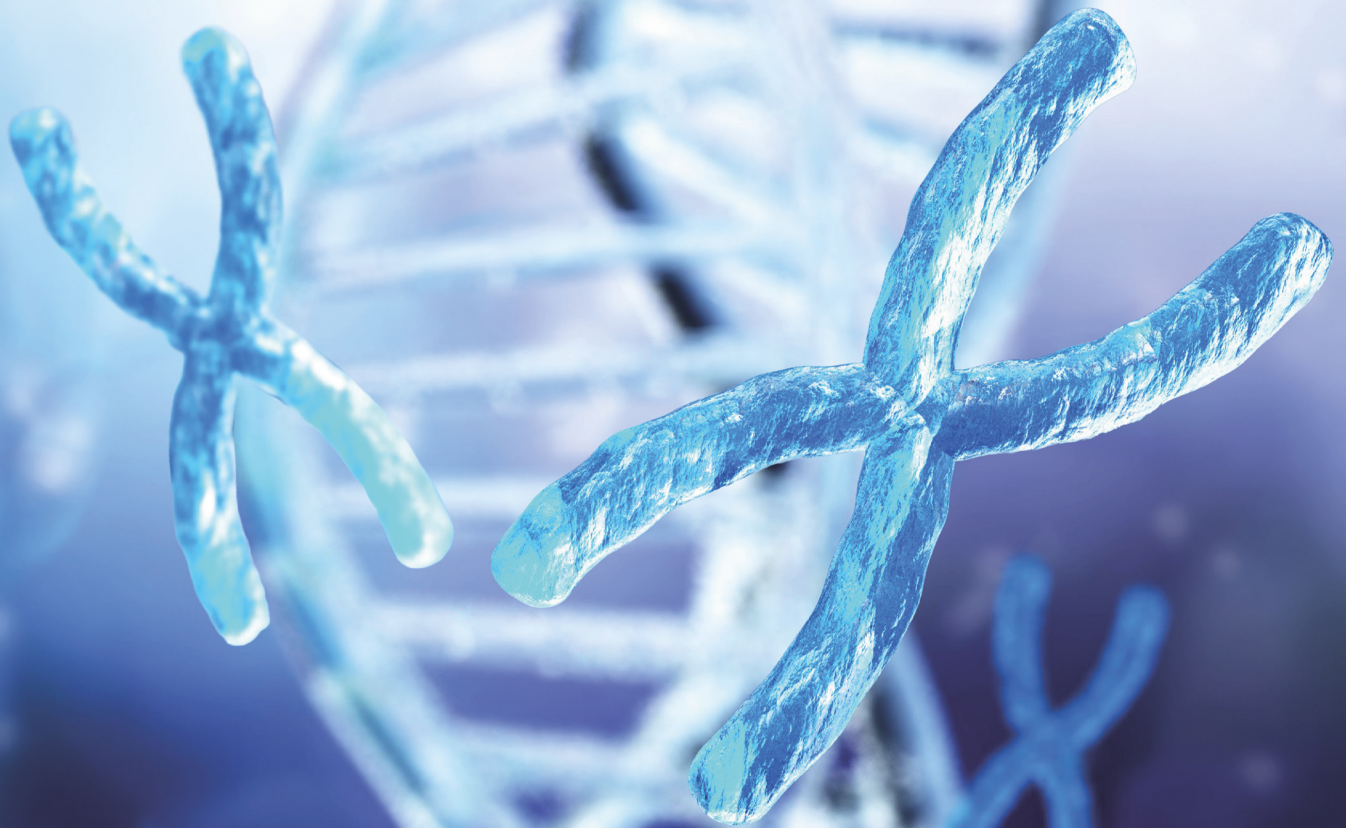


FP SANIDAD

G.S. ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITODIAGNÓSTICO | LABORATORIO CLÍNICO

BIOLOGÍA MOLECULAR Y CITOGENÉTICA

María Soledad Aguilar Segura
Verónica Rivero Hernández



Tercera edición

Complementos digitales 


EDITORIAL
SÍNTESIS

B **Biología molecular y citogenética**

María Soledad Aguilar Segura
Verónica Rivero Hernández

(tercera edición)



