

# EL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

- **EL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR**  
tendrá en cuenta como mínimo las siguientes variables:

- **FUNCIONES DEL TÉCNICO**
- **ASEPSIA**
- **NORMAS BÁSICAS**
- **CONDICIONES DE CULTIVO**
- **DISEÑO Y EQUIPAMIENTO**

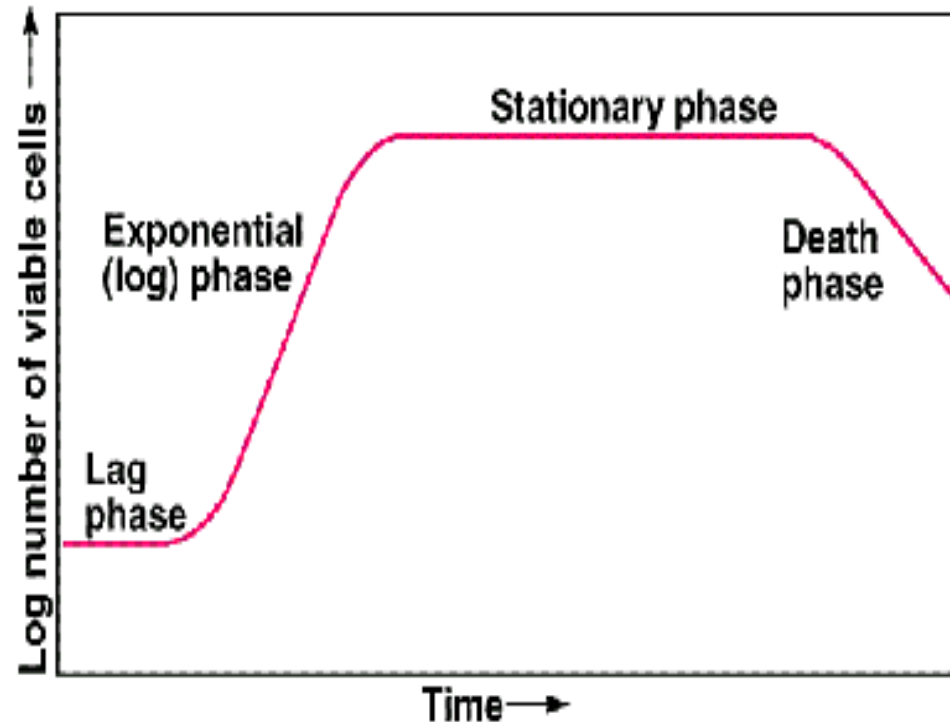
# **Las funciones específicas del Técnico Especialista son:**

- Comprobar el buen funcionamiento de los equipos y del material a su cargo.**
- La preparación, conservación y limpieza del material y los reactivos necesarios para la puesta a punto de las técnicas y la realización de los trabajos que le sean asignados.**
- Control de los pedidos y de las existencias del material fungible y accesorios necesarios para el desarrollo de las técnicas en las que trabaje.**
- Colaborar en la puesta a punto de nuevas técnicas, ensayos, demostraciones y experimentos.**
- Colaborar en las actividades de divulgación del ámbito de la biología molecular.**
- Colaborar en las actividades de investigación y en las prácticas docentes relativas a las técnicas de biología molecular que son el objeto de su especialización.**
- Realizar las labores de formación necesarias para desarrollar su trabajo eficazmente.**

# ASEPSIA

Lanning M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein, *Microbiology: The Principles of Microbiology*, 10th Edition, © 2009 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

## Microbial Growth Curve



- La característica principal que define un laboratorio de cultivo celular es el mantenimiento de la ASEPSIA.
- La tasa de crecimiento de las células en cultivo es muy inferior al de los contaminantes habituales: hongos, levaduras, bacterias y micoplasmas.
- Por ello, para el mantenimiento del cultivo, será vital evitar la aparición en éste de cualquier microorganismo indeseado.

**El área de trabajo para realizar cultivos debe instalarse en una zona tranquila del laboratorio, alejada de las vías de paso y, a ser posible, dedicada exclusivamente al cultivo de las células.**

# NORMAS BÁSICAS

Es de extrema importancia lavarse las manos antes, después, y frecuentemente durante el trabajo en cultivos.

Preferentemente, y es, además, lo más habitual, suelen pulverizarse las manos con alcohol al 70%, para evitar contaminaciones en los experimentos, y contaminación del usuario con material biológico y posible diseminación de éste. Asimismo, la superficie de trabajo de la campana de cultivo se descontaminará antes y después de trabajar con material biológico.

Dentro de la sala de cultivos se debe hablar lo menos posible y cuando es necesario dar alguna charla o explicación en el interior de la sala de cultivos es obligatorio ponerse una mascarilla.

Se debe trabajar siempre con material estéril, y éste solo debe abrirse dentro de la campana de cultivos. Por defecto, todo aquello de lo que no se esté seguro al 100% de su esterilidad ha de ser considerado como no estéril, y debe ser desechado o esterilizado nuevamente.

Es imprescindible marcar cualquier tubo o recipiente que contenga cosas necesarias para el trabajo en la sala de cultivos de la forma más segura posible, y para ello se debe marcar tanto la tapa como el tubo o recipiente que lo contenga.

Así mismo se deben marcar siempre las placas de cultivos en la tapa y en un lateral de la base, de manera distinta para cada placa, para evitar en intercambio entre ellas.

Todo el material biológico (células o material que haya estado en contacto con ellas) ha de ser inactivado antes de tirarlo.

Lo mas usual es recoger los residuos en un recipiente o matraz que contiene lejía diluida, o también se autoclavan los residuos antes de eliminarlos.

