

UF2

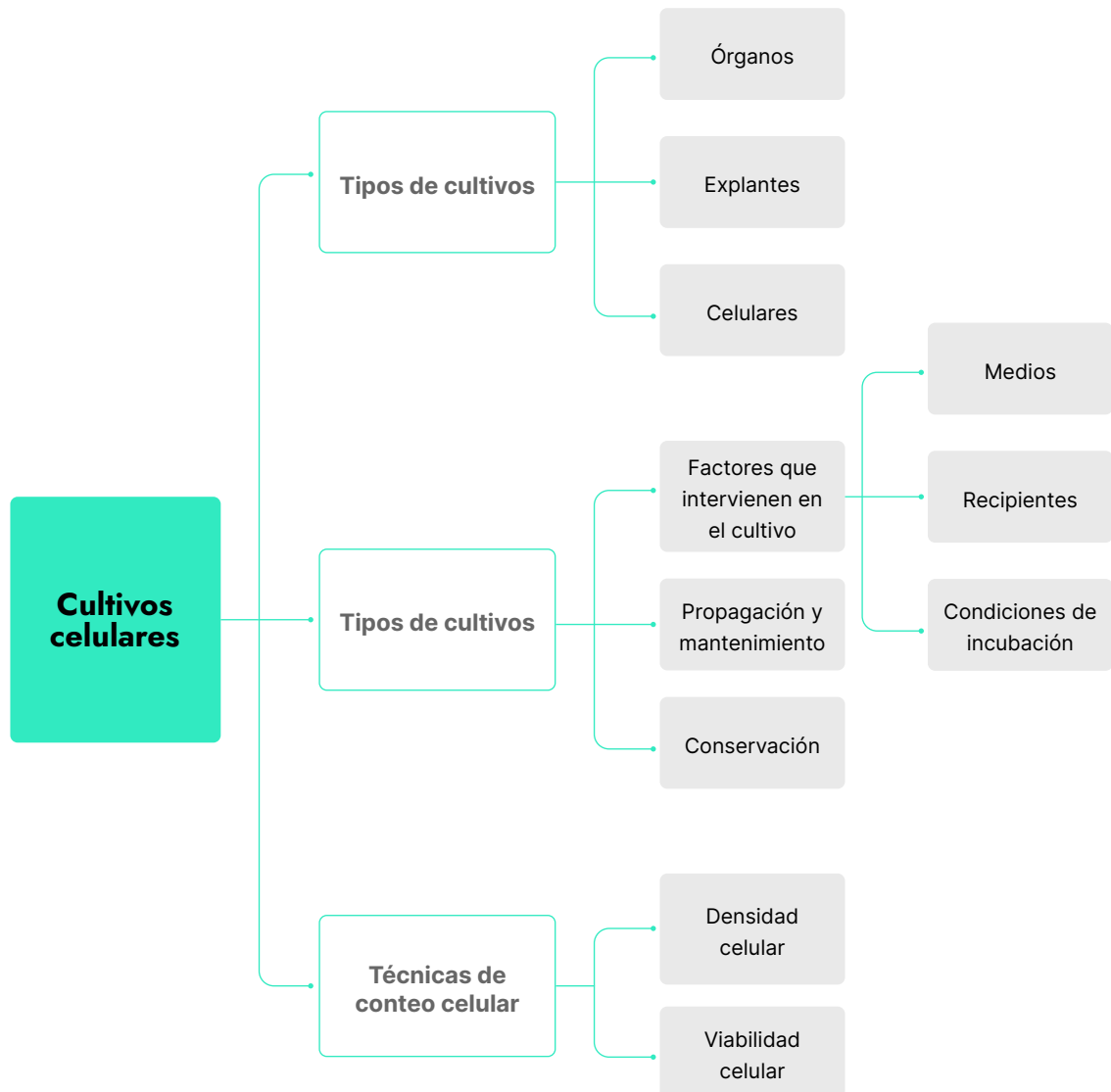
Cultivos celulares

Biología molecular y citogenética

ÍNDICE

Mapa conceptual	03
1. Tipos de cultivos celulares en citogenética	04
A. Cultivo de órganos	05
B. Cultivo de explantes primarios.....	05
C. Cultivo de células disociadas.....	06
D. Cultivos histotípico y organotípico	08
2. Técnicas de obtención, propagación y conservación de cultivos.....	09
2.1. Factores que intervienen en el cultivo.....	09
A. Medios de cultivo	09
B. Recipientes y sustratos.....	11
C. Condiciones de incubación	12
2.2. Inicio del cultivo	13
2.3. Propagación y mantenimiento del cultivo celular	14
2.4. Conservación del cultivo.....	16
3. Técnicas para determinar la densidad y la viabilidad	19
3.1. Técnicas para determinar la densidad celular	19
3.2. Técnicas para determinar la viabilidad celular.....	20

Mapa conceptual



01 Tipos de cultivos celulares en citogenética

DEFINICIÓN

El **cultivo celular** es el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento, la supervivencia, la multiplicación y, en algunos casos, la diferenciación de las células in vitro utilizando condiciones controladas. Las células cultivadas mantendrán, al máximo posible, sus propiedades fisiológicas, genéticas y bioquímicas.