© María Soledad Aguilar Segura
Verónica Rivero Hernández

© EDITORIAL SÍNTESIS, S. A.
Vallehermoso, 34. 28015 Madrid
Teléfono 91 593 20 98
www.sintesis.com

ISBN: 979-13-7055-011-0
Depósito Legal: M-16.880-2026

Impreso en España - Printed in Spain

Reservados todos los derechos. Está prohibido, bajo las sanciones penales y el resarcimiento civil previstos en las leyes, reproducir, registrar o transmitir esta publicación, íntegra o parcialmente, por cualquier sistema de recuperación y por cualquier medio, sea mecánico, electrónico, magnético, electroóptico, por fotocopia o por cualquier otro, sin la autorización previa por escrito de Editorial Síntesis, S. A.

ÍNDICE

Prólogo	14
---------	----

1. Organización del laboratorio de biología molecular y citogenética	RA1
Resultado de aprendizaje y criterios de evaluación	16
Objetivos de Desarrollo Sostenible	16
Mapa conceptual	17
Glosario	18
Punto de partida	18
1.1. Introducción	19
1.2. Laboratorio de citogenética	19
1.2.1. Características de la instalación	20
1.2.2. Distribución y organización	21
1.2.3. Equipamiento específico	25
1.2.4. Equipamiento genérico	30
1.2.5. Técnica aséptica	31
1.2.6. Esterilización	34
1.3. Laboratorio de biología molecular	34
1.3.1. Estructura y organización del laboratorio	34
1.3.2. Flujo de trabajo en el laboratorio de biología molecular	36

1.3.3. Equipamiento	37
1.3.4. Normas de trabajo en el laboratorio de biología molecular	38
1.4. Funciones del técnico superior en Citogenética y Biología Molecular en el laboratorio clínico	40
1.5. Seguridad en los laboratorios de citogenética y biología molecular	41
1.5.1. Seguridad frente a los riesgos provocados por los agentes físicos	41
1.5.2. Seguridad química	41
1.5.3. Seguridad biológica o bioseguridad	43
1.6. Gestión de residuos	44
1.7. Calidad y uso eficiente de los recursos en los laboratorios de citogenética y biología molecular	44
Ideas clave	46
Aplica lo aprendido	47
Solución del punto de partida	48
Práctica profesional	49
Ponte a prueba	50

2. Técnicas de obtención, mantenimiento y conservación de los cultivos celulares RA2

Resultado de aprendizaje y criterios de evaluación	52
Objetivos de Desarrollo Sostenible	52
Mapa conceptual	53
Glosario	54
Punto de partida	54
2.1. Introducción	55
2.2. Técnicas de obtención y mantenimiento de los cultivos	55
2.2.1. Definición de cultivo celular	55
2.2.2. Tipos de cultivos celulares	55
2.2.3. Líneas celulares	60
2.3. Factores que intervienen en el cultivo	60
2.3.1. Medios de cultivo	60
2.3.2. Condiciones de incubación	63
2.3.3. El soporte físico. Recipientes y sustratos	65
2.4. Procedimientos de puesta en marcha, mantenimiento y seguimiento del cultivo	67
2.4.1. Métodos de disgregación celular	67
2.4.2. Selección celular	69
2.4.3. Determinación del número y viabilidad celular	70
2.4.4. Descongelamiento y recuperación celular	73

2.4.5. Inicio del cultivo o siembra	73
2.4.6. Propagación y mantenimiento del cultivo celular	74
2.4.7. Procedimientos de conservación de células. Criopreservación	77
2.5. Contaminación en cultivos celulares: identificación y control	79
Ideas clave	82
Aplica lo aprendido	83
Solución del punto de partida	84
Práctica profesional	85
Ponte a prueba	86

