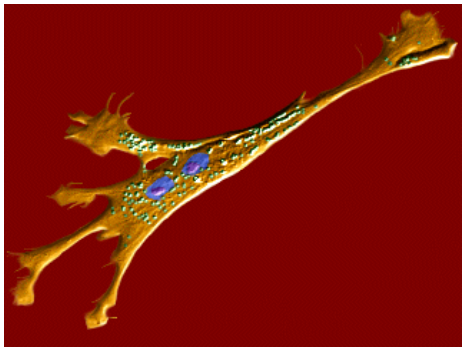
Introducción al cultivo de tejidos

Versión 1.11



1. Introducción histórica 3
2. ¿Qué entendemos por cultivo de tejidos? 5
   - 2.1 Tipos de cultivos de tejidos 6
   - 2.2 Tipos de células 7
3. Ventajas y limitaciones 9
4. Aplicaciones 11
5. Establecimiento de un cultivo celular 13
6. Bancos y colecciones de líneas celulares 15
7. Almacenamiento de células 17
8. El laboratorio 19
   - 8.1. Cabina de flujo laminar 20
   - 8.2. Incubador de CO_2 21
   - 8.3. Microscopios 22
   - 8.4. Congeladores y equipo de criogenia 23
   - 8.5. Equipo de esterilización y filtración 24
   - 8.6. Otros instrumentos 25
9. El substrato y el medio de cultivo 27

Apéndices 29
Apéndice A: Términos
Apéndice B: Bibliografía
Apéndice C: Historial
Apéndice D: Mejoras pendientes de realizar

1. Introducción histórica

En el siguiente cuadro se muestran algunos de los hechos históricos más relevantes en el desarrollo de las técnicas y métodos de cultivo de tejidos

1885	Roux	Consiguió mantener durante días células de embrión de pollo en una solución salina
1907	Harrison	Utilizó técnicas de estudio *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, y demostró el crecimiento de fibras nerviosas en cultivo
1910	Burrows	Empleó plasma de pollo para nutrir los cultivos embrionarios de pollo
1913	Carrel	Demostró la posibilidad de mantener en cultivo células de embrión de pollo, en condiciones de asepsia, durante un tiempo superior a la vida del animal
1916	Rous y Jones	Utilizaron por primera vez extractos enriquecidos en tripsina para disociar células de los tejidos
1948	Sanford y cols.	Demuestran la formación de clones celulares
1952	Gey y cols.	Establecen la primera línea celular humana contínua, las células HeLa
1954	Levi-Montalcini y cols.	Determinan que el factor de crecimiento nervioso (NGF) estimula el crecimiento de axones en cultivo
	Abercrombie y cols.	Observan la inhibición de crecimiento por contacto en fibroblastos
1955	Eagle	Desarrolla medios definidos y describe factores de adhesión
1958	Temin y Rubin	Desarrollan un ensayo cuantitativo para la infección de células de pollo en cultivo por el virus del sarcoma de Rous
1961	Hayflick y Moorehead	Describen la vida finita de las células humanas diploides
1962	Buonassisi	Publica los métodos para mantener células diferenciadas
1964	Littlefield	Introdice el medio HAT para el crecimiento selectivo de células híbridas, y desarrolla las técnicas de fusión celular
1965	Ham	Utiliza el primer medio definido libre de suero
	Harris y Watkins	Producen el primer heterocarion de células de mamífero por la fusión inducida por virus de células humanas y de ratón
1968	Yaffe	Estudia la diferenciación de mioblastos normales *in vitro*
1969	Augusti-Tocco y Sato	Establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma, línea de celulas diferenciada
1975	Köhler y Milstein	Establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales
1976	Sato y cols.	Publican una serie de trabajos que demuestran las distintas necesidades de hormonas y factores de crecimiento que precisan diferentes líneas celulares
1977	Wigler y Axel	Desarrollan un método eficiente para introducir una copia simple de genes de mamífero en células en cultivo
1986	Martín y Evans	Aíslan y cultivan células madre embrionarias pluripotenciales del ratón
1998	Thomson y Gearhart	Aíslan células madre embrionarias humanas

2. ¿Qué entendemos por cultivo de tejidos?

Podemos decir que es el conjunto de técnicas que nos permiten mantener células *in vitro* con una gran aproximación a sus propiedades y funciones *in vivo.*

Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido u órgano de origen y del tiempo de su duración distinguimos diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios, secundarios, etc.

El término “cultivo de tejidos” suele ser usado como un término genérico que incluye el de cultivo de órganos y el de cultivo de células.