La **propagación de células fuera del organismo de origen** tiene numerosas aplicaciones y presenta las siguientes ventajas e inconvenientes:

+ Ventajas	- Inconvenientes
» Son fáciles de manipular en condiciones controladas. » Permiten la conservación durante largos periodos de tiempo con apenas pérdida de viabilidad. » Disminuyen la necesidad de realizar ensayos in vivo y se consideran una alternativa al uso de animales. » Mayor homogeneidad de la muestra, ya que se mantiene en cultivos de linaje celular definido.	» Es necesario trabajar en estrictas condiciones de asepsia, ya que los principales contaminantes (bacterias, mohos y levaduras) crecen más rápido que las células animales.

Esquema 1. Ventajas e inconvenientes del trabajo con cultivos celulares.

IMPORTANTE

La contaminación **biológica** de cultivos celulares puede estar originada por bacterias, hongos, virus, micoplasmas o contaminación cruzada por otras células eucariotas cultivadas en el laboratorio.

Las técnicas de cultivo celular se llevan a cabo sobre los siguientes **elementos**: órganos, explantes primarios, cultivos de células disociadas o cultivos histotípicos y organotípicos.

A. Cultivo de órganos

Es el mantenimiento de un órgano o parte de él para preservar, aunque solo sea parcialmente, su estructura y funciones.

Se coloca el órgano o una porción de este sobre una rejilla situada en la interfase líquido-gas de un medio de cultivo del que extrae los nutrientes y del que elimina los desechos metabólicos.

Este tipo de cultivos (ganglios linfáticos, piel, fragmentos hepáticos...) presentan una serie de ventajas e inconvenientes que puedes ver en el siguiente esquema.

 Ventajas	Inconvenientes 
» Se mantienen la organización tridimensional y la mayor parte de las características histológicas. » Permite mantener los diferentes tipos celulares diferenciados constituyendo una buena réplica del órgano original.	» La proliferación celular es limitada, ya que el crecimiento celular solo se produce en la periferia. » Se necesita nuevo material para cada experimento debido a la falta de propagación. » La cantidad de material que cultivar es reducida y su cuantificación resulta difícil.

Esquema 2. Ventajas e Inconvenientes del cultivo de órganos.

B. Cultivo de explantes primarios

Consiste en colocar un fragmento de tejido en la interfase sólido-líquido de un soporte de vidrio o plástico (placa de Petri o frasco de cultivo) y **nutrirlo** con un medio adecuado.

Los fragmentos de tejido se adhieren a esa superficie sólida en la que las células de la periferia del explante pueden migrar y **proliferar**. Es útil en pequeñas cantidades de tejido, como biopsias de piel o vellosidades coriónicas.

C. Cultivo de células disociadas

Tipo de cultivo **más utilizado** debido a su capacidad de propagación. Es el crecimiento *in vitro* de células individuales, no organizadas en tejidos. Se pueden obtener a partir de explantes primarios, de líneas celulares o de suspensiones de células disgregadas por medio de sistemas mecánicos, químicos o enzimáticos.

En este tipo de cultivos se pierden las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar notablemente. Se dice que un cultivo ha alcanzado la **confluencia** cuando las células ocupan toda la superficie disponible y detienen su proliferación y crecimiento. Por este motivo, pasado un tiempo, es necesario realizar un subcultivo o pase.



¿SABÍAS QUE...?

Un **subcultivo o pase** consiste en el trasplante de células de un envase de cultivo a otro u otros. El número de pases o subcultivos es el número de veces que las células se han subcultivado.

Entre los datos que se consignan en el frasco de cultivo, está el número de pases o subcultivos.

En líneas generales, las células tienen una vida que puede prolongarse **entre 20 y 100 generaciones** dependiendo del tipo de célula. A partir de este momento, pierden la capacidad para proliferar y mueren (senescencia).

IMPORTANTE

Algunas células, como las tumorales, son capaces de evitar la senescencia y crecer de forma indefinida (línea celular continua). En investigación se utilizan estas células que se han adaptado, de forma espontánea o inducida, para crecer continuamente.