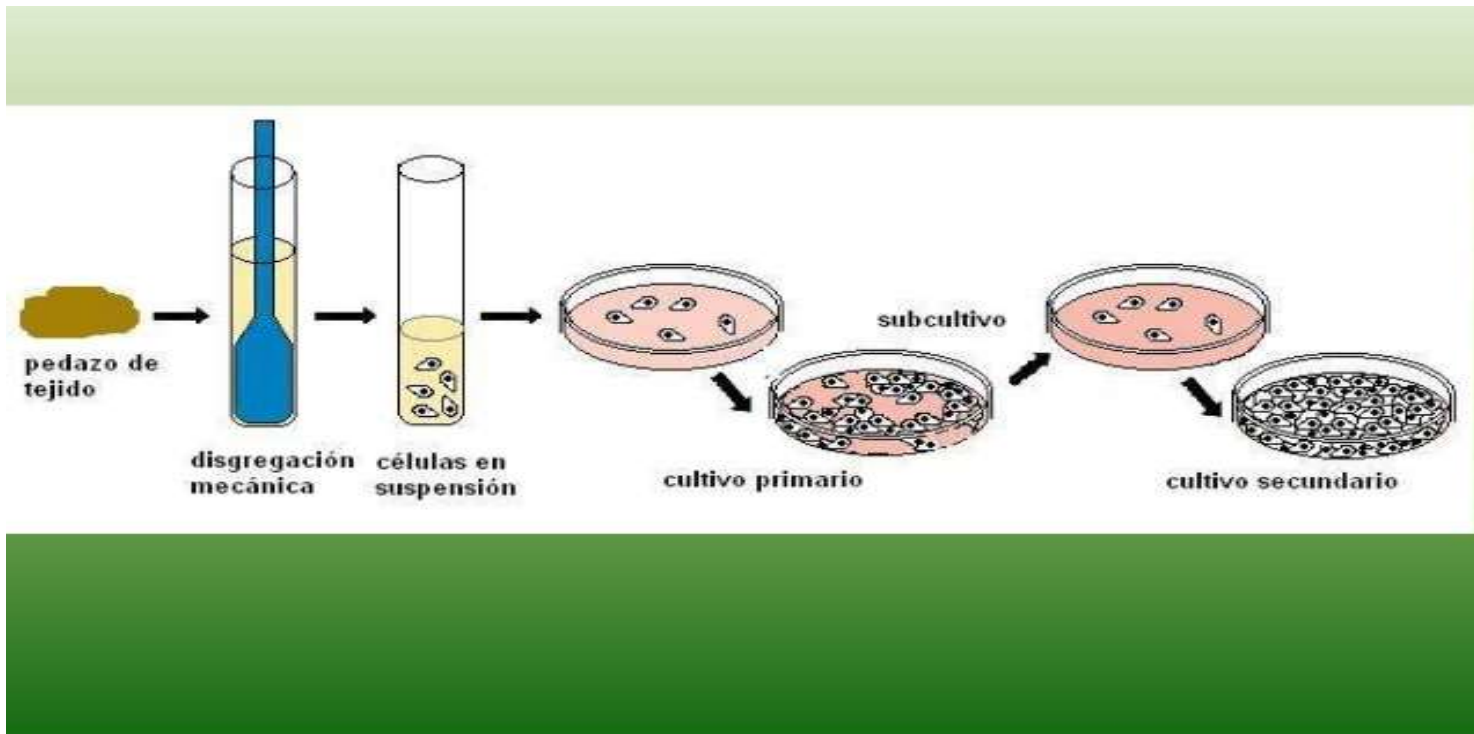
No se debe comer ni beber, y tampoco se debe pipetear con la boca.

# CONDICIONES DEL CULTIVO

*(temperatura, humedad atmosférica y niveles de CO<sub>2</sub>)*

Son características propias de cada línea celular.

El nivel de CO<sub>2</sub> se establece para mantener el equilibrio carbonato-bicarbonato en el medio de cultivo, habitualmente al 5%.



# DISEÑO Y EQUIPAMIENTO

Un laboratorio de cultivo celular debe contar con una infraestructura básica en la cual se disponga de 3 áreas independientes

1. Una destinada a llevar a cabo la preparación y esterilización de medios y reactivos
2. Otro espacio para el proceso de lavado y preparación de material
3. Y una tercera destinada al trabajo con cultivos celulares

Dentro de la estructura física básica se debe contar con sistemas de:

- Refrigeración y congelación
- Incubadoras
- Centrífugas
- Balanzas
- Microscopios
- Cabinas de flujo laminar
- Sistemas de esterilización apropiados para los diferentes tipos de reactivos y materiales
- Material propio de laboratorio, tanto de vidrio como de plástico

# **EQUIPAMIENTO BÁSICO DE UN LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR**

**CAMPANA DE FLUJO LAMINAR**

**BAÑO TERMOSTATIZADO**

**INCUBADOR**

**AUTOCLAVE**

**NEVERA Y CONGELADOR**

**MICROSCOPIO INVERTIDO**

**CENTRÍFUGA**

**DEPÓSITO DE NITRÓGENO LÍQUIDO**

# CABINAS DE FLUJO LAMINAR

La aparición de cabinas de flujo laminar redujo las necesidades de aislamiento del área de trabajo pero, aún así, es recomendable mantener un **gradiente de esterilidad**, desde el medio exterior o laboratorio general, al interior de las cabinas de flujo donde se manipularán los cultivos y del incubador donde se mantendrán.





La campana de flujo laminar es una cámara donde se establece un flujo de aire vertical u horizontal, a modo de cortina, que evita que las micropartículas y aerosoles que se puedan crear al manipular los cultivos salgan al exterior y no contaminen al manipulador y al ambiente, creando una barrera entre la zona donde se está manejando el cultivo y donde se sitúa el trabajador.

Mediante un sistema de aspiración se recoge el aire contaminado y después de pasarlo por unos filtros, devuelve una parte a la campana y otra la expulsa al exterior.

La campana se debe poner en funcionamiento de 15 a 20 minutos antes de empezar a trabajar para que se estabilice la circulación del aire.

Antes de comenzar a trabajar se limpia la superficie en la que vamos a trabajar con una solución antiséptica (habitualmente alcohol 70%).

Debe además colocarse todo el material necesario que vayamos a utilizar con el fin de realizar todas las manipulaciones sin tener que salir y volver a entrar en la zona de trabajo



- ☐ Su función es la de mantener un área libre de partículas, especialmente de posibles contaminantes (bacterias, levaduras,...), que puedan acceder al cultivo.
- ☐ Se consigue mediante un dispositivo mecánico que fuerza el paso del aire a través de un filtro de gran superficie (filtro HEPA) situado o bien en el techo (flujo vertical) o en la pared frontal (flujo horizontal) y que, con una eficiencia del 99.999%, retiene las partículas por debajo de un cierto calibre (generalmente de  $0,2\mu\text{m}$ ).

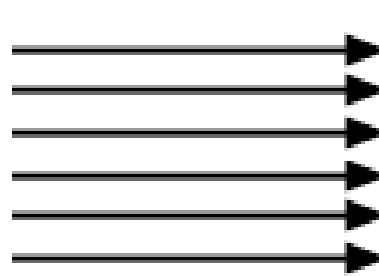


El flujo del aire es laminar, sin turbulencias en las que puedan quedar retenidas partículas contaminantes.