3. Cromosomas, cariotipo estándar y anomalías cromosómicas **RA3**

Resultado de aprendizaje y criterios de evaluación	88
Objetivos de Desarrollo Sostenible	88
Mapa conceptual	89
Glosario	90
Punto de partida	90
3.1. Introducción	91
3.2. Cromosomas: organización cromosómica y estructura	91
3.2.1. Estados de condensación de los cromosomas	92
3.2.2. Estructura de los cromosomas	94
3.2.3. Tipos de cromosomas humanos	96
3.2.4. Leyes que cumplen los cromosomas	96
3.2.5. Número de cromosomas	97
3.2.6. Diferencia entre los cromosomas X e Y de mamíferos	98
3.2.7. Heterocromatina y eucromatina	99
3.3. Ciclo celular	100
3.4. Idiograma y nomenclatura de las bandas	105
3.5. Cariotipo: definición y uso	107
3.6. Anomalías cromosómicas. Aplicaciones diagnósticas de las técnicas citogenéticas	108
3.7. Clasificación de las anomalías cromosómicas	108
3.7.1. Anomalías numéricas	109
3.7.2. Anomalías estructurales	113
3.8. Mosaicismos y quimeras	123
3.9. Anomalías de los cromosomas sexuales	123
3.9.1. Anomalías numéricas de los cromosomas sexuales	124
3.9.2. Anomalías estructurales de los cromosomas sexuales	127
3.10. Polimorfismos cromosómicos que afectan a las regiones heterocromáticas	128

3.11. Fórmula cromosómica	129
3.11.1. Nomenclatura citogenética	130
3.11.2. Nomenclatura cromosómica de las alteraciones cromosómicas	131
Ideas clave	136
Aplica lo aprendido	137
Solución del punto de partida	138
Práctica profesional	139
Ponte a prueba	140

4. Métodos de cultivo celular y análisis cromosómico en citogenética **RA3**

Resultado de aprendizaje y criterios de evaluación	142
Objetivos de Desarrollo Sostenible	142
Mapa conceptual	143
Glosario	144
Punto de partida	144
4.1. Introducción	145
4.2. Clasificación de los cariotipos	145
4.3. Muestras para análisis cromosómico	146
4.4. Etapas en la obtención del cariotipo	146
4.4.1. Cultivo de linfocitos de sangre periférica para estudios citogenéticos constitucionales	146
4.4.2. Condiciones preanalíticas de las muestras	147
4.4.3. Siembra de la muestra	148
4.4.4. Técnicas de obtención de los cromosomas	151
4.4.5. Técnicas de obtención de las extensiones	154
4.4.6. Calidad de las extensiones cromosómicas	155
4.4.7. Tinción con Giemsa	157
4.4.8. Técnicas de bandeo cromosómico	158
4.5. Cultivo de linfocitos sincronizados. Cariotipo de alta resolución	162
4.6. Técnicas de análisis cromosómico	164
4.6.1. Análisis directo al microscopio	164
4.6.2. Equipos cariotipadores	164
4.6.3. Localización de las metafases apropiadas para análisis	165
4.6.4. Buscador automático de metafases	165
4.6.5. Análisis cromosómico de una metafase	166
4.6.6. Artefactos y alteraciones cromosómicas originadas por el cultivo	170
4.7. Cultivo celular en diagnóstico prenatal	171

4.7.1. Cultivo celular de fibroblastos de líquido amniótico	171
4.7.2. Cultivo de vellosidades coriales	175
4.7.3. Cultivo celular de sangre procedente del cordón umbilical fetal	176
4.8. Citogenética y cáncer	177
Ideas clave	178
Aplica lo aprendido	179
Solución del punto de partida	180
Práctica profesional	181
Ponte a prueba	182