En la Tabla 1 puedes ver los diferentes tipos de cultivo de células en función de las condiciones en las que estos se realicen.

Cultivos según el estado en el que se encuentren las células

Cultivo en suspensión	- Las células se multiplican en un medio líquido sin adherirse a ningún sustrato. - No requieren la utilización de proteasas para realizar subcultivos, por lo que el proceso es menos traumático. - Es el tipo de cultivo empleado para el cultivo de células hematopoyéticas, como los linfocitos de sangre periférica (cariotipo).
Cultivo en monocapa	- Las células se adhieren al fondo del recipiente de cultivo, para crecer y dividirse en una única capa celular. - Como las células están adheridas al sustrato, para despegarlas es necesario un tratamiento con una enzima proteolítica (tripsina). - Es el método utilizado para el cultivo de la mayoría de las células.

Cultivos según la forma de mantenimiento del pH del medio

Cultivo cerrado	El frasco de cultivo se mantiene cerrado. Se incorpora al medio de cultivo HEPES, <i>buffer</i> que amortigua los cambios de pH. No requiere incubador con sistema de regulación de gas y humidificación.
Cultivo abierto	El frasco de cultivo se mantiene entreabierto en el incubador, que le proporciona una atmósfera con un 95% de aire y un 5% de CO₂.

Cultivos según la procedencia de la suspensión celular de partida

Cultivo primario	Procede directamente de un tejido sin haber pasado previamente por un crecimiento in vitro.
Cultivo secundario	Se obtiene a partir de un cultivo primario, de otro secundario o de una línea celular mantenida en congelación.

Tabla 1. Clasificación de los cultivos celulares dependiendo de las condiciones de realización.

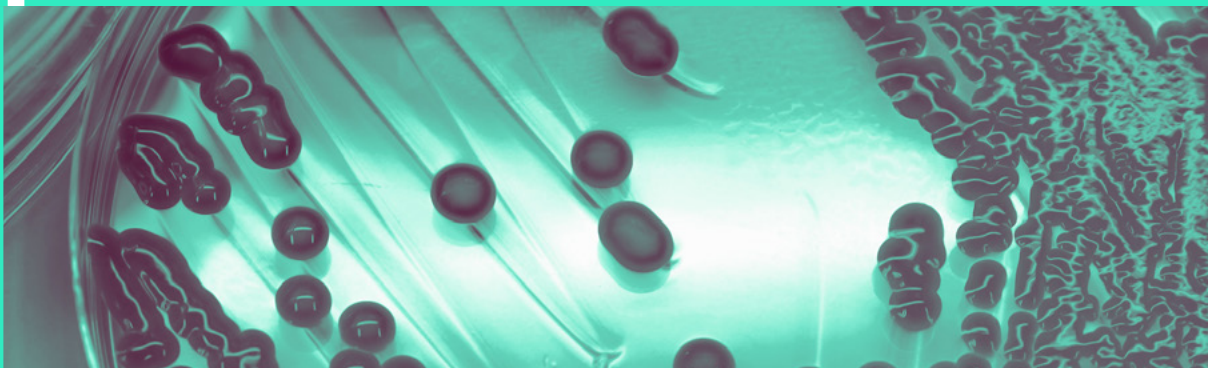
D. Cultivos histotípico y organotípico

Este tipo de cultivos tienen como finalidad crear tejidos *in vitro* completamente funcionales para utilizarse en injertos o trasplantes.

- » **Cultivo histotípico.** Las células crean una estructura tridimensional similar al tejido original. Tienen un único tipo celular y son cultivos de alta densidad.
- » **Cultivo organotípico.** Tienen varios tipos de células muy parecidas al tejido original. Representan la base de la ingeniería de tejidos.

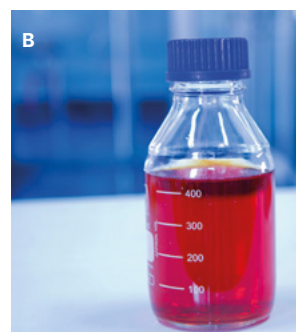
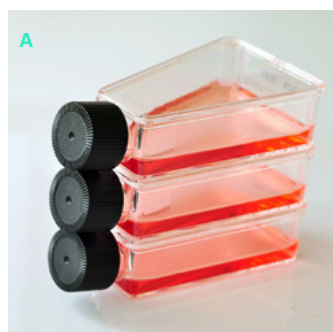
1

CASO PRÁCTICO



CULTIVOS EN MONOCAPA Y EN SUSPENSIÓN

Es tu primer día de trabajo en el laboratorio de cultivos celulares y debes hacer un subcultivo de un cultivo primario en monocapa que se encuentra dentro de la incubadora. Te encuentras con los dos cultivos que se muestran en la imagen. ¿Cuál de los dos debes utilizar para realizar el pase?