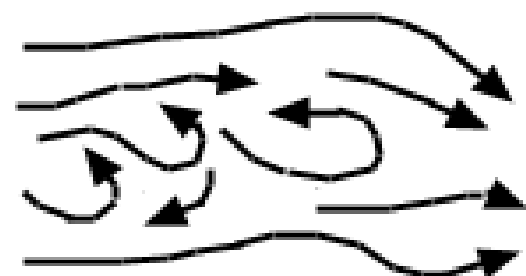
El flujo laminar se asegura por:

- la gran superficie del filtro HEPA
- por la velocidad constante del aire y por la ausencia de fuentes intensas de calor (mecheros bunsen) en el interior de las cabinas, generadores de intensas corrientes de

convección



Flujo laminar



Flujo turbulento

**Fig.1.8.1 - Flujo laminar vs. Flujo turbulento.**



CABINA DE FLUJO LAMINAR  
HORIZONTAL

El flujo de aire sopla hacia el operario, generando una zona esteril de protección al producto

Nivel de protección operador : nulo  
Nivel de protección producto : medio



CABINA DE FLUJO LAMINAR  
VERTICAL

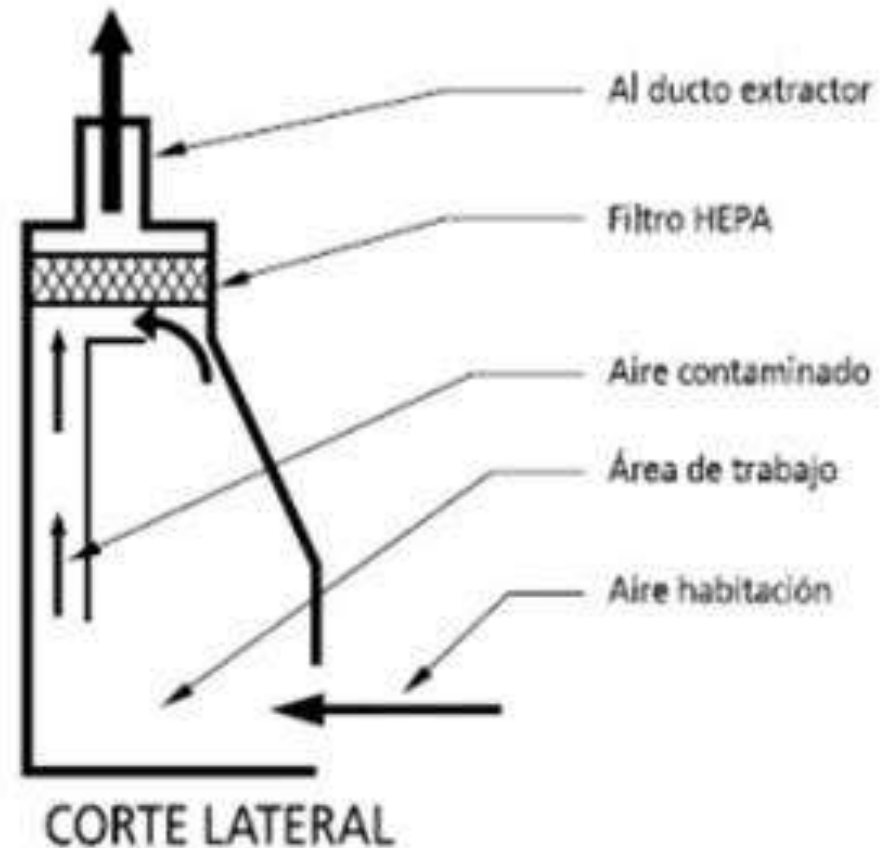
El flujo de aire procede del techo y sopla hacia la superficie de trabajo, generando una zona esteril de protección del producto. Si se aspira aire desde el frontal se crea una barrera de protección al operario

Nivel de protección operador : depende  
Nivel de protección producto : medio/alto

Dependiendo de la importancia que se le conceda a cada uno de estos factores en el diseño de la cabina, ésta se podrá clasificar como de clase I, II ó III

- **Cabina de clase I.** Se trata de una unidad de contención parcial adecuada para la manipulación de agentes de bajo riesgo, donde existe una necesidad de protección del operario y del medio pero no del producto.

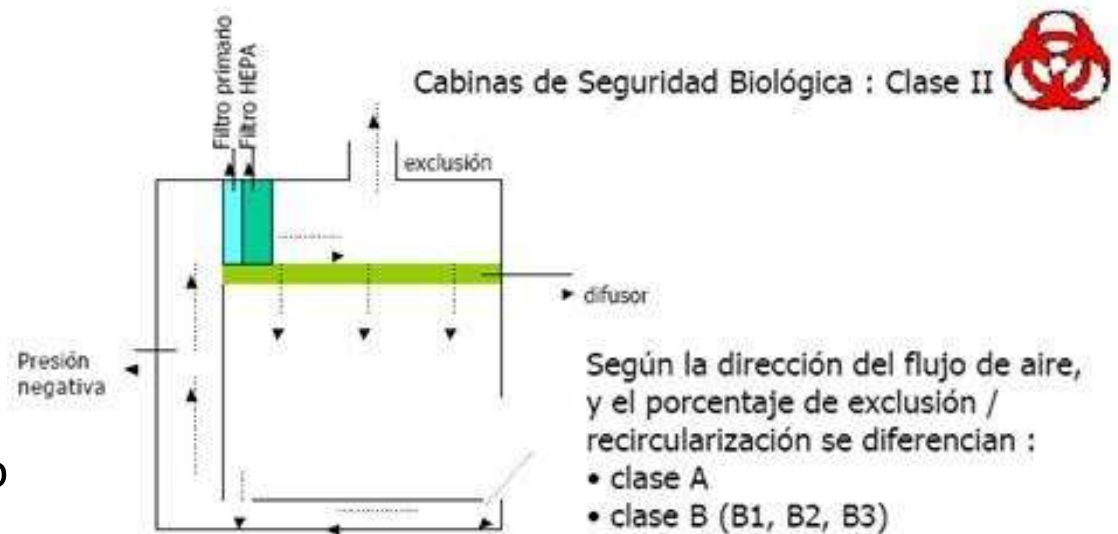
Este es el tipo de cabinas normalmente denominadas "de gases", y no son de uso común en el laboratorio de cultivo de tejidos.



- **Cabina de clase II.** Este tipo de cabinas protegen el producto, al personal y al medio ambiente.

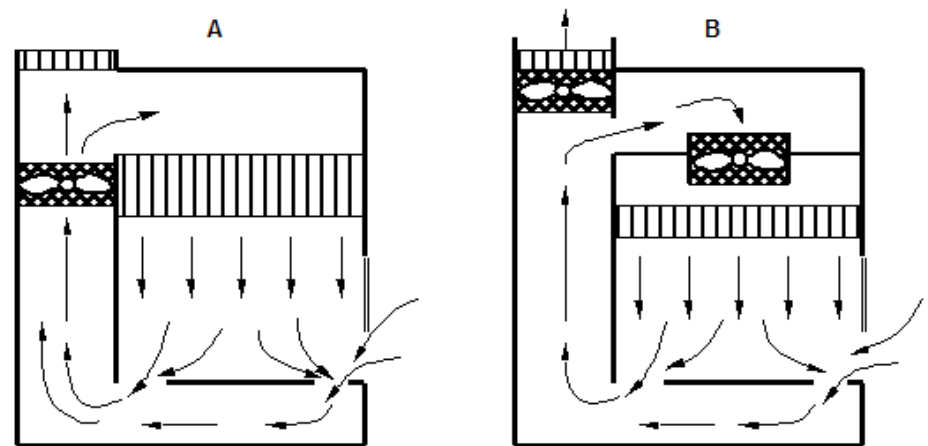
Equipo de protección con un panel frontal de acceso y que mantienen un flujo laminar estable en el interior, con una filtración HEPA para el aire recircularizado en cada ciclo y una filtración HEPA del aire exhausto (de salida al medio).

