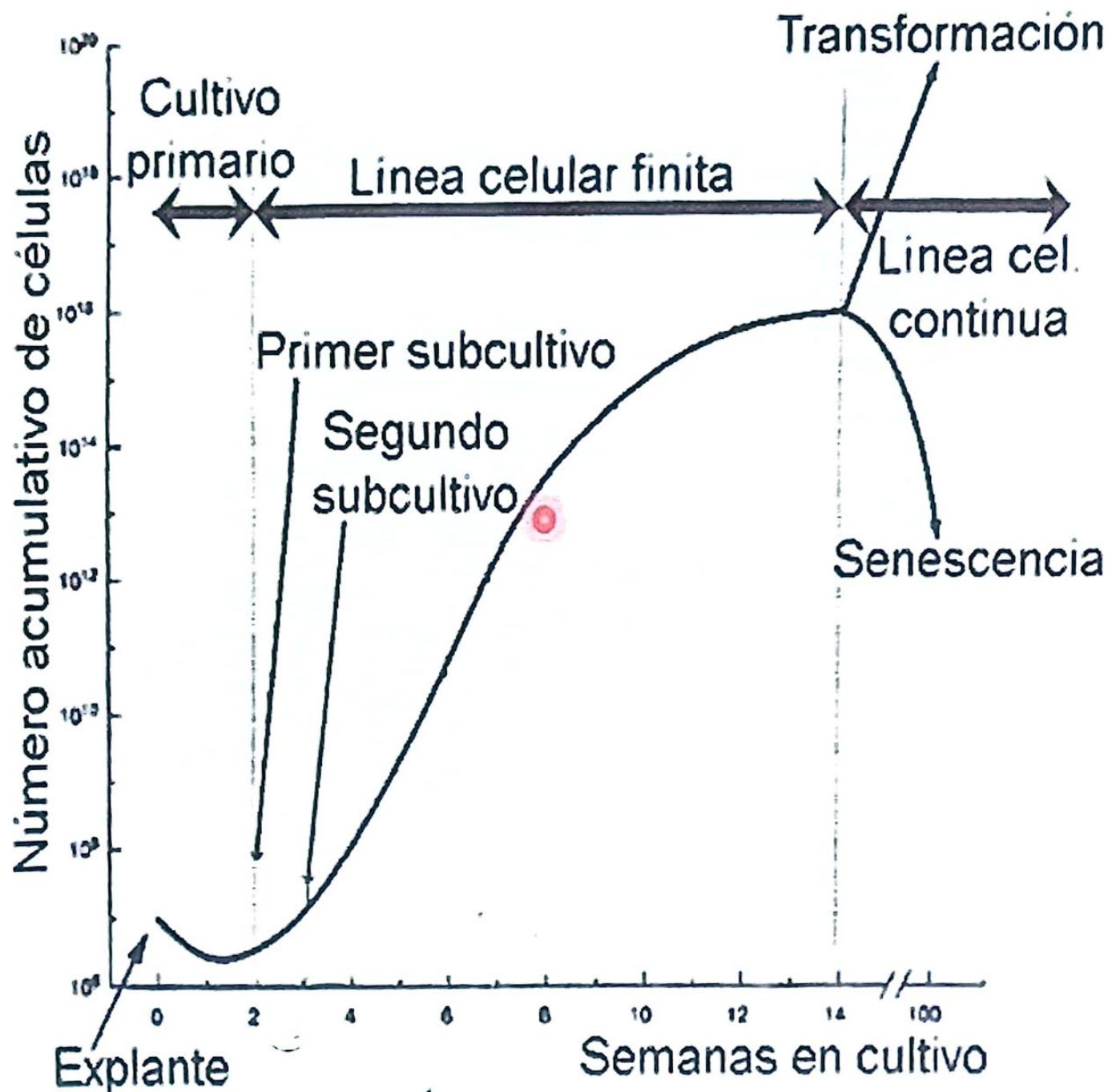
Mantener la densidad celular baja
(Ej: subcultivos frecuentes) ayuda a preservar el fenotipo normal.

EVOLUCIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES



Una vez que las células del cultivo primario llenan el recipiente donde estaban creciendo, se realiza un “**pase**” (**primer subcultivo**) → tomar una muestra de esas células y ponerlas a crecer en otro recipiente.





DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES CONTINUAS

Algunas líneas celulares finitas pueden dar lugar a líneas celulares continuas. Una línea celular continua en general aparece alrededor de la semana 14 de cultivo (pero puede ocurrir en cualquier momento).

La capacidad de una línea celular de proliferar continuamente probablemente refleja su capacidad de variación genética.

Una característica común de muchas líneas celulares continuas de humano es el desarrollo de un número de cromosomas subtetraploide.

La alteración de un cultivo que da lugar a una línea celular continua se denomina comúnmente **transformación *in vitro*** y puede ocurrir de forma espontánea o ser inducida químicamente o viralmente.