SOLUCIÓN

- En el cultivo en monocapa, las células crecen adheridas sobre un soporte sólido. El anclaje al sustrato es un requisito para la proliferación. (A)
- En el cultivo en suspensión, las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. El crecimiento y la proliferación no dependen de su anclaje. (B)

02 Técnicas de obtención, propagación y conservación de cultivos

Cuando las células se individualizan y extraen de su entorno natural, pierden las influencias que reciben del resto del organismo. Para poder mantener las células en cultivo, es necesario aportar artificialmente estas influencias y condiciones del medio del que proceden: medios de cultivo que proporcionan nutrientes, soporte y sustrato para que las células tengan una superficie a la que adherirse; incubación en condiciones controladas de temperatura, humedad y gases; y una técnica aséptica para evitar contaminaciones por microorganismos.

Todas las técnicas de cultivo celular requieren unas **estrictas condiciones de asepsia**, ya que las bacterias, los mohos y las levaduras (que son los principales contaminantes) crecen más rápido que las propias células del cultivo.

2.1. Factores que intervienen en el cultivo

A. Medios de cultivo

Las células se cultivan en **medios de crecimiento**, es decir, una solución que proporciona los nutrientes necesarios para que las células crezcan. La elección de los medios de cultivo es esencial para el crecimiento y el comportamiento adecuado de las células.

En general, los medios de cultivo contienen **nutrientes** similares al entorno fisiológico. Los principales componentes se pueden ver en la siguiente tabla.

COMPUESTO	DESCRIPCIÓN
Aminoácidos	Todos los medios de cultivo celular contienen una mezcla de aminoácidos. Incorporan aminoácidos esenciales y no esenciales para estimular la viabilidad y el crecimiento celular.
Vitaminas	La cantidad y el tipo de vitaminas varían de un medio de cultivo a otro, pero son necesarias para facilitar el crecimiento y la proliferación celular.
Hidratos de carbono	El hidrato de carbono principal en los medios de cultivo celular es la glucosa. Proporciona la principal fuente de energía de las células vivas. Pueden utilizarse también otros carbohidratos como galactosa, fructosa o maltosa.
Sales minerales	Los medios de cultivo celular están formados por un conjunto de sales que contienen aniones fosfato, bicarbonato, cloruro, sulfato y cationes de sodio y potasio. En ocasiones, también calcio y magnesio. Las sales son las responsables de la osmolaridad del medio, que debe ser isotónico o ligeramente hipotónico respecto a las células que cultiva. El rango de osmolaridad tolerado por las células oscila entre 260 y 320 mOsm/kg. El bicarbonato sódico es importante por su regulación del pH.
Tampón	Los sistemas tampón son fundamentales porque regulan el pH y las células son muy sensibles a los cambios de este parámetro. Actualmente, el más utilizado es el HEPES en una concentración entre 10 y 20 mM.
Indicador de pH	Las células son muy sensibles a los cambios de pH. Suelen crecer en un rango entre 7,2 y 7,6 (la mayoría de las células, 7,4). Para detectar cualquier cambio mínimo en este valor, los medios llevan en su composición un indicador de pH. El más utilizado es el rojo fenol.
Antibióticos	Los medios se suplementan con antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos por bacterias. La penicilina y la estreptomycinina (1%) son los más empleados.
Antifúngicos	Las contaminaciones por hongos se pueden prevenir añadiendo al medio antifúngicos como la anfotericina.
Suero	Es un líquido muy rico en nutrientes. Proporciona al medio hormonas y factores de crecimiento que mejoran la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de las células. El más utilizado es el suero fetal bovino, que debe añadirse al medio de cultivo (la concentración más habitual es del 10%) y tiene que inactivarse antes de añadirse al medio de cultivo, para evitar reacciones cruzadas.

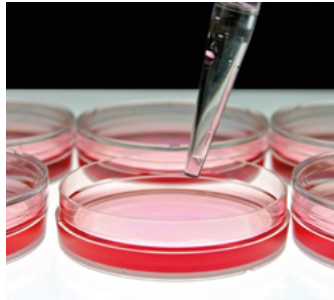
Tabla 2. Composición de un medio de cultivo celular.