Las cabinas de tipo II se clasifican en tres subclases:

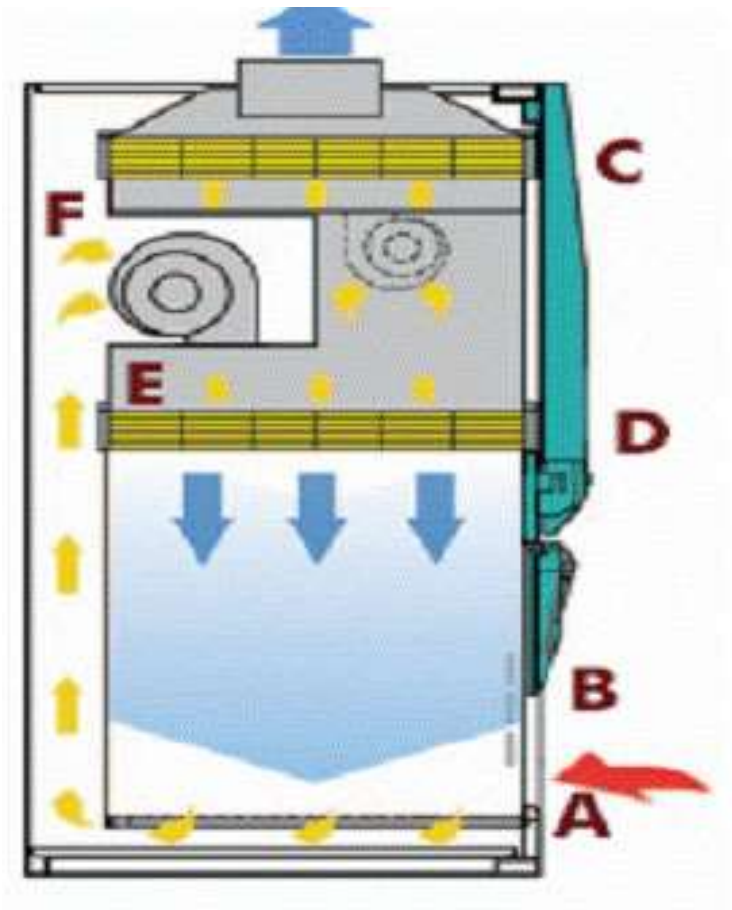


Adecuada para la protección al usuario, al producto y al medio cuando se manipulan agentes biológicos de riesgo de los grupos 2 y 3 (clase II – A y B3)

- Tipo A. En este tipo, el 30% del aire es eliminado en cada ciclo y el 70% es recircularizado. El escape al medio de los agentes potencialmente peligrosos se previene mediante una corriente de aire entrante en una rejilla frontal. f
- Tipo B. Se trata de una cabina de flujo laminar para uso general y en ella se recirculariza sólo el 30% del aire en cada ciclo, eliminándose el 70% del aire restante.
- Tipo 100% exhausto. Se trata de una cabina en la que el 100% del aire de cada ciclo es eliminado hacia dispositivos que puedan retener los posibles agentes peligrosos. Este tipo de cabinas se emplean fundamentalmente en laboratorios de toxicología en los que se requieren áreas de contención limpias y eliminación del aire posiblemente contaminado.



- Las diferencias entre estos tres subtipos se refieren especialmente a la protección del usuario, superior en el caso del tipo A, y a la eliminación de la cabina de posibles contaminaciones de tipo aerosol, no retenibles por el filtro HEPA.
- La tipo A, que es la más adecuada para el trabajo con agentes patógenos particulados (filtrables), es la menos adecuada para el trabajo con vapores o aerosoles peligrosos.

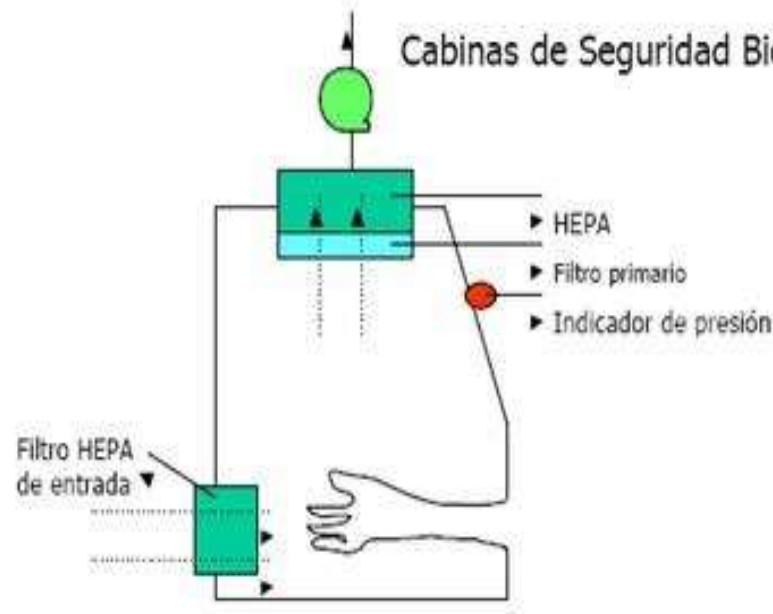




- **Cabina de clase III.** Se trata de una cabina de seguridad, estanca, para el trabajo con agentes biológicos de alto riesgo. Permite mantener al agente patógeno en un ambiente completamente estanco. Permiten controlar tanto los contaminantes particulados como aerosoles y contaminantes gaseosos mediante sistemas de filtración y disolución de éstos.



Estas cabinas están diseñadas para manipular agentes biológicos de los grupos de riesgo 3 y 4.



Adecuada para la protección del usuario y el medio al manipular agentes biológicos de clase 2 - 3.



Habitualmente, la cabina utilizada en esta aplicación es la denominada Clase Bio IIA:

- Protección personal: protección del personal que está manipulando el cultivo.
- Protección del producto, experimento o cultivo que se encuentra en el interior de la cabina de los contaminantes exteriores o de la contaminación cruzada con otros productos o cultivos situados en la misma cabina.
- Protección medioambiental: evitar la salida al medio ambiente de productos o agentes contaminantes.

## SELECCIÓN DE UNA CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

Es preciso tener en cuenta tres cuestiones esenciales:

- ☐ Grupo de riesgo al que pertenece el material manipulado.
- ☐ Riesgo de generación de aerosoles al manipular el material.
- ☐ Grado de protección que se pretende obtener frente al ambiente.

GRUPO DE RIESGO	CLASE I	CLASE II A	CLASE II B	CLASE III
1	TI	TI	TI	TI
2	TI	TI	TI	TI
3	NR	PU	PU	TI
4	NR	NR	NR	TI

**TI:** Totalmente indicada    **PU:** Puede utilizarse    **NR:** No recomendable

# INCUBADORES

Las células en cultivo son capaces de soportar sin daños importantes variaciones de temperatura, siempre que sean por debajo de la temperatura corporal del animal del que proceden.