2.1 Tipos de cultivos de tejidos

- **Cultivo de órganos**: En este tipo de cultivo la organización tridimensional del órgano *in vivo* se mantiene, aunque sólo sea parcialmente, y mantiene todas o algunas de las características histológicas del tejido original. El órgano o porción del mismo se mantiene en un medio líquido del que extrae los nutrientes y al que elimina los desechos metabólicos. Los diferentes tipos de células se mantienen en su forma diferenciada y constituye una buena réplica del órgano original. Pero, sin embargo, generalmente no permite la propagación, ya que el crecimiento de células se produce únicamente en la periferia. Normalmente este tipo de cultivo es difícil de mantener durante un tiempo prolongado debido a las diferencias potenciales de crecimiento de los distintos tipos celulares que constituyen el órgano. La falta de propagación tiene como consecuencia que para repetir el experimento se necesite nuevo material, por lo que se produce cierta heterogeneidad de muestras.

- **Explantes primarios**: Constituidos por fragmentos pequeños de tejidos u órganos que se adhieren a una superficie en la que generalmente crecen las células más periféricas del explante. Un cultivo se denomina **cultivo primario** cuando las células o tejidos procedentes de un ser vivo crecen sin haber pasado previamente por una fase de crecimiento *in vitro*. Un cultivo se denomina **cultivo secundario** cuando procede de una fase previa de crecimiento *in vitro*.

- **Cultivo de células**: Este tipo de cultivo está formado por células dispersas disgregadas de un tejido vivo, de un cultivo primario, o de una línea celular, mediante distintos sistemas mecánicos, químicos o enzimáticos. Las células crecen en suspensión o adheridas a una superficie. Generalmente son cultivos que contienen un único tipo de célula y éstas suelen ser homogéneas genéticamente. Es el tipo de cultivo más utilizado en la actualidad debido a su capacidad de propagación, es decir de crecimiento mantenido.

Hablamos de **cultivos histotípicos** cuando las células son reagrupadas para recrear una estructura tridimensional parecida al tejido original

- Cultivos de alta densidad sobre un pocillo filtro
- Perfusión y sobrecrecimiento de una monocapaen frasco o en disco
- Reagregación en suspensión sobre agar o en gravedad cero real o simulada
- Infiltración de una matriz tridimensional como el gel de colágeno

Un **cultivo organotípico** implica los mismos procedimientos anteriores pero combinando células de diferentes linajes que constituyen un órgano

2.2 Tipos de células

Las células que se suelen utilizar en cultivos pertenecen generalmente a uno de estos grupos:

TIPO CELULAR
Epiteliales
Tejido conjuntivo
Tejido muscular
Tejido nervioso
Sangre y tejidos linfoides
Células madre embrionarias

3. Ventajas y limitaciones

Las principales ventajas de la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos son:

- **Control del medio extracelular**. Podemos controlar en un cultivo distintos factores como: pH, temperatura, humedad, presión osmótica, tensiones de O_2 y de CO_2, concentración de nutrientes, etc.
- **Homogeneidad de la muestra**. Las células de un cultivo son bastante homogéneas en comparación con la variabilidad existente entre animales de experimentación.
- **Disminución del gasto**. Si se experimenta con fármacos, al utilizarse cultivos de células se utilizan concentraciones muy bajas de dichos productos. Recientemente la utilización de sistemas robotizados que utilizan pequeños volúmenes, permite la realización de determinados trabajos que necesitan un gran número de determinaciones repetitivas en diferentes tiempos o con diferentes concentraciones de productos.
- **Disminución de la necesidad de realizar ensayos *in vivo***. Evitándose, aunque no completamente, el sacrificio de animales de experimentación.
- **Desarrollo de cultivos histotípicos y organotípicos** que incrementan la fiabilidad de los modelos experimentales

Categoría	Ventaja
Fisicoquímica ambiental	Control del pH, temperatura, osmolaridad, gases disueltos
Condiciones fisiológicas	Control de la concentración de hormonas y nutrientes
Micromedioambiente	Regulación de la matriz extracelular, de la interacción célula-célula, de la difusión de gases
Homogeneidad de la línea celular	Existencia de medios selectivos, clonación
Caracterización	Citología, inmunomarcaje
Preservación	Almacenamiento en nitrógeno líquido
Validación y acreditación	Se puede monitorizar el origen, la historia, la pureza
Replicación y variabilidad	Fácil cuantificación
Ahorro de reactivos	Uso de volúmenes reducidos, acceso directo , bajos costes
Control de concentración y tiempo	Posibilidad de definir dosis, concentraciones y tiempos
Mecanización	Posible con robótica y microtitulación
Reducción del uso de animales	Estudios de citotoxicidad, screening de fármacos, cosméticos ,...