En cultivo celular, la “inmortalización” → adquisición de un tiempo de vida infinito y la “transformación” → alteración adicional en las características de crecimiento (independencia de anclaje y pérdida de inhibición por contacto) que a menudo, pero no necesariamente, se correlacionan con la tumorigenidad.





RECIPIENTES DE CULTIVO Y SUSTRADOS





ADHESIÓN Y CRECIMIENTO

La mayoría de las células de vertebrados cultivadas *in vitro* crecen en **monocapas** sobre un **sustrato** → que debe permitir la adhesión celular, o por lo menos, permitir la adherencia de factores de unión producidos por las células para que a su vez, permitan la adhesión celular.

A las células que requieren adherirse para proliferar se les llama “dependientes de anclaje”.

Las células **transformadas*** frecuentemente se vuelven independientes de anclaje y pueden crecer en **suspensión**.

*alteración genética de una célula resultante de la absorción directa, incorporación y expresión del material genético exógeno (ADN exógeno). El ADN exógeno se encuentra en el ambiente y se introduce a través de la membrana de la célula.



MATERIALES - SUSTRADOS

VIDRIO: usado originalmente por sus propiedades ópticas y la carga de su superficie.

Es barato, fácil de lavar, esterilizable y ópticamente claro.

PLÁSTICOS SINTÉTICOS: tienen mayor consistencia y propiedades ópticas superiores. Ej: poliestireno, PVC, policarbonato, etc.

Poliestireno → recipientes estériles de un solo uso (sustrato simple y reproducible para cultivo, por lo que son los más usados).

La superficie es totalmente plana → las monocapas celulares quedan distribuidas uniformemente y son reproducibles.

El poliestireno es hidrofóbico, no adecuado para adhesión celular, por eso debe recibir un tto qco o con radiación γ , para producir una superficie con carga y capaz de humedecerse.

RECIPIENTES DE CULTIVO Y SUSTRADOS

Factores: Masa celular requerida

Tipo de crecimiento de las células (suspensión o monocapa)

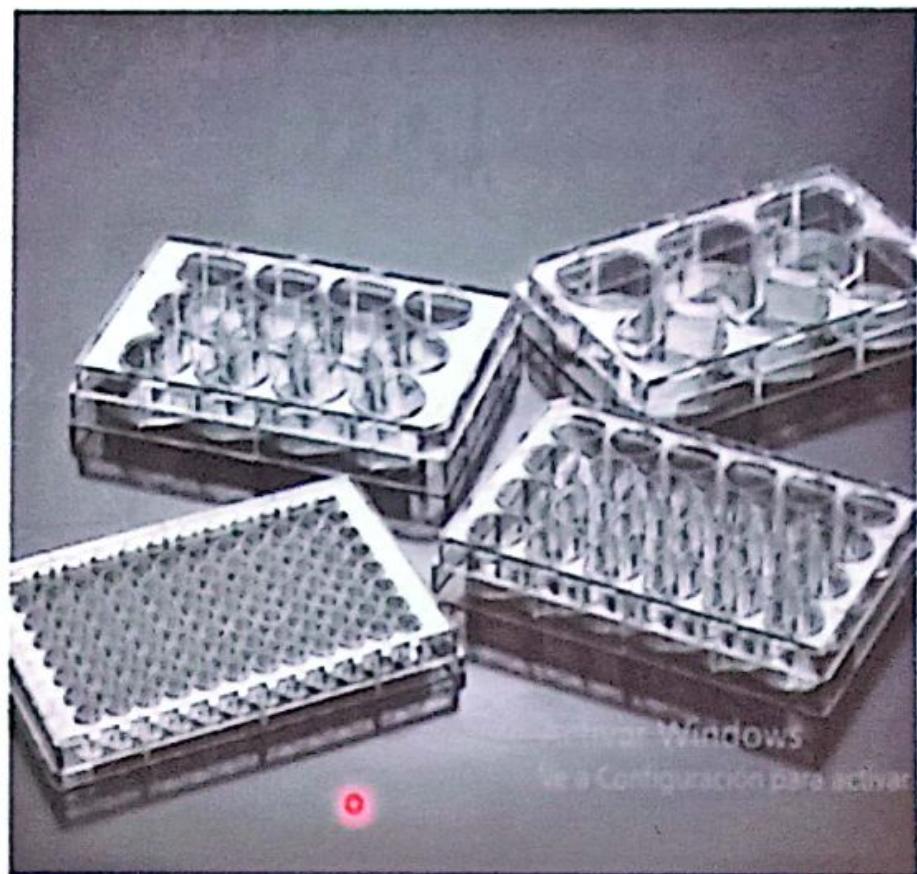
Cultivo sellado o ventilado

Frecuencia del muestreo

Tipo de análisis

Costo

Recipientes de cultivo	mL	cm ²	No. de células aproximado (HeLa)
Cajas multipozos			
96 pozos	0.1	0.3	1×10^5
6 pozos	2	10	2×10^6
24 pozos	1	2	5×10^5
Cajas Petri			
Diámetro 3.5 cm	2	8	2×10^6
Diámetro 6 cm	5	21	5×10^6
Diámetro 9 cm	10	49	1×10^7
Frascos			
25 cm ² (T25)	5	25	5×10^6
75 cm ² (T75)	25	75	2×10^7