5. Fundamentos de la biología molecular: los ácidos nucleicos **RA4**

Resultado de aprendizaje y criterios de evaluación	184
Objetivos de Desarrollo Sostenible	184
Mapa conceptual	185
Glosario	186
Punto de partida	186
5.1. Introducción y bases moleculares	187
5.1.1. El flujo de información genética	188
5.2. Los ácidos nucleicos	189
5.2.1. Concepto y estructura química básica	189
5.2.2. El ADN	190
5.2.3. El ARN	192
5.2.4. Propiedades físicas de los ácidos nucleicos relacionadas con las técnicas de biología molecular	193
5.3. Trasmisión de la información genética: mecanismos moleculares	195
5.3.1. El concepto de gen eucariota y su organización estructural	195
5.3.2. La replicación del ADN	197
5.3.3. Transcripción del ADN a ARN	198
5.3.4. Traducción del ARNm	199
5.3.5. Enzimas asociadas a los ácidos nucleicos	203
5.3.6. Regulación de la expresión génica	203
5.4. Organización del genoma humano	204
5.5. Mutaciones y polimorfismos	206
5.5.1. La herencia	206
5.5.2. Mutaciones	210
5.5.3. Polimorfismos genéticos	212
5.6. Usos de los ácidos nucleicos y sus enzimas en biología molecular	213

5.6.1. Enzimas como herramientas en biotecnología	213
5.6.2. ADN plasmídico	216
5.6.3. Vectores plasmídicos sintéticos	216
Ideas clave	218
Aplica lo aprendido	219
Solución del punto de partida	220
Práctica profesional	221
Ponte a prueba	222

6. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

RA4, RA5

Resultados de aprendizaje y criterios de evaluación	224
Objetivos de Desarrollo Sostenible	224
Mapa conceptual	225
Glosario	226
Punto de partida	226
6.1. Introducción a la extracción y purificación de ácidos nucleicos	227
6.2. Etapas y fundamentos del proceso de extracción	228
6.2.1. Obtención, conservación y tratamiento de la muestra biológica	228
6.2.2. Lisis celular y liberación de los ácidos nucleicos	230
6.2.3. Aislamiento, precipitación y elución de ácidos nucleicos	231
6.2.4. Purificación y concentración de los ácidos nucleicos	236
6.3. Métodos de extracción de ADN	237
6.3.1. Método fenol-cloroformo	237
6.3.2. Métodos con sales y detergentes	239
6.3.3. Kits de purificación de ADN	241
6.3.4. Extracción de ADN bacteriano	242
6.4. Métodos de extracción de ARN	243
6.4.1. Sales de guanidinio y fenol	243
6.4.2. Métodos con sales y detergentes	243
6.4.3. Kits de purificación de ARN	244
6.4.4. Extracción de ARN bacteriano	244
6.5. Evaluación de la calidad y cantidad del material extraído	244
6.5.1. Métodos espectrofotométricos	244
6.5.2. Métodos fluorométricos	247
6.5.3. Electroforesis: integridad y tamaño de la muestra	247
6.6. Conservación del ADN y del ARN: almacenamiento, trazabilidad y control de calidad	255
Ideas clave	257

Aplica lo aprendido	258
Solución del punto de partida	259
Práctica profesional	260
Ponte a prueba	262

7. Técnicas de hibridación de los ácidos nucleicos

RA6

Resultado de aprendizaje y criterios de evaluación	264
Objetivos de Desarrollo Sostenible	264
Mapa conceptual	265
Glosario	266
Punto de partida	266
7.1. Introducción	267
7.2. Concepto de hibridación y aplicación en la biología molecular	267
7.3. Etapas en el proceso de hibridación	268
7.3.1. Preparación de la muestra	269
7.3.2. Desnaturalización del ADN	269
7.3.3. Renaturalización. Hibridación con la sonda marcada	271
7.3.4. Posthibridación	274
7.3.5. Detección de los híbridos formados	274
7.4. Sondas	275
7.4.1. Tipos de sondas	275
7.4.2. Tipos de marcaje de las sondas	276
7.4.3. Métodos de marcaje	283
7.5. Aplicaciones de las técnicas de hibridación	284
7.6. Ensayos de hibridación	284
7.6.1. Hibridación en fase líquida	285
7.6.2. Hibridación <i>in situ</i> (ISH)	286
7.6.3. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	287
7.6.4. CISH y SISH: la hibridación <i>in situ</i> cromogénica	295
7.6.5. Técnicas de hibridación y transferencia de ácidos nucleicos en soporte sólido ...	296
7.6.6. FICTION	308
7.6.7. Integración de las técnicas de hibridación con las nuevas tecnologías genómicas	309
Ideas clave	310
Aplica lo aprendido	311
Solución del punto de partida	312
Práctica profesional	313
Ponte a prueba	314