Pero también existen limitaciones como:

- **Excesiva sensibilidad**. El crecimiento de las células es relativamente lento y es dependiente en muchos casos de factores no del todo conocidos. Además, existen contaminantes como hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas y virus que suelen tener un crecimiento más rápido y pueden llegar a matar las células en cultivo.
- **Límite de producción**. Generalmente el límite de producción de un laboratorio normal es menor a 10g de células.
- **Inestabilidad**. Muchas líneas celulares contínuas son inestables por ser aneuploides.
- **Validación del modelo**. Cuando realizamos un modelo en cultivo celular, estamos utilizando un conjunto de células disgregadas cuyo origen fue de un tejido, pero que se diferencia de éste por que:

- Se ha perdido la organización tridimensional espacial propia del tejido original
- Se han perdido las interacciones heterotípicas, entre los distintos tipos celulares y entre las células y la matriz extracelular
- Carece de los sistemas de regulación *in vivo* y especialmente de los constituyentes del sistema nervioso y del sistema endocrino

Por lo tanto deberemos de confirmar el modelo en cultivo respecto de los resultados en modelos *in vivo*.

Categoría	Ejemplos
Necesidad de experiencia	Manejo Contaminación química Contaminación microbiana Contaminación cruzada
Control ambiental	Lugar de trabajo Incubación, control del pH Contenedores y deshecho de contaminantes biológicos
Cantidad y costo	Equipamientos Fungibles Medio, suero, plásticos
Inestabilidad genética	Heterogeneidad, variabilidad
Inestabilidad fenotípica	Desdiferenciación Adaptación Selección
Identificación del tipo celular	Expresión de marcadores Histología, citología Geometría y micromedioambiente

4. Aplicaciones

Con las técnicas de cultivo de tejidos se pueden abordar distintas aproximaciones al estudio de la célula desde diferentes puntos de vista. Destacamos los estudios y procesos relacionados con:

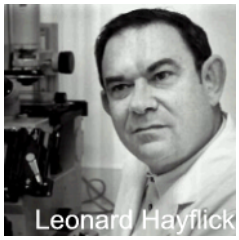
Actividad intracelular	Replicación y transcripción de ADN Síntesis proteica Metabolismo energético Metabolismo de drogas Ciclo celular Diferenciación Apoptosis
Movimiento intracelular de moléculas	ARN Traslocación de receptores hormonales Metabolitos Calcio Transducción de señales Tráfico de membranas
Interacción célula-célula	Morfogénesis Control paracrino Cinética de proliferación celular Cooperación metabólica Adhesión celular y desplazamiento celular Interacción con la matriz extracelular Invasión Modelos organotípicos de prótesis médicas
Interacción con el medio extracelular	Nutrición Infección Acción de drogas Interacciones ligado-receptor Citotoxicidad Mutagénesis Carcinogénesis
Genética	Análisis genético Manipulación genética Transfección Infección Transformación Inmortalización Senescencia
Productos celulares y tisulares	Secreción Biotecnología Diseño de biorreactores Recoleccion de productos Tejidos artificiales

5. Establecimiento de un cultivo celular

El cultivo primario consistirá probablemente en un mayor o menor número de células de diferentes tipos con diferentes capacidades de crecimiento. Para la mayor parte de los experimentos es necesario utilizar un único tipo celular. Por lo tanto se deberá de seleccionar el tipo celular necesario. Para ello podremos:

- Dejar las células crecer. Las células de crecimiento más rápido tomarán la dominancia del cultivo
- Controlar la composición del medio de crecimiento. La adición de factores de crecimiento o de inhibidores del crecimiento podrá seleccionar ciertos tipos celulares
- Separar las células mediante gradientes de densidad

Una vez seleccionado eltipo celular podemos mantener el cultivo durante un período de tiempo variable que depende del tipo y del origen de las células.



Hayflick y Moorehead estudiaron el potencial de crecimiento de células embrionarias humanas y comprobaron que las células podían crecer, mediante subcultivos repetidos, durante unas 50 generaciones. Pasado este tiempo, las células entran en senescencia y pierden la capacidad de dividirse. Por lo tanto las células tienen una capacidad finita de divisiones mitóticas y este número se llama **límite de Hayflick**. Este número de divisiones permanece fijo incluso si se criopreservan las células durante largo tiempo.