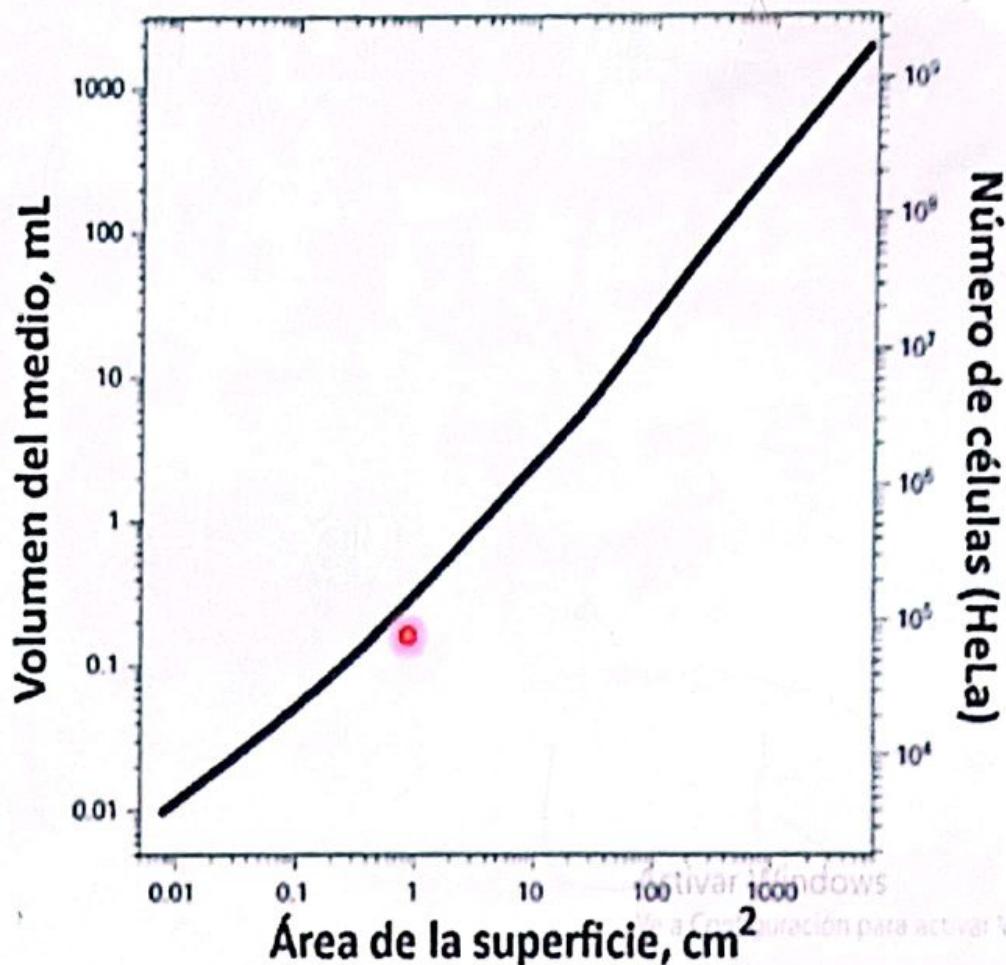
Mario J. Correa Q. - 2024

En cultivos en monocapas → el número de células es proporcional al área de superficie disponible.

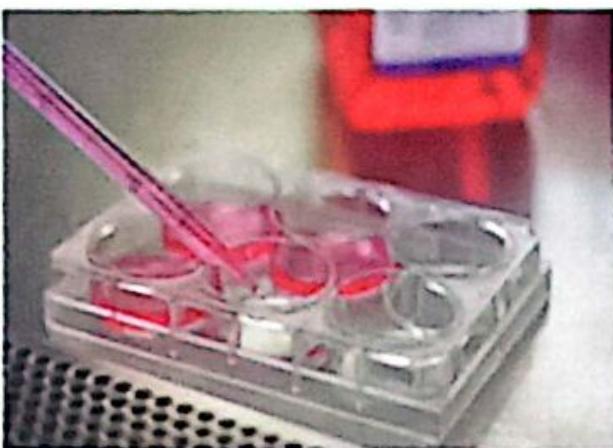
La relación del volumen del medio y el número de células no es lineal:

en los recipientes más pequeños se tiende a usar más medio del que proporcionalmente es usado en los recipientes grandes.