El medio **Roswell Park Memorial Institute (RPMI)** se desarrolló originalmente para el cultivo en suspensión y en monocapa de células leucémicas. En la actualidad, ha demostrado su validez para una gran variedad de células de mamíferos, como los leucocitos y casi todas las células cancerígenas.

Otros medios de cultivo utilizados son: BME (medio basal de Eagle); MEM (medio mínimo esencial de Eagle); F-10 (medio F-10 de Ham); DMEM (medio MEM modificado por Dulbecco)...

B. Recipientes y sustratos

Los recipientes y sustratos utilizados para cultivar las células también son de gran importancia. En la actualidad, los soportes para el cultivo de células son de plástico (poliestireno), estériles y de un solo uso.

FRASCOS ROUX	PLACA DE PETRI
	
Pueden ser de diferentes tamaños y se utilizan para cultivos en monocapa. Poseen un tampón regulable con filtro que permite el intercambio de gases y evita la entrada de microorganismos al cultivo.	Proporciona un solo compartimento para cultivo y es el soporte utilizado para el cultivo de tejidos.
PLACA MULTIPOCILLO	TUBOS DE 10-15 ML
	
Dispone de varios compartimentos de cultivo y se utiliza fundamentalmente cuando se prueban diferentes tratamientos en las mismas condiciones (por ejemplo, en un ensayo farmacológico o de toxicidad).	Los cultivos de sangre o médula ósea para cariotipo deben contener heparina de litio como anticoagulante.

Esquema 3. Soportes utilizados para cultivo celular.

Los **sustratos** son revestimientos que llevan los soportes utilizados para cultivo celular y que permiten la adhesión de las células y favorecen la proliferación y la diferenciación celulares.

Son compuestos que se emplean como sustratos: el colágeno, la fibronectina, polímeros de aminoácidos con cadenas laterales con carga positiva (poli-lisina), proteínas fibrosas desnaturalizadas, biomatrices...

El **grosor** de los soportes físicos en los que se llevan a cabo los cultivos celulares (frascos Roux, placas de Petri...) imposibilita su observación en un microscopio óptico convencional debido a la pequeña distancia entre platina y objetivo. Esto generó la necesidad de desarrollar un tipo de microscopio específico para cultivos celulares: **microscopio invertido**.

C. Condiciones de incubación

Los cultivos celulares requieren unas condiciones ambientales adecuadas.

En los incubadores de CO₂ (Figura 1) es posible mantener las condiciones óptimas para el crecimiento de las células.

Para un crecimiento y una proliferación óptimos, las células necesitan un control de:

Temperatura

La temperatura óptima de crecimiento de las células dependerá de la temperatura corporal del organismo de donde se han obtenido las células. Por eso, la temperatura de células humanas es de 37°C. Debe controlarse que no sea superior a la recomendada, ya que las células no toleran bien temperaturas elevadas. Por ejemplo, las células humanas se mueren a temperaturas de más de 40°C.



Fig. 1. Incubador celular.

Humedad

El crecimiento de las células también depende de la humedad ambiental. Es importante mantener la humedad adecuada para evitar el secado de los cultivos, que producirá un aumento en la concentración de los componentes y variaciones de pH y tonicidad.

Algunos incubadores actuales disponen de un generador de vapor o atomizador para controlar los niveles de humedad, mientras que otros usan bandejas con agua para generar humedad mediante evaporación. Suelen producir niveles de humedad entre 95 y 98%.

Los incubadores que incluyen bandejas de agua son los más antiguos y presentan el riesgo de crecimiento de otros organismos (bacterias, hongos...).

Atmósfera gaseosa

Los dos constituyentes importantes de la atmósfera gaseosa son el O_2 y el CO_2 . Casi todas las células en cultivo realizan el metabolismo mediante glicólisis anaerobia, por lo que se mantienen con el O_2 atmosférico. Un aumento del oxígeno es tóxico para las células debido a la formación de radicales libres. Los medios de cultivo libres de suero tienen mayor tendencia a la formación de estos radicales.

El CO_2 es muy importante en los cultivos, ya que se disuelve en el medio, establece un equilibrio con los iones de bicarbonato y estabiliza el pH. Cada medio tiene un porcentaje de CO_2 para mantener el pH correcto y depende de la concentración de bicarbonato que tenga. Generalmente, la concentración de CO_2 es del 5% con un rango entre 2 y 8%.

2.2. Inicio del cultivo

Una vez que se obtiene una suspensión celular homogénea por disgregación, selección o descongelación, se siembra un número determinado de células sobre recipientes adecuados para incubarlas en condiciones necesarias.

Siembra: técnica que consiste en depositar una cantidad de suspensión celular en un soporte para cultivo revestido de sustrato.