8. Amplificación de los ácidos nucleicos

RA5

Resultado de aprendizaje y criterios de evaluación	316
Objetivos de Desarrollo Sostenible	316
Mapa conceptual	317
Glosario	318
Punto de partida	318
8.1. Amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa o PCR	319
8.2. Definición y fundamento de la PCR	320
8.2.1. Componentes de la reacción de PCR	320
8.2.2. Diseño de primers	322
8.2.3. Etapas de la reacción y programación del termociclador	323
8.3. Variantes de la PCR y aplicaciones avanzadas	326
8.3.1. PCR anidada o <i>nested PCR</i>	326
8.3.2. PCR con transcripción inversa (RT-PCR)	327
8.3.3. PCR en tiempo real o PCR cuantitativa, qPCR	329
8.3.4. PCR digital (dPCR): PCR de 3. ^a generación	340
8.3.5. PCR múltiple (<i>multiplex PCR</i>)	341
8.3.6. Técnica MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>)	342
8.4. Visualización e interpretación de los productos de PCR mediante electroforesis	345
8.5. Purificación de los productos de PCR y preparación para técnicas posteriores	346
8.6. Problemas técnicos que se pueden presentar en la PCR: causas y soluciones	348
Ideas clave	349
Aplica lo aprendido	350
Solución del punto de partida	351
Práctica profesional	354
Ponte a prueba	356

9. Clonación celular y tecnología del ADN recombinante

RA7

Resultado de aprendizaje y criterios de evaluación	358
Objetivos de Desarrollo Sostenible	358
Mapa conceptual	359
Glosario	360
Punto de partida	361
9.1. Introducción	361
9.2. Clonación celular y la tecnología del ADN recombinante	361
9.3. Elementos que intervienen en la clonación celular	364

9.3.1. Tipos de insertos	364
9.3.2. Herramientas de corte y unión	364
9.3.3. Vectores	371
9.3.4. Células hospedadoras	377
9.4. Etapas del proceso de clonación celular	378
9.4.1. Preparación del inserto y del vector	378
9.4.2. Formación del ADNr	379
9.4.3. Introducción del ADNr en la célula huésped	382
9.4.4. Selección y cribado de clones	384
9.4.5. Problemas y soluciones	388
Ideas clave	389
Aplica lo aprendido	390
Solución del punto de partida	391
Práctica profesional	392
Ponte a prueba	396

10. Secuenciación de los ácidos nucleicos

RA7

Resultado de aprendizaje y criterios de evaluación	398
Objetivos de Desarrollo Sostenible	398
Mapa conceptual	399
Glosario	400
Punto de partida	401
10.1. Introducción	401
10.2. Métodos clásicos de secuenciación	401
10.2.1. Método de Maxam y Gilbert	401
10.2.2. Método de Sanger y Coulson (terminación de cadena)	404
10.2.3. Secuenciación automática de primera generación	405
10.2.4. Otros análisis con el secuenciador: análisis de fragmentos	406
10.2.5. Interpretación de los electroferogramas	407
10.3. Secuenciación de 2.ª generación: NGS o secuenciación masiva en paralelo de lectura corta	409
10.3.1. Flujo de trabajo general (<i>workflow</i>) de la NGS	409
10.3.2. Tecnologías y plataformas NGS	413
10.4. Secuenciación de tercera generación y lecturas largas	419
10.4.1. Flujo de trabajo general de la tercera generación	419
10.4.2. Tecnologías y plataformas de tercera generación	419
10.5. Secuenciación de cuarta generación sin síntesis	422