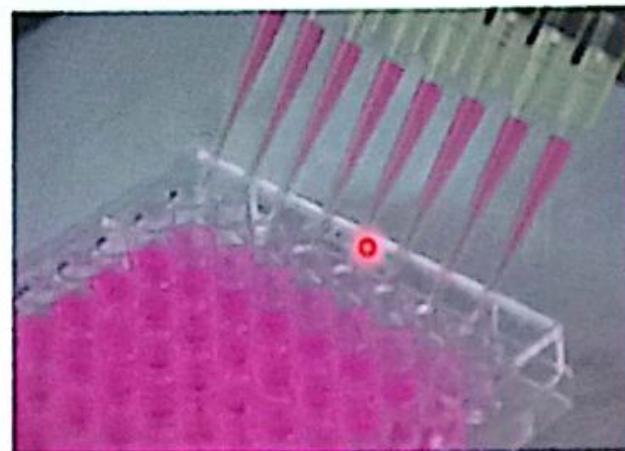
Si el ensayo requiere múltiples repeticiones, es preferible usar cajas multipozos que utilizan volúmenes pequeños.



RECIPIENTES DE CULTIVO Y SUSTRADOS



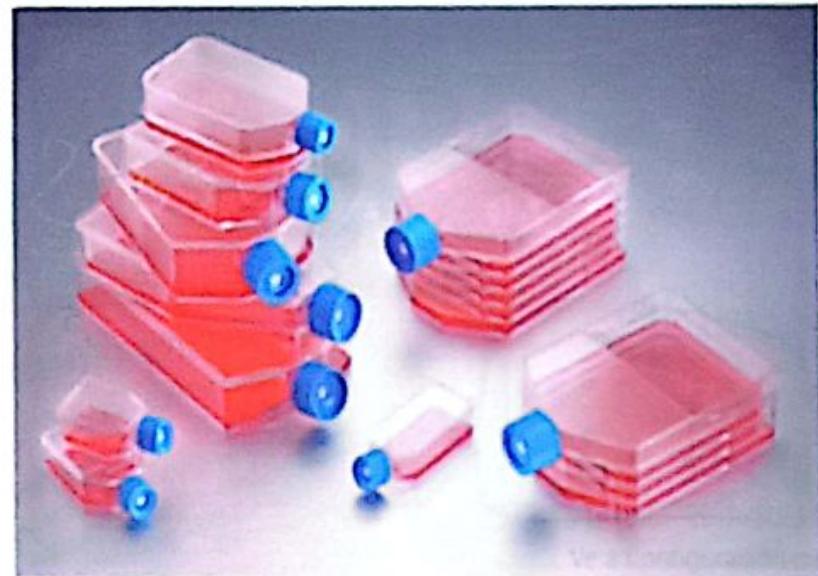
Caja de 6 pozos



Caja de 96 pozos



Cajas Petri



Frascos

Mario J. Correa Q. – 2024

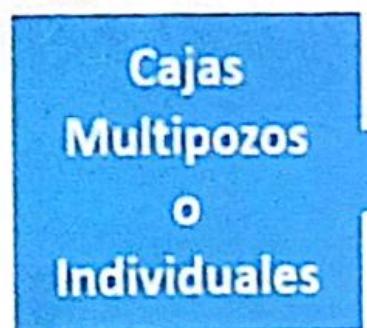
CULTIVO EN SUSPENSIÓN:

- Para aumentar el # de células sólo se requiere aumentar el V del medio.
- Se mantienen en agitación (60 rpm)
- El contenedor no requiere de tros especiales para permitir adhesión celular.

VENTILACIÓN:

Los frascos de cultivo pueden tener tapas selladas o tapas ventiladas (difusión de CO₂) sin riesgo de contaminación.

En cajas multipozos y cajas Petri ➔ sólo se pueden realizar **cultivos no sellados**.



Según:

- ✓ Tipo de muestreo
- ✓ Tipo de análisis
- ✓ Procesamiento simultáneo o no
- ✓ Retiradas a diferentes tiempos y procesadas inmediatamente

Activar Windows

Microscopio de contraste de fases → su uso se dificulta en cajas multipozos, porque el menisco que se forma es pequeño.

Es difícil visualizar las células cultivadas en botellas de cultivo (roller bottles) porque a menudo se requiere quitar el condensador del microscopio.



Si el ensayo requiere solventes (acetona o tolueno) → cultivo sobre superficies de vidrio (para evitar disolver el poliestireno).

Para evitar crecimiento desigual sobre la superficie de los recipientes → importante evitar vibraciones (abrir y cerrar la incubadora frecuentemente o por vibración del equipo).

ASPECTOS CLAVES:

Generalmente las cajas Petri < caras que los frascos con equivalente área de superficie.

Los cultivos en cajas Petri son más dependientes del ambiente húmedo dentro de la incubadora y de las condiciones de CO₂ controladas, y son más propensos a contaminarse.

La ventaja del cultivo en cajas Petri es que es más fácil de examinar al microscopio y de procesarse.