Así pues, las células humanas soportan incubaciones a 4 °C durante días y pueden ser congeladas a -196 °C durante años (con sustancias criopreservantes).

Sin embargo no sobreviven más de unas pocas horas a variaciones de 2 °C por encima de 37°C.

Las células procedentes de animales poiquiloterms (animales de sangre fría o ectodermos) soportan mejor un amplio rango de temperaturas de incubación.

Las células de homeotermo (animales de sangre caliente o endodermos) suelen crecer bien entre 33 y 37 °C, pero en ese margen presentan importantes variaciones en su tasa de crecimiento.

En un incubador de células es por tanto más importante la consistencia de la temperatura (invariabilidad durante prolongados periodos de tiempo, con oscilaciones inferiores a 0,5 °C) que su precisión a fin de mantener a las células en condiciones en las que las tasas de crecimiento sean constantes.

Por ello se deben usar incubadores con movimiento de aire forzado en el interior, y colocar los contenedores de células sobre estanterías agujereadas y nunca sobre el fondo o las paredes del incubador.

Las necesidades de asepsia en el incubador son considerablemente menores que en el área de trabajo (cabina de flujo laminar) pero sin embargo es muy recomendable mantener una estricta limpieza, desinfección periódica del incubador, y especialmente no introducir, o eliminarlos inmediatamente, cultivos contaminados en el incubador.

Para determinar el número y tipo de incubadores requeridos se debe tener en cuenta:

- El tipo de cultivos a realizar: primarios o de líneas celulares estables. Es conveniente no cultivar en el mismo incubador cultivos primarios con líneas celulares estables, pues los primeros son una importante fuente de contaminación. Las condiciones del cultivo: temperatura, humedad atmosférica y niveles de CO<sub>2</sub> son característicos de cada línea celular.
- La especie y el tipo de células a cultivar. Es importante la determinación exacta de la temperatura de incubación para la que se tendrá en cuenta la temperatura corporal del animal del que proceden las células, así como cualquier variación regional de temperatura (la piel suele tener una temperatura inferior).

# Incubador de CO<sub>2</sub>

Objetivo: mantenimiento de la temperatura en una atmósfera con una tensión controlada de CO<sub>2</sub> y adicionalmente de humedad elevada

Un incubador dispone:

**Dispositivos de control de temperatura**, con un termostato de seguridad que desconecta la función en caso de anomalía. La estabilidad de la temperatura es una característica esencial del incubador.

**Dispositivo de inyección de una mezcla de aire y CO<sub>2</sub>**, en la proporción deseada, entre el 4 y el 7%. El CO<sub>2</sub> de elevada pureza se suministra en botellas presurizadas, y se mezcla en el dispositivo de inyección. El control de la mezcla se realiza fundamentalmente mediante un dispositivo IRGA ("infra-red gas analyzer").

- **Dispositivo de control de la humedad ambiente.**  
Para mantener el cultivo se requiere una humedad ambiente elevada, a fin de reducir la evaporación de agua del medio de cultivo.

En los incubadores menos sofisticados el control de humedad se consigue mediante bandejas de agua en el fondo del incubador. Este recurso es peligroso pues son una fuente importante de contaminaciones al convertirse a los pocos días en caldos de cultivo. En los instrumentos más modernos se dispone de dispositivos que controlan la humedad atmosférica, inyectando agua estéril y filtrada.

- **Dispositivo de recirculación de aire.** Es importante una correcta recirculación del aire en el interior del incubador, a fin de homogeneizar la temperatura en su interior.

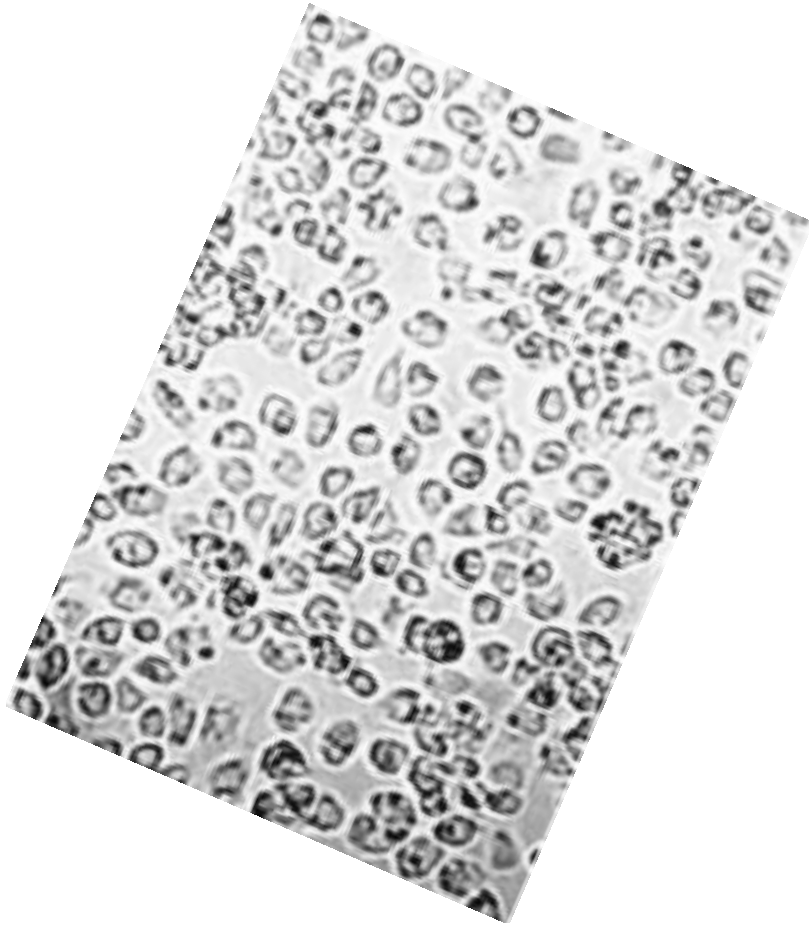
# INSTRUMENTOS ÓPTICOS DE OBSERVACIÓN

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

## Microscopio de contraste de fases invertido



El hecho de que las muestras a observar se encuentren en recipientes de un cierto grosor (más de 3 cm en el caso de frascos de Roux de 250 mL) hace que un microscopio convencional no sea adecuado (por su pequeña distancia frontal), por lo que se han desarrollado microscopios de diseño original, en los cuales la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la platina de un microscopio óptico convencional.



Otra característica que condiciona el instrumento óptico es su **ausencia de color**, es decir, se trata de muestras vivas y con poco contraste.

El microscopio se equipa con el dispositivo de contraste de fases (diafragmas anulares a nivel del condensador y placa de fases entre las lentes del objetivo).