La siembra de las células puede realizarse de formas diferentes:

- » Verter una cantidad de suspensión celular directamente sobre el sustrato del recipiente y añadir medio de cultivo.
- » Añadir la suspensión celular al soporte que ya contiene el medio de cultivo.
- » Verter la muestra de suspensión celular sobre el sustrato del soporte y añadir el medio de cultivo 30 minutos después. Esto favorece la adhesión celular.

Tras la siembra, los recipientes de cultivo se introducen en el incubador evitando agitarlos para favorecer que las células se adhieran. En esta fase, es muy importante vigilar constantemente el **crecimiento** celular y la aparición de **contaminaciones**.

IMPORTANTE

Si se observa una contaminación en el cultivo, hay que eliminar rápidamente los cultivos y reactivos contaminados para evitar su **propagación**. Es importante revisar si la **técnica estéril** aplicada ha sido correcta y analizar el origen de la contaminación.

2.3. Propagación y mantenimiento del cultivo celular

Cuando las células de un cultivo llenan la superficie del recipiente donde estaban creciendo, se realiza un subcultivo o pase, que no es más que tomar una muestra de esas células y ponerlas a crecer en un nuevo recipiente. Una vez que un cultivo primario es subcultivado, pasa a denominarse «línea celular». El primer pase o subcultivo da lugar al segundo, el segundo al tercero y así sucesivamente. Al tercer pase, las células empiezan a ser más estables.

Las células pueden cultivarse durante tiempo si se hacen subcultivos regularmente para evitar la fase estacionaria porque se acaban los recursos.

A continuación, puedes consultar un protocolo genérico para realizar un subcultivo de células.

Pase de células de cultivos en monocapa

1. Retirar todo el medio de cultivo de las células.
2. Lavar con 5 mL de solución de PBS y retirar. (Debe lavarse despacio dejando caer el PBS por la pared para evitar despegar las células.)
3. Añadir solución de tripsina (1 mL).

4. Introducir en el incubador golpeando esporádicamente el lateral del frasco para favorecer que las células se despeguen.
5. Comprobar en el microscopio invertido que las células están tripsinizadas (despegadas).
6. Neutralizar las células con medio de cultivo fresco. Se hará la dilución correspondiente cuando se alcance una confluencia del 70-80% en la placa y la velocidad de proliferación de cada tipo celular (entre 2 y 7 días según la velocidad de crecimiento). (Debe ser al menos el doble de volumen de medio que de tripsina: 3 mL de medio fresco.)
7. Tomar el volumen correspondiente de la suspensión de células y agregar en la placa nueva.
8. Añadir medio de cultivo fresco hasta un volumen final de 5-10 mL.

Otras de las operaciones habituales en el mantenimiento de los cultivos es el **cambio del medio de cultivo**, ya que el crecimiento adecuado de las líneas celulares ocasiona un empobrecimiento del medio al consumirse los nutrientes y acumularse productos de desecho.

El cambio de medio suele realizarse cada 2 o 3 días y siempre que se observe que se torna naranja amarillento (acidificación) o morado (alcalinización, generalmente por contacto con el aire). Consulta el protocolo de cambio de medio a continuación.

Cambio de medio de cultivo

1. Retirar casi todo el medio de cultivo de las células (2/3 de su volumen). Es importante dejar un poco de medio antiguo, ya que un medio completamente nuevo induce una parada o retraso en el crecimiento. Esto se debe a que las células producen sustancias que son beneficiosas para ellas (por ejemplo, los factores de crecimiento) y que no se encuentran en los medios de cultivo comerciales.
2. Incorporar medio de cultivo nuevo.
3. Reanudar la incubación en las condiciones adecuadas.

El **rojo fenol** es un indicador de pH que se utiliza en los medios de cultivo celular. Es rosa a pH 7,6; rojo a pH 7,4; naranja a pH 7 y amarillo a pH 6,5.



VÍDEOLAB

Para consultar el siguiente vídeo sobre **Métodos de disgregación celular**, escanea el código QR o [pulsa aquí](#).

2.4. Conservación del cultivo

Mediante pases seriados, es posible mantener en el tiempo una línea celular. Este mantenimiento supone un gasto de recursos y tiempo que puede evitarse mediante la congelación de esta.

DEFINICIÓN

La **crioconservación** es la técnica que consiste en congelar células o tejidos para reducir o casi anular el metabolismo celular y almacenarlas de forma indefinida. Suele utilizarse una temperatura entre -80°C (ultracongelación) y -196°C (nitrógeno líquido).