El cultivo sobre superficies de vidrio es el más barato, pero su mayor desventaja es que su preparación es laboriosa, porque debe ser cuidadosamente lavado y esterilizado.

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Wi-Fi



MEDIOS Y SUPLEMENTOS

Activar Windows
Visita www.microsoft.com/activator/

Mario J. Correa Q. - 2024

MEDIOS DE CULTIVO

Medios "naturales"
(Ej: líquidos corporales como extractos de embrión de pollo, suero, linfa, etc.)

calidad fuera más consistente

1955 → Medio Basal de Eagle

1959 → Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM)

← % Qca. definida

Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM)

1967 → RPMI (Roswell Park Memorial Institute)

Aparecen nuevas Líneas Celulares → requieren **OPTIMIZAR** el medio

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Wi-Fi

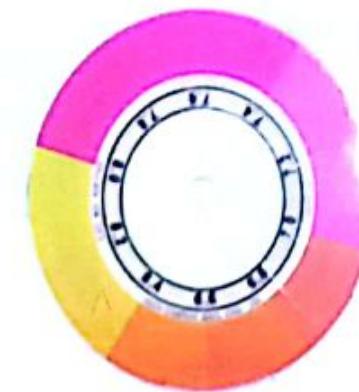


La mayoría de las líneas celulares crecen bien a pH de 7.4

El pH óptimo para una determinada línea celular puede variar:

Líneas de fibroblastos normales crecen mejor → 7.4 a 7.7

Células transformadas crecen mejor → 7.0 a 7.4



El **CO₂** en la fase gaseosa se disuelve en el medio, estableciéndose un equilibrio con los iones de bicarbonato y estabiliza el pH.

- Cada medio tiene una $[HCO_3^-]$ y % CO₂ recomendada para alcanzar el pH correcto.
- Otros *buffers* (HEPES), pueden controlar el pH dentro del rango fisiológico.
- La ausencia de CO₂ atmosférico parece limitar el crecimiento celular.
- La inclusión de piruvato en el medio L15 de Leibovitz permite a las células aumentar su producción endógena de CO₂ → haciéndolas independientes de CO₂ exógeno y de HCO₃⁻ (baja toxicidad y bajo costo).



PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Otro constituyente principal de la fase gaseosa es el O₂:

La mayoría de las células requieren O₂ para respirar *in vivo*.

El metabolismo de la mayoría de las células en cultivo está basado en la glicólisis anaerobia.

Las células en cultivo se mantienen con O₂ atm, el cual se disuelve en el medio.

El cultivo de órganos (embriones tardíos, neonatos y adultos) → requiere hasta 95% de O₂ en la fase gaseosa (problema de difusión por la geometría y penetración gaseosa en el cultivo del órgano).

El aumento de O₂ puede ser tóxico para las células en cultivo → formación de **radicales libres**, pero el suero en el medio **puede** disminuir este efecto (el control de la tensión de O₂ es más crítico en medio libre de suero).



La profundidad del medio de cultivo puede influir en la **tasa de difusión del O₂** a las células.

Recomendable: profundidad del medio entre 2 y 5 mm (0.2 - 0.5 mL/cm²)

La mayoría de las células cultivadas tienen una tolerancia bastante amplia a la presión osmótica (PO).

La PO del plasma humano = 290 mOsmol/kg (se asume óptimo para las células humanas *in vitro*).

Puede ser diferente para otras especies → 310 mOsmol/kg para ratones.

En la práctica → osmolaridades de 260 – 320 mOsmol/kg son bastante aceptables para la mayoría de las células. Una vez elegido el valor, debe mantenerse con variaciones menores a 10 mOsmol/kg.

Los medios ligeramente hipotónicos → preferibles para cultivos en cajas (compensar la evaporación del cultivo abierto).





La T óptima para el cultivo celular depende principalmente de la T corporal del organismo del que se obtuvieron las células.

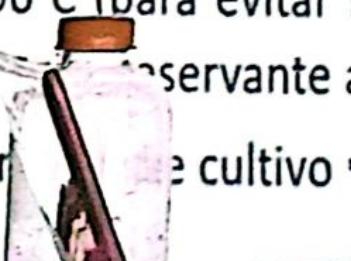
La T recomendada:

Líneas celulares de ave → 38.5°C
Células de humano → 37°C.

Resultados reproducibles
T ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$)

IMPORTANTE: controlar que la T no sea mayor a la recomendada.

- ✓ Las células de mamífero no toleran estar 2°C por encima de lo normal más que unas pocas horas.
- ✓ Las células de humano:
- ✓ Mueren muy rápidamente a más de 40°C
- ✓ Pueden sobrevivir varios días a 4°C
- ✓ Pueden congelarse a -196°C (para evitar formación de cristales, se adiciona dimetilsulfóxido (DMSO) conservante a partir de 1961).
- ✓ T influye sobre el pH del medio de cultivo → el CO₂ se disuelve más a baja T.