La capacidad de crecimiento está relacionada con el origen de las células, así, las células derivadas de tejidos embrionarios tienen un límite de crecimiento mayor que las procedentes de tejidos adultos.

Una **célula "normal"**, necesaria en determinadas experiencias, podemos decir que es aquella que:

- Posee un número diploide de cromosomas (46 en la especie humana)
- Generalmente es dependiente del anclaje a un substrato para su crecimiento. Las células crecen hasta que se confluyen en una monocapa de células que ocupa todo el substrato. Generalmente las células linfoides y hematopoyéticas crecen en suspensión o en medios semisólidos
- Tienen una vida finita
- No son cancerosas

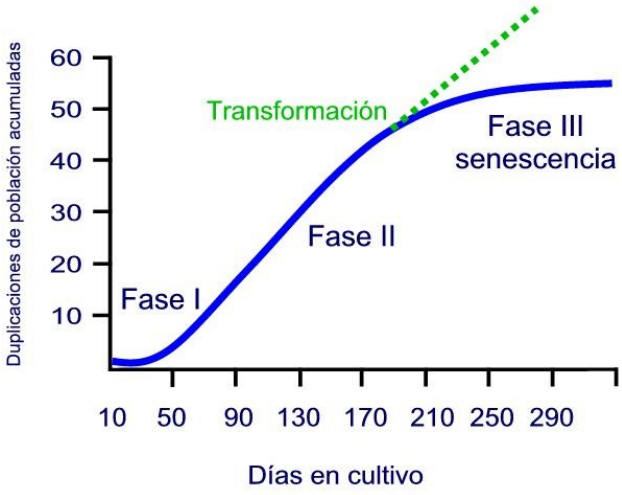
En este proceso de establecimiento de un cultivo celular se procede a la selección de un tipo celular determinado que:

- ha debido de superar los procesos de disgregación enzimática y/o mecánica
- posee la capacidad de crecer adherido a un substrato o de crecer en suspensión
- es capaz de responder a factores estimulantes o inhibitorios del crecimiento añadidos al medio
- tiene una tasa de crecimiento alta

Por lo tanto, cambiando estos factores variarán también las células seleccionadas. A veces las células normales, tras la confluencia, pueden diferenciarse y adquirir características morfológicas y funcionales parecidas a las células de origen.

El crecimiento de las células se detiene también tras la confluencia y es necesario dividir, propagar o subcultivar las células. Generalmente en cultivos primarios la dilución es aproximadamente de ½ a ¼. Para ello se despegan las células del substrato, se cuentan, se ajusta la concentración y se depositan sobre el nuevo substrato con la cantidad de medio ajustada a la concentración de células. Tras un número de pases determinado, según el límite de Hayflick, el cultivo entra en una fase de senescencia, con crecimiento lento, con acumulación de anomalías, perdidas de funciones, etc..., que conducen a la muerte del cultivo.

Ocasionalmente el cultivo primario se puede mantener durante más tiempo del esperado y esto se debe a la aparición de células inmortales en el cultivo, es decir, células que adquieren la capacidad de crecimiento infinito y a esa población se le llama **línea celular establecida** o **línea celular contínua**. Esto requiere que las células pasen por un proceso llamado **transformación** que hace perder a las células su sensibilidad al estímulo asociado con el control del crecimiento.



Existe una correlación positiva entre la aparición de aneuploidías y la transformación de las células. También se puede establecer como regla que una línea celular es más fácil de establecer o cultivar cuanto más indiferenciada sea, a excepción de las líneas tumorales de células diferenciadas.
Las células de un cultivo primario pueden transformarse o inmortalizarse, además, por el tratamiento con mutágenos, virus u oncogenes.

6. Bancos y colecciones de líneas celulares

Para muchos experimentos pueden obtenerse diferentes tipos de líneas celulares de colecciones o bancos que poseen centenares de líneas perfectamente caracterizadas. Generalmente es más fácil adquirir una determinada línea celular que establecerla experimentalmente.

En la tabla siguiente se muestran algunas de las líneas celulares más frecuentemente utilizadas.