Esta criopreservación permite conservar los cultivos manteniendo su **viabilidad** y **funcionalidad**. Después de la descongelación, las células conservan el 90% de su capacidad de proliferación y se reduce el riesgo de contaminación, pero también se debe tener en cuenta que los procesos repetidos de congelación y descongelación pueden resultar letales para las células.

Las células deben conservarse en **viales especiales** que resistan bajas temperaturas y que se almacenen en cajas de material resistente que disponga de numeración e identificación para optimizar el espacio y conocer su ubicación.

En este método de conservación es necesario utilizar un **crioprotector**, es decir, un compuesto que protege a las células durante la congelación, evitando la formación de cristales. Los crioprotectores más utilizados son el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol.

IMPORTANTE

El **DMSO** resulta muy tóxico para las células, por lo que estas no deben permanecer demasiado tiempo en contacto con él. Durante la congelación, cuando las células entran en contacto con el medio de congelación que contiene DMSO, deben enfriarse rápidamente y, una vez descongeladas, hay que eliminar el sobrenadante lo antes posible tras centrifugar.

Existe también un sistema comercial de preservación de células con **crioperlas**. Se trata de un vial criogénico que contiene crioperlas tratadas con crioprotectores que actúan como preservantes.

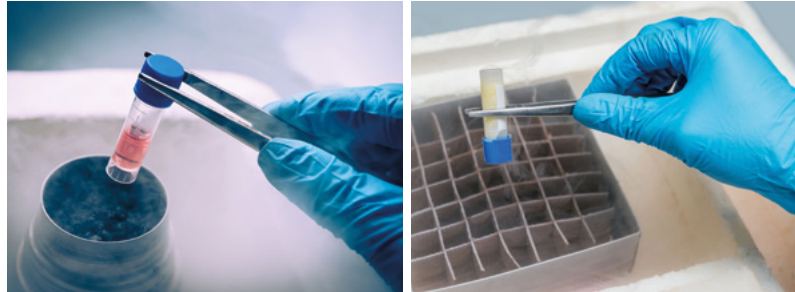


Fig. 2. Material empleado en criopreservación.

2

CASO PRÁCTICO



CONSERVACIÓN DE CÉLULAS MEDIANTE CONGELACIÓN

Para la conservación de varias alícuotas de una de las líneas celulares con las que se está trabajando en tu laboratorio, te indican que debes preparar un medio de cultivo especial para congelación y utilizarlo para congelar las células a -80°C .

Sabes que se utiliza DMSO (dimetilsulfóxido) como agente crioprotector y que el medio de congelación se prepara con el medio de cultivo específico de las células más DMSO al 10% (9 mL de medio de cultivo + 1 mL de DMSO).

Tu compañero te advierte que el DMSO es bastante tóxico y que, debido a esto, para minimizar el tiempo que las células pasan a temperatura ambiente en presencia de DMSO, se deben enfriar las células lo antes posible.

Una vez preparado el medio de congelación y teniendo en cuenta las advertencias, ¿qué pasos crees que debes ir dando para congelar las células?

SOLUCIÓN

1. Realizar la tripsinización del cultivo celular (1 mL de tripsina + 4 mL de medio de cultivo).
2. Agregar la suspensión (tripsina + células + medio) en un Falcon de 15 mL.
3. Centrifugar a 1500 rpm durante cinco minutos.
4. Eliminar todo el sobrenadante y dejar tan solo el pellet.
5. En un criovial, añadir 1 mL de medio de congelación + 1,5 mL de suspensión celular.
6. Enfriar viales en hielo a 4°C durante cinco minutos.
7. Congelar viales a -20°C durante dos horas.
8. Congelar viales a -80°C .

03 Técnicas para determinar la densidad y la viabilidad

- **Densidad celular:** Número de células de un cultivo o población celular. Suele medirse en células por mL.
- **Viabilidad celular:** Proporción de células vivas y funcionales existentes en un cultivo celular.

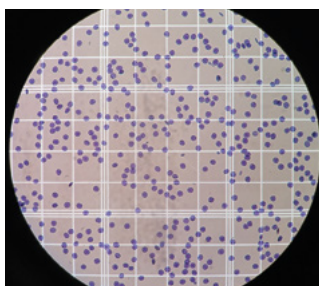
3.1. Técnicas para determinar la densidad celular

Para determinar el número de células en una suspensión, se pueden emplear diferentes métodos de recuento. Todos ellos abarcan las siguientes fases:

- » Dilución de la suspensión celular.
- » Toma de un volumen determinado de la suspensión celular.
- » Recuento celular en ese volumen.
- » Cálculo matemático para determinar el número de células por mL de suspensión.