ESPUMA EN LOS CULTIVOS:

La desnaturización de proteínas puede aumentar, así como el riesgo de contaminación si la espuma alcanza el cuello del recipiente de cultivo.

La espuma puede limitar la difusión de gases si introduce líquido en el espacio capilar entre la tapa y el frasco de cultivo, o entre la tapa y la base de una caja Petri.

La formación de espuma es un problema común en cultivos en suspensión y puede causar daño celular (shear stress). Se pueden agregar sustancias que reduzcan la tensión superficial.



PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

SOLUCIONES SALINAS BALANCEADAS:

Se componen de sales inorgánicas

Puede incluir bicarbonato de sodio y en algunos casos, glucosa.
Forman la base de muchos medios completos.

Ej: Earle, Hank y PBS (Phosphate-Buffered Saline).

Usos:

Diluyentes de aminoácidos o vitaminas

Lavados isotónicos

Medios de disección

Incubaciones cortas de no más de 4 h (siempre y cuando tengan glucosa).

Las que no tienen calcio → para disgregar monocapas celulares o tejidos.



PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

MEDIO COMPLETO:

Indica que se le han agregado todos los constituyentes y suplementos necesarios:

- ✓ Aminoácidos no esenciales (compensar deficiencias)
- ✓ Aminoácidos esenciales (que no pueden ser sintetizados por las células)
- ✓ Vitaminas (general/ las hidrosolubles: vitamina C y todas las vitaminas B)
- ✓ Algunos medios especiales también contienen vitaminas liposolubles (A, D, E, K).
- ✓ Sales inorgánicas (contribuyen a la osmolaridad)
- ✓ Proteínas
- ✓ Elementos traza
- ✓ Glucosa (fuente de energía), etc.

La glucosa se metaboliza por medio de la glucólisis formando piruvato, que puede ser convertido a lactato o acetoacetato y entrar al ciclo del ácido cítrico y oxidarse, formando CO₂ y agua.

Antibióticos → reducir la frecuencia de contaminación.

No es aconsejable su uso rutinario porque:

- Promueve la aparición de organismos resistentes
- Enmascara contaminantes crípticos
- Oculta infecciones de micoplasma (bacterias)
- Promueve una técnica aséptica pobre

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

SUERO... contiene:

Proteínas:

Albúmina → transporta minerales, ácidos grasos y hormonas.

Fibronectina → promueve la adhesión celular

α_2 -macroglobulina → inhibe a la tripsina

Transferrina → transporta Fe (haciéndolo biodisponible y menos tóxico).

Las proteínas del suero incrementan la viscosidad del medio, reduciendo el shear stress durante el pipeteo y la agitación, y pueden agregar capacidad buffer al medio.

La mayoría de los sueros: Ternera, caballo, bovino adulto.

El suero fetal bovino (SFB) es el más utilizado (particularmente para líneas celulares más exigentes y para clonación).

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

SUERO... contiene:

- Factores de crecimiento (FC) → promueven la proliferación de células.
 - PDGF: FC derivado de plaquetas)
 - EGF: FC epidérmico
 - IGF-1: FC parecido a la insulina).
 - FGF: FC de fibroblastos
 - VEGF: FC del endotelio vascular
- Factores de adhesión y actividad antitripsina → promueven adhesión celular.
- Minerales: Fe, Cu, Zn Se (usualmente unidos a la albúmina).
- Lípidos: ácido oleico, ácido linolénico, etanolamina, fosfatidiletanolamina.
- Hormonas: Hidrocortisona, insulina.
- Nutrientes.
- Metabolitos: glucosa, aminoácidos, nucleósidos (base nitrogenada con una pentosa, que puede ser ribosa o desoxirribosa).
- Inhibidores de proliferación celular.

La selección siempre dependerá del tipo celular que se desea cultivar.

La información generalmente se puede consultar en la literatura o en los bancos de células del proveedor.

Formulaciones comerciales disponibles → 75% lo constituyen:

- ✓ **RPMI**: originalmente se diseñó para cultivos celulares en suspensión (por ello, no contiene Ca), es muy usado en cultivos en monocapa.
 - ✓ **DMEM**
 - ✓ **MEM**
 - ✓ **Ham's F12**: desarrollado para clonar células CHO, es muy utilizado en cultivos primarios.
- El suero siempre será una fuente de variabilidad.
- Cada que se cambie de lote, es necesario verificar la eficiencia de sembrado (sobrevivencia) y el tamaño de colonias (proliferación).
- Se debe verificar que las características morfológicas de las células en cultivo se conserven y que no haya problemas de esterilidad.

SELECCIÓN DEL MEDIO Y EL SUERO

MEDIO LIBRE DE SUERO...:

- a) Por necesidad de estandarizar medios entre laboratorios
- b) Para contar con medios especiales para tipos celulares específicos
- c) Para eliminar la variabilidad inherente al suero

Ej: M199, CMRL 1066, F10 de Ham y el F12.