TIPO CELULAR	Líneas celulares
Epiteliales	A-253, CHO, HeLa, MDCK, PtK1
Tejido conjuntivo	3T3, BHK, COSD, L, MRC-5, Vero, WI-38
Tejido muscular	L6
Tejido nervioso	NB41A3
Sangre y tejidos linfoides	K562, Namalwa, MPC-11, U937
Células madre embrionarias	E14.1, H1, H9, R1

Las dos colecciones o bancos de líneas celulares más importantes son:

- American Type Culture Collection (ATCC)
- European Collection of Cell Cultures (ECACC)

7. Almacenamiento de células

Las células procedentes de cultivos primarios o de líneas celulares establecidas pueden almacenarse durante largos períodos de tiempo en temperaturas bajo cero. Para ello se utilizan sistemas criogénicos como veremos en el apartado siguiente. Con la criopreservación se favorece:

- El mantenimiento de células sin tener que utilizar tejidos animales primarios
- Evitar la pérdida de la línea por contaminación
- Evitar la pérdida de la línea por cambios genéticos

8. El laboratorio

Lo más característico de un laboratorio de cultivo de tejidos es el mantenimiento de la asepsia. El área de trabajo para realizar cultivos debería de estar en una habitación aislada, aunque la aparición de las cámaras de flujo laminar ha reducido estas necesidades de aislamiento. La estructura y condiciones ambientales de un laboratorio de cultivo celular varía notablemente entre aquel que trabaja con agentes patógenos –bacterias, virus, etc- y aquel que no los utiliza. En el primer caso las condiciones son más estrictas e incluso se debe de filtrar el aire que sale de la habitación de cultivos.

A continuación mostramos algunos de los instrumentos o equipos más usados en un laboratorio de cultivo de tejidos

8.1. **Cabina de flujo laminar**

La función de estas cabinas es mantener el área de trabajo donde manipulamos las células libres de contaminantes. Para ello un motor fuerza el paso del aire por un filtro de gran superficie (filtro HEPA) que está situado en el techo, **flujo vertical**, o en la pared frontal, **flujo horizontal**. Con ello se consigue una retención de partículas del 99.999% por debajo generalmente de un grosor de 0.2µm. El flujo del aire es laminar, es decir, sin turbulencias donde puedan quedar retenidas partículas contaminantes.

Existen diferentes tipos de cabinas de flujo laminar que tienen como fines generales:

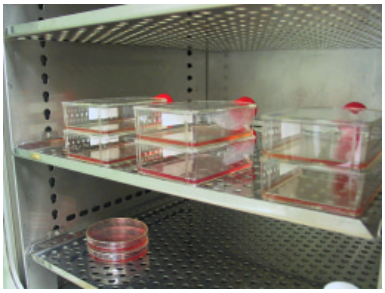
- **Proteger al operario** de agentes patógenos o contaminantes del interior de la cabina
- **Proteger el cultivo** de patógenos o contaminantes externos o internos de la cabina
- **Proteger el medioambiente** de patógenos o contaminantes del interior de la cabina

Según importancia de la protección de estos tres elementos se distinguen cabinas de clase I, II y III:

- Clase I: Protege al operario y al medioambiente (campanas de gases)
- Clase II: Protegen al operario, el cultivo y el medioambiente
- Clase III: Cabina de seguridad estanca para trabajo con agentes biológicos de alto riesgo

Para más información sobre seguridad biológica y cabinas de flujo laminar (Primary Containment for Biohazards: Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets, CDC y NIH. 1995)

8.2. **Incubador de CO_2**

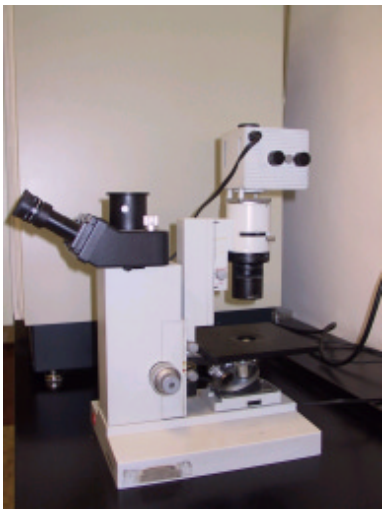


Además de otros sistemas incubadores de temperatura controlada como estufas y baños termostatados, los incubadores más característicos del laboratorio de cultivo de tejidos son los incubadores de CO_2. Esto son equipos que mantienen la **temperatura**, además poseen un sistema de inyección de **CO_2** generalmente entre 4-7%, y finalmente controlan la **humedad** ambiente. Es muy importante la estabilidad de la temperatura ya que las células suelen resistir bajadas de la temperatura, pero son muy sensibles a aumentos por encima de la temperatura del animal de origen. Para homogeneizar la temperatura interna, algunos incubadores poseen un dispositivo de recirculación de aire que garantiza la homogeneidad de la temperatura en el interior de la cámara. El nivel de CO_2 se ajusta para mantener equilibrio carbonato-bicarbonato del medio de cultivo.