De esta forma, el contraste de la imagen aumenta y la calidad obtenida es muy superior.



# CONGELADORES E INSTALACIÓN DE CRIOGENIA (DEPÓSITO DE N<sub>2</sub> LÍQUIDO)

Es recomendable que los congeladores y la instalación de criogenia estén en recintos separados a la unidad de cultivo propiamente dicha, pues los ventiladores y compresores son una fuente importante de turbulencias y suciedad en el laboratorio.

Es preciso el almacenamiento de soluciones y células a diferentes temperaturas, para lo que se requiere:

- Neveras (4°C) para el almacenamiento de medios, PBS, ...
- Congeladores de -20°C para el almacenamiento de suero, aditivos (glutamina, antibióticos) y soluciones enzimáticas (tripsina, colagenasa, ...)
- Congeladores de -80°C para el almacenamiento a largo plazo de los aditivos del medio (suero, glutamina, antibióticos,...) y de sustancias especialmente sensibles (factores de crecimiento, mitógenos, inductores,...).
- Unidad de almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C) para el almacenamiento de las líneas celulares.



# SISTEMAS Y EQUIPOS DE ESTERILIZACIÓN

## ASEPSIA

La necesidad de asepsia para el cultivo se extiende:

- al medio en que se realiza el trabajo
- a los recipientes en que se realiza
- a los medios líquidos o sólidos y
- a los instrumentos que puedan entrar en contacto con éste en algún momento de su manipulación (pipetas, puntas de pipeta automática, pinzas, tubos, material variado de vidrio...).

Para esterilizar todo este material, de variada naturaleza, se emplean una serie de métodos: irradiación con radiación gamma o rayos X, esterilización por gas, autoclavado, filtración,...

En el laboratorio general de cultivo se suele disponer de un equipo de filtración y autoclave.



# Sistemas De Filtración

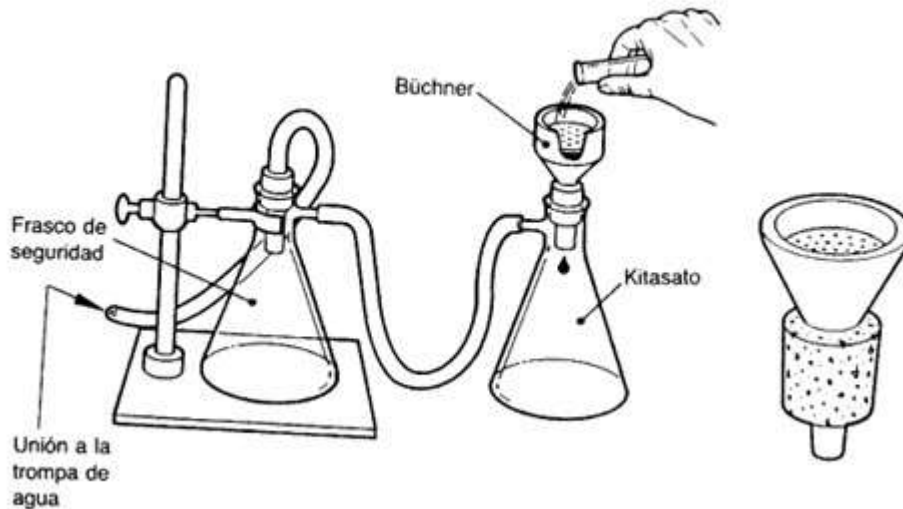
## 1. FÍSICOS

- ☐ Filtración
- ☐ Calor húmedo: autoclave
- ☐ Calor seco: hornos

## 2. QUÍMICOS



# Equipos de filtración



Estos equipos de filtración constan:

- ☐ de una fuente de vacío conectada a un kitasato dotado de una unidad de filtración esterilizada por autoclavado, o
- ☐ de una 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 de 0'22 o 0'1  $\mu\text{m}$  de diámetro

La esterilización se consigue haciendo pasar un líquido o un gas a través de un filtro que retiene los microorganismos.

Los filtros más utilizados son los de membrana, también denominados de superficie. Son elaborados generalmente de acetato de celulosa o nitrocelulosa y contienen poros de tamaño uniforme.

Ventaja: se conoce exactamente el tamaño de poro que presentan, por lo que se pueden seleccionar filtros capaces de retener la totalidad de los microorganismos presentes en una solución.

Desventaja: se saturan rápidamente y la velocidad de filtración a través de ellos es lenta.

Para que la filtración tenga un efecto esterilizante se puede usar un filtro que tenga un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . La mayor parte de los filtros de membrana se pueden esterilizar en autoclave y luego se manipulan asépticamente al ensamblar el equipo.

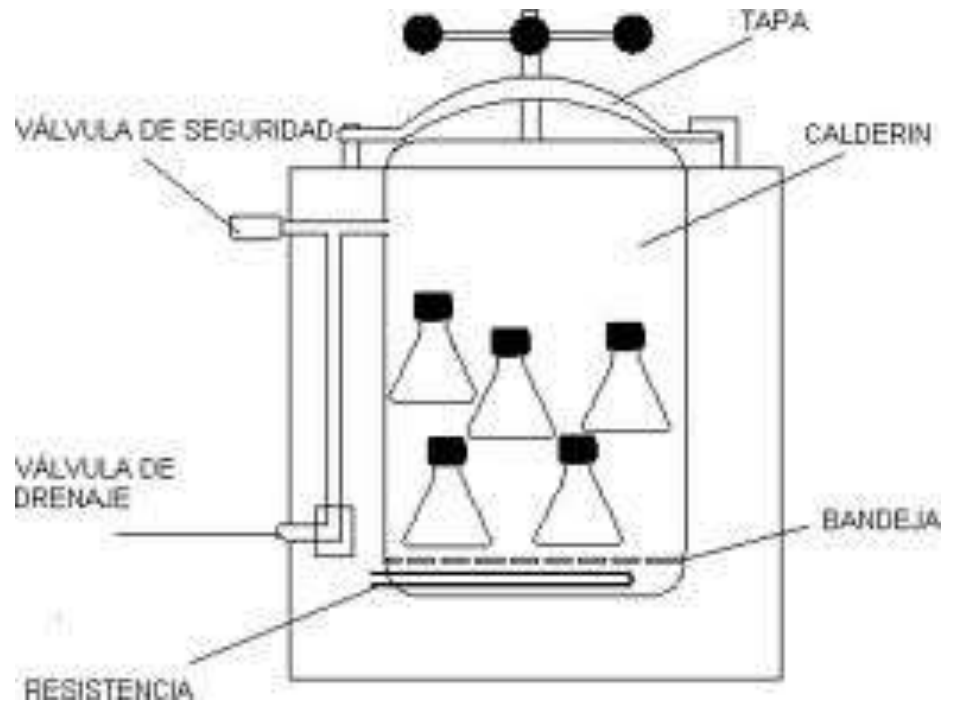
Se usa para materiales sensibles al calor: medios de cultivo, sueros, soluciones con antibiótico, azúcares, suplementos, etc.