Las líneas celulares continuas pueden adaptarse al medio sin suero sin sufrir selección indeseada, bajo ciertas condiciones especiales de hormonas y nutrientes.

Ventajas del medio sin suero:

- * **Selectivo para un tipo celular.** Puede separar linajes e incluso estadios de desarrollo en células hematopoyéticas, a través del uso correcto de FC particulares.
- * **Regulación de proliferación y diferenciación.** Permiten cambiar fácilmente de un estado de proliferación a uno de diferenciación, alterando la concentración de un FC u otros inductores.

SELECCIÓN DEL MEDIO Y EL SUERO

MEDIO LIBRE DE SUERO...:

Desventajas del medio sin suero:

- * **Multiplicidad.** Puede ocurrir que cada tipo celular requiera una receta diferente de medio libre de suero (incluso aún entre líneas celulares de tumores del mismo origen). Puedes ser un inconveniente para labs que trabajan simultáneamente diferentes líneas celulares.
- * **Selectividad.** La transición de los cultivos celulares a medios libres de suero, aunque deseable, no es tan sencilla. Puede implicar la selección de un linaje celular que no sea la típica de la población total.
- * **Pureza de los Rx.** La remoción de suero requiere que el grado de pureza de los reactivos y del agua sea extremadamente alta (el suero tiene acción detoxificante).
- * **Menor proliferación celular.** En general, el uso de los medios libres en suero enlentece los cultivos, e incluso, se logran menos generaciones con las líneas celulares finitas.
- * **Disponibilidad.** Los medios libres de suero de adecuado control de calidad suelen ser escasos y los Rx para su preparación, más caros.

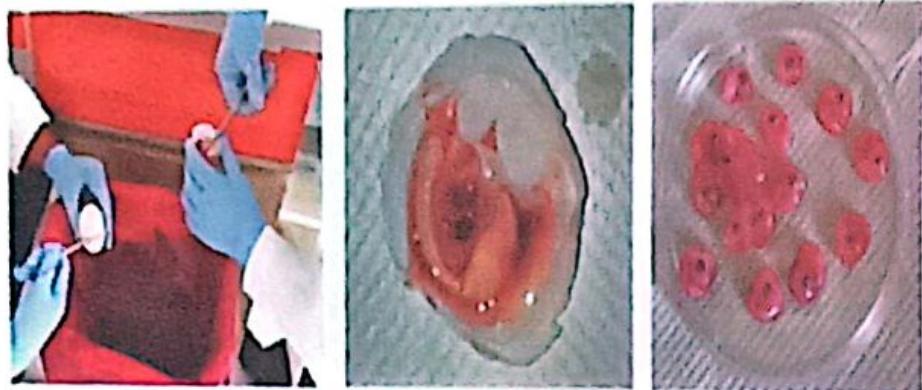
Cultivos Primarios

CULTIVO PRIMARIO

Etapa comprendida entre el aislamiento celular y el primer subcultivo.

Fases:

1) Obtención de la muestra.



Obtención de embriones de pollo (día embrionario 7)

TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR Y ENGENIERÍA DE TEJIDOS
Raúl Del Belén Vargas & Claudia Heyder González de la Rosa
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa
Mexico, D.F., Febrero de 2014

2) Disección del tejido.



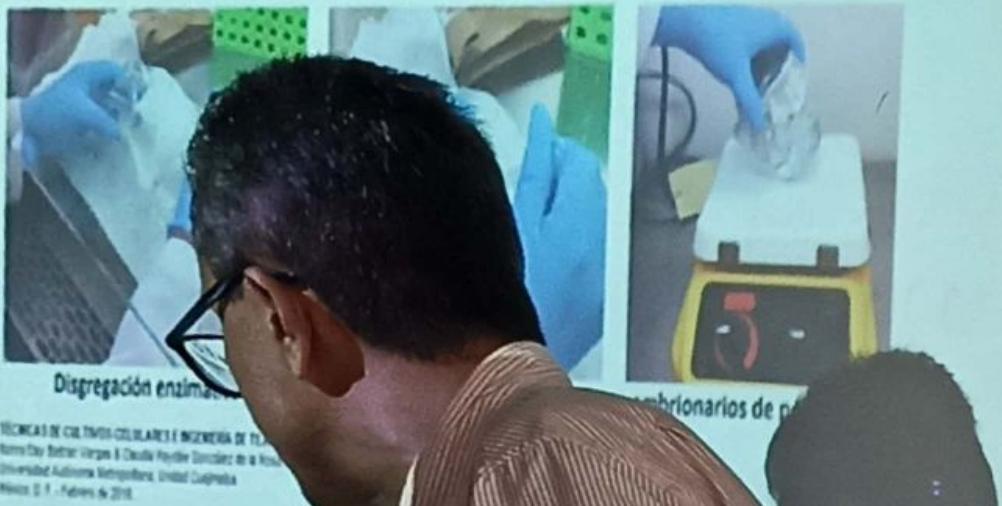
Disección de corazones de embriones de pollo (día embrionario 7)

TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR Y ENGENIERÍA DE TEJIDOS
Raúl Del Belén Vargas & Claudia Heyder González de la Rosa
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa
Mexico, D.F., Febrero de 2014

CULTIVOS PRIMARIOS

Fases:

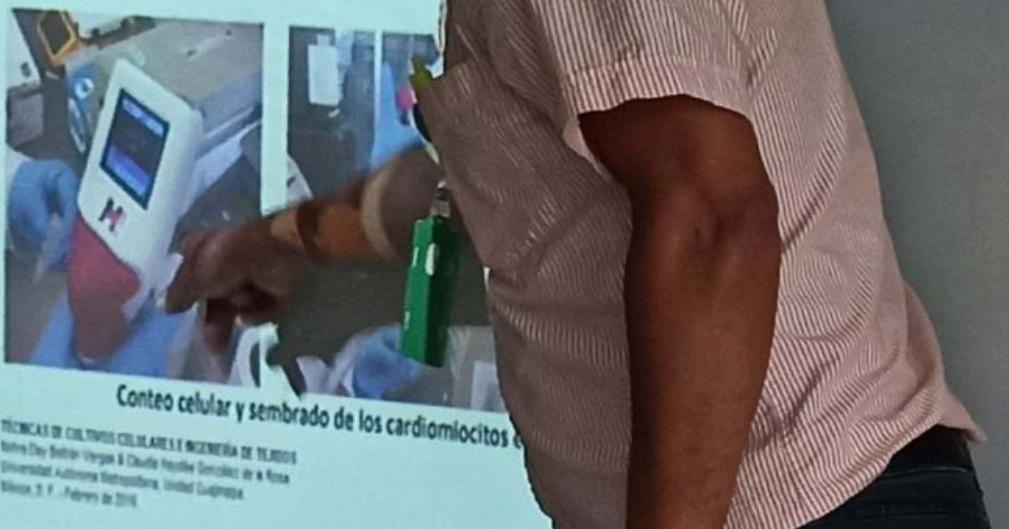
3) Disgregación.



Disgregación enzimática

TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA DE TEJIDOS
Raúl Del Río Vargas & Claudia Paola González de la Rosa
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa
Méjico D. F. - Febrero de 2016

4) Sembrado.



Conteo celular y sembrado de los cardiomioцитos

TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA DE TEJIDOS
Raúl Del Río Vargas & Claudia Paola González de la Rosa
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa
Méjico D. F. - Febrero de 2016

Después de obtener la muestra → un CP puede lograrse permitiendo que las células **migren** a partir de un **fragmento de tejido** adherido a un **sustrato** adecuado o mediante la **disgregación del tejido mecánica o enzimáticamente**, para producir una **suspensión celular**, algunas de las cuales se adherirán al sustrato.

DISGREGACIÓN → preparaciones crudas de tripsina, collagenasa, elastasa, pronasa, dispasa, DNasa y hialuronidasa (solas o en combinaciones).

REQUISITOS:

- a) Remover tejido necrótico y graso.
- b) Cortar finamente con instrumentos especiales (causando el daño mínimo).
- c) Después de su uso, las proteasas se deben eliminar x centrifugación.
- d) La [células] >> que la normalmente usada para subcultivo.
- e) Es preferible utilizar un medio rico, como el F12, a un medio simple, como el MEM. Si se requiere suero, es mejor usar el SFB.
- f) Los **embriones** embrionarios son más fáciles de disgregar y proliferan más rápidamente que los adultos.



La técnica del explante fue el método original para iniciar el cultivo de tejido.

Consiste en tomar un pequeño fragmento de tejido y embeberlo en plasma coagulado mezclado con extracto embrionario, para mantenerlo fijo y visualizarlo con un microscopio convencional.

El plasma coagulado + extracto embrionario → nutrientes y FC → estimulan la migración celular desde el explante.

DISGREGACIÓN → métodos enzimáticos.

Se parte de una sln de disgregación simple a una sln más compleja, con tripsina o tripsina/EDTA como punto de partida, y la adición de otras proteasas para mejorar la disgregación.

Nota: el incremento en la pureza de la enzima disminuye toxicidad, pero también disminuye la disgregación.



Técnica:

Incubar el tejido con tripsina a 37°C hasta por 30 min, o bien,
pre-incubar a 4°C x 6-18 h (difusión en el tejido) y luego a 37°C x 20 min.

En muchas ocasiones → la disgregación enzimática requiere combinarse con métodos mecánicos.

SEMBRADO

- a) Suspensión celular homogénea
- b) Concentración celular
- c) Sembrado en recipientes adecuados para incubar en las condiciones necesarias.

VIGILAR: el crecimiento celular y la aparición de contaminaciones.

Cambios de medio de cultivo.

Una vez que el CP ha ocupado todo el sustrato disponible, es necesario subcultivar.