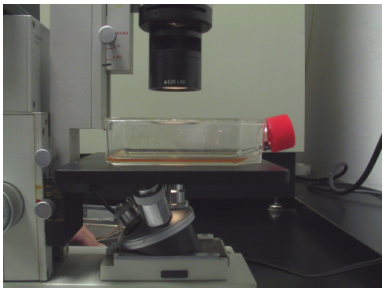
Más información sobre incubadores de CO_2:

- Revco
- Termo Forma

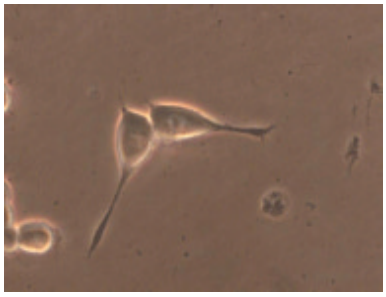
8.3. **Microscopios**

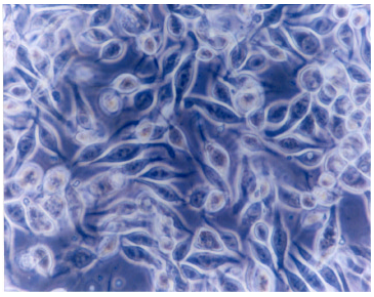


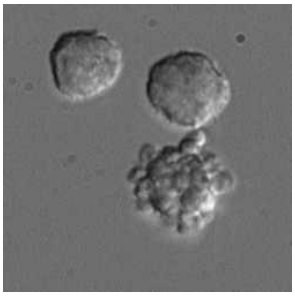
El control microscópico del cultivo se realiza con un microscopio en el cual la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran en posición invertida respecto de los microscopios ópticos convencionales. Por ello se suelen llamar **microscopios invertidos**. El motivo de la localización de los objetivos y de la fuente de iluminación se basa en que los frascos de cultivo suelen tener un grosor de centímetros y por lo tanto los microscopios convencionales no tienen una distancia focal en sus objetivos que permita la observación. Al estar localizados en los microscopios invertidos los objetivos en la parte inferior, la distancia focal se reduce al grosor del substrato de cultivo.



Generalmente no se realizan coloraciones de las células en cultivo, por lo tanto, son muestras vivas sin color y con poco contraste por lo que se utilizan condensadores y objetivos de **contraste de fases** y prismas de **contraste de interferencia diferencial** de Nomarski.





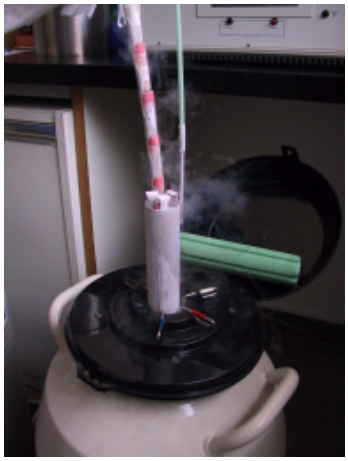


- Leica
- Nikon
- Olympus
- Zeiss

8.4. **Congeladores y equipo de criogenia**

Es recomendable disponer de distintos equipos que mantienen temperaturas bajas. Entre ellos podemos distinguir:

- Frigoríficos de 4ºC: para mantener almacenados medios o tampones
- Congeladores de -20ºC: para mantener suero, aditivos y enzimas
- Congeladores de -80ºC: para mantener a largo plazo aditivos del medio de cultivo y para substancias muy sensibles como enzimas, mitógenos, inductores, factores de crecimiento, ...
- Unidad de almacenamiento en nitrógeno líquido (-196ºC): para el almacenamiento de líneas celulares



El proceso de almacenamiento por congelación de células en cultivo requiere un medio especial de congelación que contiene un agente criopreservante (glicerina, DMSO, ...). Para proceder a la congelación se realizan pases por temperaturas cada vez más bajas hasta finalmente utilizar los depósitos con nitrógeno líquido. Existen sistemas automáticos para la reducción progresiva y controlada de la temperatura.