# Autoclave

Un autoclave es un instrumento que permite la esterilización por calor tanto de sólidos como de líquidos.

La esterilización se realiza habitualmente a  $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atmósfera de sobrepresión durante un tiempo superior a 20 min.

Un autoclave de uso normal en el laboratorio de cultivo de tejidos suele disponer de temporizador y regulador de presión y, en algunos casos, de un ciclo de secado para permitir secar el material sólido (material de vidrio, instrumentos quirúrgicos, tubos,...)



Un autoclave de laboratorio es un dispositivo que sirve para esterilizar material de laboratorio, utilizando vapor de agua a alta presión y temperatura, evitando con las altas presiones que el agua llegue a hervir a pesar de su alta temperatura.

El fundamento del autoclave se basa en la coagulación de las proteínas de los microorganismos debido a la presión y temperatura.

Debemos tener en cuenta que algunas formas acelulares, como los priones, pueden soportar las temperaturas del autoclave.

Los autoclaves funcionan permitiendo la entrada o generación de vapor de agua pero restringiendo su salida, hasta obtener una presión interna de 103 kPa, lo cual provoca que el vapor alcance una temperatura de 121 °C.

Un tiempo habitual de esterilización esta temperatura y presión es de 15-20 minutos.

# Horno Pasteur

Hornos que alcanzan temperaturas de  $200^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas.

La esterilización se alcanza con  $T^{\circ}$  de  $160\text{-}180^{\circ}\text{C}$  durante 2-3 horas.

Se usa para esterilizar material de vidrio (probetas, matraces, pipetas, etc.), de porcelana y metálico.





# Mechero Bunsen

Equipos de esterilización por llama que tienen la característica de poder regular el tiempo que mantiene la llama encendida.

Este tipo de mecheros sí pueden ser totalmente válidos para su trabajo dentro de cabina de flujo, ya que la permanencia de la llama se reduce a un tiempo bastante limitado de uso (generalmente 3- 5 segundos)



# ESTERILIZACIÓN ☐ Químicos

**Óxido de etileno:** Se debe combinar con CO<sub>2</sub>. Tiene gran poder de penetración. Es importante airear los elementos antes de ser utilizados ya que es tóxico y mutágeno.

**Glutaraldehído:** Se utiliza al 2% en solución acuosa. Bactericida, tuberculocida y viricida en 10 min. Tiene efecto esporicida pero necesita de 10 h a temperatura ambiente. Luego de su uso se deben enjuagar los elementos con abundante agua estéril. Se utiliza para objetos de plástico e instrumentos de cirugía y tejidos.

**Formaldehído:** Se utiliza para desinfección, pero debe ser utilizado con guantes y en laboratorios con campanas de nivel I. Uso muy restringido. Los materiales deben seguir el mismo tratamiento que para el óxido de etileno y el glutaraldehído.

# Mecanismos de acción

## Alteración del DNA

- o Radiaciones (UV, ionizantes)
- o Alquilantes (glutaraldehído, formaldehído y óxido de etileno)

## Alteración de proteínas y enzimas

- o Calor, ácidos y álcalis
- o Oxidantes: peróxido de hidrógeno, Iodo
- o Metales pesados: mercurio

## Alteración de la membrana celular

- o Alcoholes
- o Fenoles
- o Agentes tensoactivos (amonios cuaternarios, jabones, detergentes)

# Factores que afectan la potencia del desinfectante

**Tiempo:** depende de la concentración del agente y del tipo de microorganismos a eliminar, pues no todas las bacterias mueren al mismo tiempo.

**Temperatura:** normalmente al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes. Depende del agente para determinar su eficacia con el aumento de temperatura.

**pH:** el cual afecta tanto a la carga superficial neta de la bacteria como al grado de ionización del agente. En general, las formas ionizadas de los agentes disociables pasan mejor a través de las membranas biológicas y por lo tanto, son más efectivos.

**Concentración del agente:** a partir de la cual se obtendrá un efecto deseado. El rango de concentraciones en que se puede demostrar un efecto específico dependen del tipo químico del desinfectante, del método de ensayo del efecto, y del tipo de microorganismo a eliminar.

**Presencia de materia orgánica:** como por ejemplo sangre, suero o pus, afecta negativamente la potencia de los desinfectantes de tipo oxidante y a los desnaturalizantes de proteínas, hasta el punto que pueden llegar a hacerlos inactivos en cuanto a su poder desinfectante y/o esterilizante.

**Características del microorganismo:** como especie empleada, número de microorganismos iniciales, resistencia del microorganismo, entre otras

# PIPETEADORES



- ☐ Se trata de dispositivos o instrumentos para el trasvase o medición de fluidos.
- ☐ Los de uso común en el laboratorio como las pipetas automáticas y las pipetas, pero con la salvedad del uso de bombas acopladas a la pipeta, manuales o eléctricas que permiten la aspiración mecánica del fluido.
- ☐ Importante para mantener la asepsia y al mismo tiempo para la protección del operador. El aire bombeado es filtrado previamente.

# CENTRÍFUGAS

En el laboratorio de cultivo es necesario disponer de una centrífuga refrigerada, preferentemente con posibilidades de usar en ella desde tubos de pequeño volumen (1 a 2 mL) a botellas de gran capacidad (250 a 500 mL).

Normalmente, para la mayor parte de las aplicaciones bastará con un instrumento que desarrolle hasta  $2000 \times g$ .

La centrífuga se debe instalar, en la medida de lo posible, alejada de las cabinas de flujo laminar para evitar las turbulencias de aire que genera.



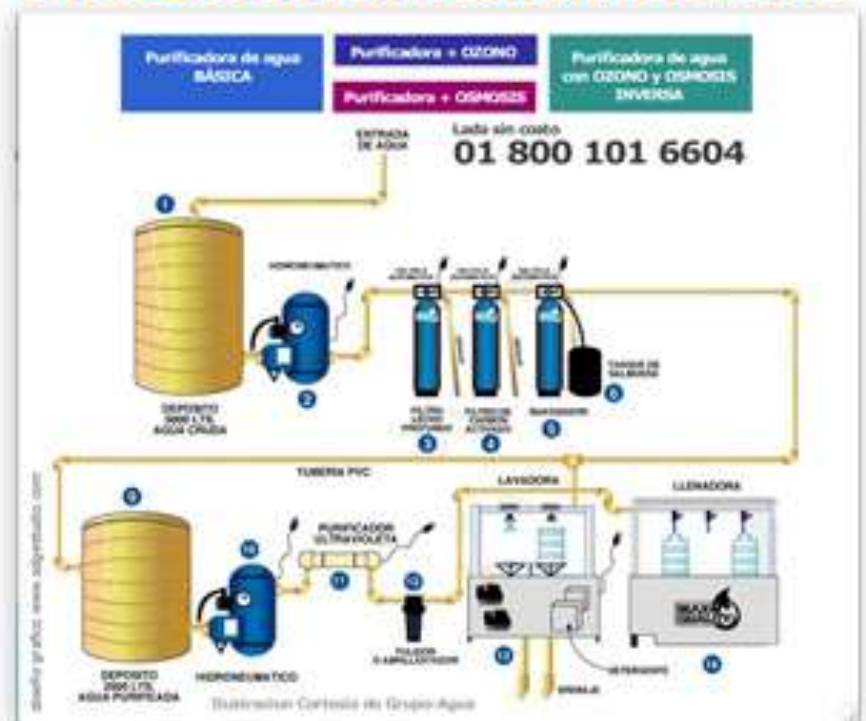
# EQUIPO DE PURIFICACIÓN DE AGUA

Es de gran importancia en la preparación de los medios, de los aditivos, o en cualquier solución que pueda estar en contacto con el cultivo, una absoluta esterilidad y ausencia de sustancias que puedan provocar alguna alteración al cultivo.