Los recuentos de células pueden realizarse mediante métodos manuales o automáticos (Figura 3).

MÉTODOS MANUALES



MÉTODOS AUTOMÁTICOS



Fig. 3. Métodos de conteo de células manuales y automáticos.

Hasta la aparición de los contadores automáticos, los **métodos manuales** han sido el procedimiento tradicional de recuento celular. Consisten en la realización de una dilución de la suspensión celular y su posterior recuento en una cámara de conteo celular o **hemocitómetro** (cámara de Neubauer) y en un **microscopio óptico** convencional.

La **automatización** ha mejorado la **precisión** y **exactitud** de las determinaciones y ha permitido una mayor rapidez en la obtención de los resultados. Los aparatos disponibles en el mercado varían en función de su capacidad y complejidad. Detectan el paso de la célula aprovechando la interferencia que produce al paso de la corriente eléctrica o al paso de la luz (métodos de resistencia eléctrica y métodos ópticos).

3.2. Técnicas para determinar la viabilidad celular

La determinación del **número de células vivas** en un cultivo sirve como control de la calidad de este y para el análisis de la proliferación celular.

Hay numerosos **métodos** para determinar la viabilidad de las células, pero el más utilizado en el laboratorio es el que se basa en la evaluación de la integridad de la membrana celular a través de sustancias colorantes o fluorescentes.

La **integridad de la membrana** de las células que se encuentran en muerte celular se altera y provoca que un colorante atraviese esta membrana no intacta y tiña la célula. Este es el fundamento del método de exclusión mediante azul de tripán.

El **azul de tripán**, azul de tripano o *trypan blue* es un colorante vital que tiñe de azul las células con lesión en su membrana celular. En cambio, las células vivas con su membrana plasmática intacta no permiten el paso de esta tinción y aparecen sin teñir, blancas o con un halo azul.

Para la determinación de la viabilidad celular con azul de tripán, puede utilizarse el método manual de preparación de la muestra o el método automatizado mediante **programas de análisis**.

Se trata de una técnica **sencilla, rápida y barata**, pero solo distingue las células no viables con membrana celular no intacta. No tiene capacidad para determinar el estado de las células viables y, por tanto, no garantiza una tasa de supervivencia correcta.

3

CASO PRÁCTICO



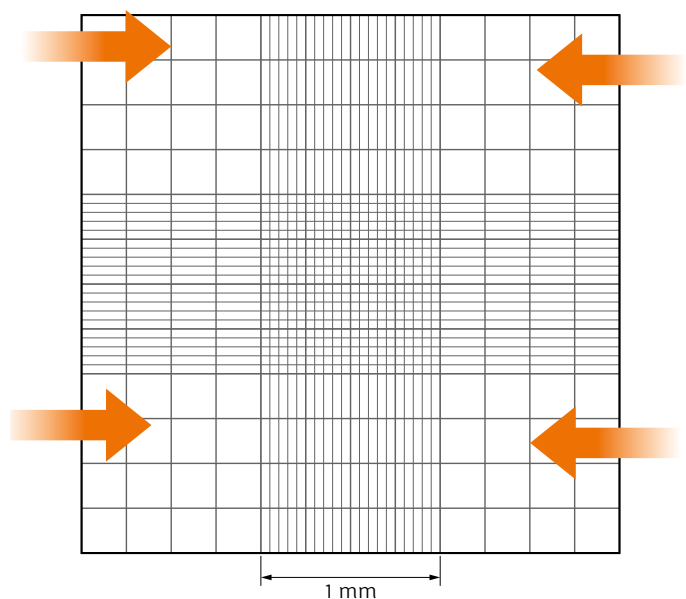
DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR CON AZUL DE TRIPÁN

El azul de tripán (también conocido como azul vital, azul diamina o azul Niágara) es un colorante con capacidad para teñir las células muertas y con incapacidad de penetrar las membranas de células íntegras.

Debes utilizar este método para evaluar la viabilidad de las células. Revisa la bibliografía y elabora el protocolo que seguirás para determinar con azul de tripán la viabilidad de tus células.

SOLUCIÓN

1. Mezclar al 1:1 la suspensión de células con la disolución de azul de tripán al 0,4%.
2. Dejar reposar cinco minutos.
3. Llevar al hemocitómetro de 10 a 15 μl de la solución, dejar reposar un par de minutos y observar con microscopio invertido.
4. Realizar el recuento de células sin teñir (viables) y teñidas (no viables) en cada zona de la cámara de Neubauer.
5. Realizar los cálculos.



X T A R T
FP SALUD