Más información sobre sistemas criogénicos:

- Carburos Metálicos
- Revco
- Termo Forma

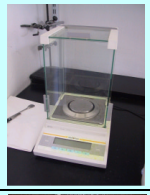
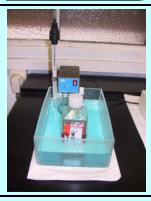
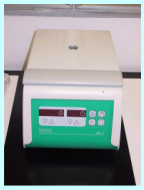
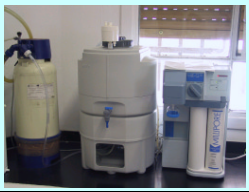
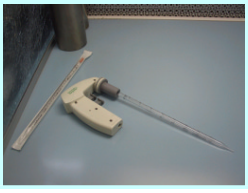
8.5. **Equipo de esterilización y filtración**

Para garantizar la asepsia del cultivo no sólo el medio debe de ser esteril y el área de trabajo lo más aséptica posible (cabina de flujo), también todos los recipientes e instrumentos que entren en contacto con el cultivo deben de ser estériles. A veces podemos utilizar tubos o pipetas que se adquieren estériles, pero en otras ocasiones debemos de proceder a su esterilización. El método más utilizado es el **autoclave** (aproximadamente 121ºC, 1.0 bar, 15 min). Otros sistemas son la eserilización por irradiación con rayos gamma o rayos X, la esterilización por gas (oxido de etileno o formaldehído), luz ultravioleta, calor seco, ... Estos sistemas se utilizan generalmente para elementos de cristal o de plástico como frascos, tubos, pipetas, etc...

Para esterilizar soluciones líquidas se suelen utilizar sistemas de filtros de 0.22µm de poro (Millipore) que no dejan pasar ni bacterias ni hongos mayores de dicho tamaño, realizándose por lo tanto una **esterilización por filtración**.

8.6. **Otros instrumentos**

Otros instrumentos frecuentes en el laboratorio de cultivo de tejidos, al igual que en otros laboratorios, son:

	**Balanzas**
	**Baño termostatado**
	**Centrífugas refrigeradas y no refrigeradas**
	**Equipos de purificación de agua**
	Micropipetas de volumen variable o de volumen fijo
	pHmetro
	**Pipeteadores automáticos**

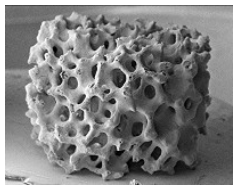
9. El substrato y el medio de cultivo

Para poder realizar un cultivo de tejidos es preciso:

- Un **recipiente**, donde se realiza el cultivo
  - **Placa de Petri** de tamaños 3.5, 6.0 y 10 cm
  - **Multiplacas**, con varios pocillos de 6 a 96 son las más frecuentes
  - **Frascos de Roux** de diferentes formas y tamaños
  - **Especiales**, como las "roller bottles" o los que llevan incorporados un portaobjetos

- Un **substrato**, donde las células se adhieren y crecen
  - Recipientes de **vidrio**, de los indicados en el apartado anterior
  - Recipientes de **plástico**, de los indicados en el apartado anterior
  - **Microsoportes**, pequeñas esferas de distinta naturaleza, que se mantienen en suspensión, sobre las que crecen las células

  - **Substratos metálicos**
  - **Superficies tratadas con componentes de la matriz** extracelular como colágeno, fibronectina, vitronectina, etc...
  - "**Feeder layers**", que son restos de celulas que crecieron en monocapa y que se esterilizan y se inhibe su crecimiento con radiación gamma o X.
  - **Matrices tridimensionales** como geles de colágeno, celulosa, fosfato cálcico, etc ...



  - **Substratos no adherentes** como agar o agarosa que permiten cierta separación entre las células para formar colonias

- Una **fase gaseosa** donde es de gran importancia el **oxígeno** y el **dióxido de carbono**. El primero de ellos, imprescindible para la vida de las células. El segundo, fundamental para la regulación del pH del medio de cultivo.

- Un **medio líquido** que recubre o en el que están suspendidas las células y que las nutre. Este es el **medio de cultivo** que presenta una serie de características como:

  - Propiedades físicas
    - **pH**, generalmente alrededor de 7.4 y controlado por el CO_2 del incubador y por substancias amortiguadoras incluidas en la formulación del medio como el HEPES. El medio de cultivo suele incluir **rojo fenol** que es un indicador del pH, así el

medio es de color rojo a pH 7.4, naranja a pH 7.0, amarillo a pH 6.5, azul-rojizo a ph 7.6 y de color púrpura a pH 7.8
- **Osmolaridad**, que suele estar comprendida generalmente entre 260-320 mOsm/kg.
- **Temperatura**, es fundamental para el correcto crecimiento de las células e influye asimismo en el pH
- **Viscosidad**, relacionada con la concentración de suero
- **Tensión superficial**, que debe de mantenerse lo suficientemente baja para evitar la formación de espumas