Se utiliza siempre agua de la máxima calidad (tipo MilliQ: Agua ultra pura, con grado de laboratorio que ha sido filtrada y purificada por ósmosis inversa, cuyo nombre se debe al tratamiento comercial patentado ) obtenida mediante equipos de doble destilación o de intercambio iónico y filtración.

Es muy importante la eliminación de apirógenos, y restos de materia orgánica.

## SELECCIONE SU EQUIPO PROCESO DE PURIFICACIÓN DE AGUA



# Agua En El Laboratorio

La contaminación de cultivos y la muerte celular son un problema importante que, en última instancia, puede afectar a los experimentos posteriores.

La calidad del agua desempeña un papel importante en los resultados de los experimentos con cultivos celulares y se utiliza a lo largo de todo el proceso de cultivo celular. No solo es el principal componente de los tampones y medios, sino que también se utiliza para la disolución de aditivos y fármacos, etc.

Debe utilizarse agua ultrapura apirogénica (tipo I) para la preparación de medios y tampones a fin de garantizar que las células estén libres de contaminantes bacterianos, hongos y virus. La contaminación del cultivo celular por iones metálicos, endotoxinas, bacterias u hongos puede afectar al cultivo directa o indirectamente (por ejemplo, cambios en el pH).

Existe la falsa creencia que el Agua Destilada es lo mismo que el Agua Desmineralizada. Si bien la pureza es casi idéntica, la diferencia radica en el proceso por el cual se llega a una u otra.

En el destilada básicamente lo que sucede es que se calienta el agua hasta alcanzar temperatura de ebullición (destilación).

En la desmineralizada es necesario un tratamiento específico (con resinas de intercambio iónico) para la eliminación de sales y minerales, que pueden interferir en los resultados de las pruebas.



# **LA CALIDAD DEL AGUA PARA FINES ANALÍTICOS**

<https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/82768/Gonzalez%20Ruiz,%20Mar%EDa%20Luisa.pdf;jsessionid=20CAC280E9ACD35CB656BAE34AD7FAD6?sequence=1&isAllowed=y>

# MAGDEM

□ Equipo desarrollado para automatizar los procedimientos manuales utilizados en el tratamiento en los cultivos celulares.

El equipo está compuesto de dos partes:

- a) Generador de campo magnético
- b) Scrapers móviles (FLYcons)



Recipiente para el cultivo con FLYcons

Generador de campo magnético

- MAGDEM: sistema magnético-mecánico que gracias a un movimiento repetitivo producido por un campo magnético al azar mueve unas espátulas (Flycons) que despegan las células adherentes al plástico.

Como recipientes se puede utilizar con placas petri, flasks y placas multipocillo. Es un sistema rápido y sencillo que se puede estandarizar para cualquier línea celular.

Los FLYcons están fabricados en un plástico inerte biológico.

El tamaño que tienen les permite moverse por toda la superficie que se ha de “scrapear” (buscar).

Son estériles e inertes (biocompatibles), por lo que pueden permanecer en el cultivo por cierto tiempo, sin interferir en el mismo y podrán ser reutilizados.



# CONTADOR ELECTRÓNICO DE CÉLULAS ("cell counter")

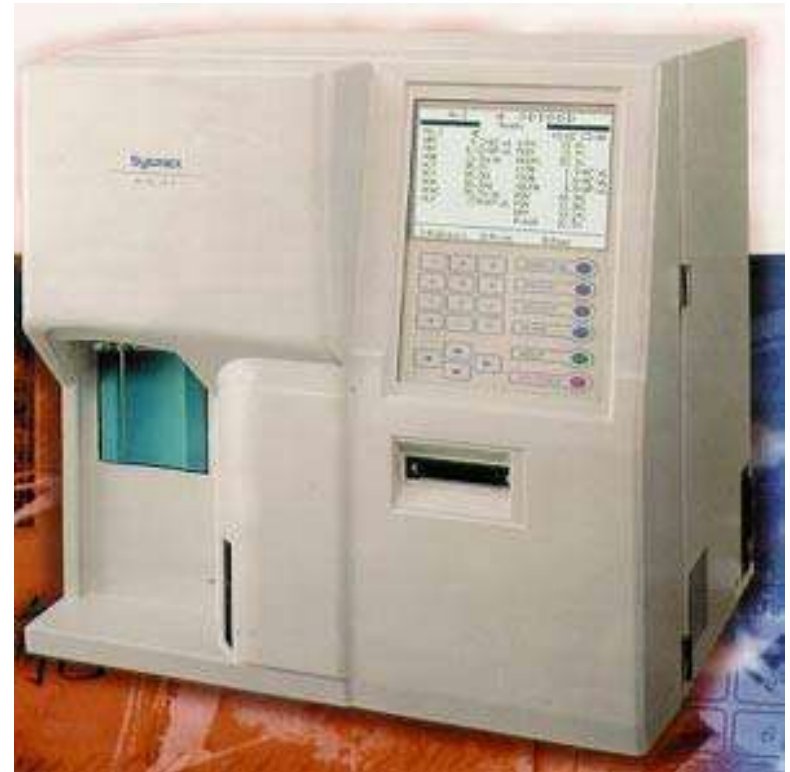
Un contador electrónico de células es un instrumento capaz de contar y medir partículas en suspensión.

El sistema está formado por los siguientes elementos:

- Dos electrodos, uno en el interior de un tubo con un pequeño orificio que se introduce en la suspensión de partículas a contar, y un segundo electrodo que se introduce directamente en dicha suspensión.

El tubo con el orificio está conectado a un manómetro de mercurio y a una bomba. El manómetro controla, mediante el desplazamiento del mercurio, la conexión y desconexión de los electrodos.

- Un amplificador electrónico de la señal.
  - Un analizador de altura de los pulsos,
  - Y una escala
- Todos ellos conectados a los electrodos.



# Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares

<https://www.insst.es/documents/94886/328579/902w.pdf/abbb0298-88b6-405a-9d99-e22cfd0474c4>