- Composición química
  - **Solución salina equilibrada (BSS)**: mezcla de sales inorgánicas suplementada con glucosa
  - **Aminoácidos**, es necesario suplementar con aminoácidos esenciales, generalmente se añade glutamina a una concentración 2mM antes de la utilización del medio
  - **Vitaminas**
  - **Glucosa**
  - **Otras moléculas**, como lípidos, piruvato, etc...
  - **Suero**, que aporta hormonas y factores de crecimiento. Los más utilizados son el suero de ternera (CF), el suero bovino fetal (FCS), el suero de caballo (HS) y el suero de origen humano (HuS). El suero es un elemento determinante en el correcto crecimiento de un cultivo. Existen líneas que sin suero no crecen y existen otras líneas que no crecen en la presencia de suero. Esto se debe a la presencia de diferentes moléculas en el suero, generalmente en concentraciones mínimas, que pueden estimular o inhibir el crecimiento celular. Además, los distintos lotes de suero suelen ser diferentes en las concentraciones de estos elementos, con lo a veces la repetición de un experimento no es posible al desconocer exactamente las concentraciones de estas moléculas en los distintos sueros utilizados.
  - **Antibióticos y antifúngicos**, para evitar el crecimiento de bacterias y hongos. Los más utilizados son penicilina, estreptomicina, gentamicina, fungizona y anfotericina-B

Actualmente se pueden utilizar ciertos **medios con fórmulas definidas** que incluyen factores de adhesión, inhibidores de proteasas, hormonas, factores de crecimiento, oligoelementos como Cu, Se y Fe, y proteínas

BME	Medio basal de Eagle
MEM	Medio mínimo esencial de Eagle
RPMI 1640	
DMEM	Medio MEM modificado por Dulbecco
GMEM	Medio MEM de Glasgow
IMDM	Medio DMEM modificado por Iscove
McCoy 5a	
L-15	Medio L-15 de Leibovitz
F-10	Medio F-10 de Ham
F-12	Medio F-12 de Ham
199	Medio 199
M16	
CS-C	

Existen un gran número de medios de cultivo diferentes que se diferencian en la calidad y cantidad de sus componentes. Algunos son de uso general y otros son muy específicos para el crecimiento de ciertas células. En la tabla adjunta se indican algunos de ellos

El medio de cultivo puede fabricarse en el laboratorio siguiendo la formulación del mismo, pero es más frecuente adquirirlo ya sea en forma de polvo cristalino para reconstituirse con agua, y generalmente añadirle glutamina y suero; o como un medio líquido al que se le añade sólo glutamina y suero.

Para más información sobre substratos y medios de cultivo:

- Amersham Biosciences
- BD Biosciences
- Bellco Glass Inc.
- Cellgro
- Corning
- Invitrogen LifeTecnologies
- Nunc
- Roche
- Sigma-Aldrich

Apéndices

Apéndice A

Términos:

Aneuploidía
Asepsia
Clon
Fusión celular
Heterocarion
Híbridos
In vitro
In vivo
Micoplasmas
Mutágenos
Oncogenes
Tripsina

Apéndice B

Bibliografía:

Butler M (1996) Animal Cell Culture and Technology. The Basics. IRL Press at Oxford University Press, Nueva York, USA.

Davis JM (2002) Basic Cell Culture. Second Edition. Oxford University Press, Oxford, UK

Freshney RI (1986) Animal cell culture. A practical approach. IRL Press, Oxford

Freshney RI (2000) Culture of animal Cells: A manual of basic technique. 4th Edition. John Wiley & Sons.

Apéndice C

Historial

1.11 07/08/2002 Archivo pdf
- ✓ Se añaden nuevos contenidos

1.10 26/06/2002 Archivo pdf
- ✓ Correcciones ortográficas
- ✓ Cambio parcial de la organización
- ✓ Índice paginado

- ✓ Separación por páginas
- ✓ Inclusión de más enlaces
- ✓ Inclusión de bibliografía
- ✓ Términos

1.00 21/06/2002 Archivo pdf

Apéndice D

Mejoras pendientes de realizar:

- ✓ Incluir un historial del fichero 26/06/2002
- ➢ Incluir términos 26/06/2002
- ➢ Incluir bibliografía 26/06/2002
- Incluir protocolos
- Ordenar figuras y poner pies