10.6. Análisis bioinformático y bases de datos	423
10.6.1. Evaluación de la calidad de la secuenciación	424
10.6.2. Identificación y filtrado de variantes	424
10.6.3. Bases de datos genéticas y genético-clínicas	424
10.6.4. Inteligencia artificial y apoyo a la interpretación	425
10.7. Aplicaciones clínicas de la secuenciación	426
Ideas clave	430
Aplica lo aprendido	431
Solución del punto de partida	432
Práctica profesional	433
Ponte a prueba	434

11. Aplicaciones de las técnicas de citogenética y biología molecular

RA1, RA2, RA3, RA4, RA5, RA6, RA7

Resultados de aprendizaje	436
Objetivos de Desarrollo Sostenible	436
Mapa conceptual	437
Glosario	438
Punto de partida	439
11.1. Introducción: de la teoría a la práctica	439
11.2. Tipos de estudios genéticos	440
11.3. Herramientas de diagnóstico citogenético	441
11.3.1. Aplicaciones clínicas del cariotipo convencional	441
11.3.2. Aplicaciones clínicas de la técnica de FISH (hibridación <i>in situ</i> fluorescente)	442
11.3.3. Aplicación clínica del <i>array</i> -CGH	442
11.3.4. Aplicaciones clínicas específicas	443
11.3.5. Aplicaciones en el diagnóstico prenatal	444
11.3.6. Citogenética en oncohematología	447
11.4. Bases genómicas de las aplicaciones de la biología molecular	447
11.5. El código desbloqueado	448
11.5.1. Diagnóstico molecular y secuenciación genética en el laboratorio clínico	449
11.5.2. Microbiología clínica molecular	452
11.5.3. Clonación, proteínas recombinantes y organismos transgénicos en biomedicina	454
11.5.4. Medicina forense y genética legal	456
11.6. La nueva era. Terapias del siglo XXI	457

11.6.1. Terapia génica y celular	458
11.6.2. Medicina personalizada	459
11.6.3. Medicina regenerativa	462
Ideas clave	465
Aplica lo aprendido	466
Solución del punto de partida	467
Práctica profesional	468
Ponte a prueba	469

ÍNDICE DE COMPLEMENTOS DIGITALES

- Complemento digital 1.1. Organización, equipamiento y bioseguridad en el laboratorio de cultivos celulares y biología molecular
- Complemento digital 2.1. Cultivo celular: técnicas avanzadas, recursos y aplicaciones
- Complemento digital 3.1. Cromosomas, división celular y variabilidad genética
- Complemento digital 4.1. Clasificación de bandas y protocolos citogenéticos en diagnóstico cromosómico
- Complemento digital 5.1. Ácidos nucleicos y expresión génica: del ADN a las proteínas
- Complemento digital 6.1. Recursos y procedimientos avanzados para la extracción y análisis de ADN y ARN
- Complemento digital 7.1. Técnicas de hibridación y análisis del ADN: fundamentos, métodos y aplicaciones
- Complemento digital 8.1. Técnicas avanzadas y recursos prácticos en PCR y gPCR: diseño, análisis y optimización
- Complemento digital 9.1. Fundamentos y técnicas de clonación molecular y ADN recombinante
- Complemento digital 10.1. Fundamentos y técnicas de la secuenciación de ácidos nucleicos
- Complemento digital 11.1. Aplicaciones clínicas de la biología molecular y la citogenética

2

Técnicas de obtención, mantenimiento y conservación de los cultivos celulares

RESULTADO DE APRENDIZAJE Y CRITERIOS DE EVALUACIÓN

RA 2. Realiza cultivos celulares describiendo los pasos del procedimiento.

- a) Se han caracterizado los métodos de cultivo celular que se aplican en los estudios citogenéticos.
- b) Se han seleccionado los tipos de medios y suplementos en función del cultivo que hay que realizar.
- c) Se han realizado los procedimientos de puesta en marcha, mantenimiento y seguimiento del cultivo.
- d) Se ha determinado el número y la viabilidad celular en los cultivos en la propagación del cultivo.
- e) Se han tomado las medidas para la eliminación de la contaminación detectada.
- f) Se han definido los procedimientos de conservación de las células.
- g) Se ha trabajado en todo momento en condiciones de esterilidad.



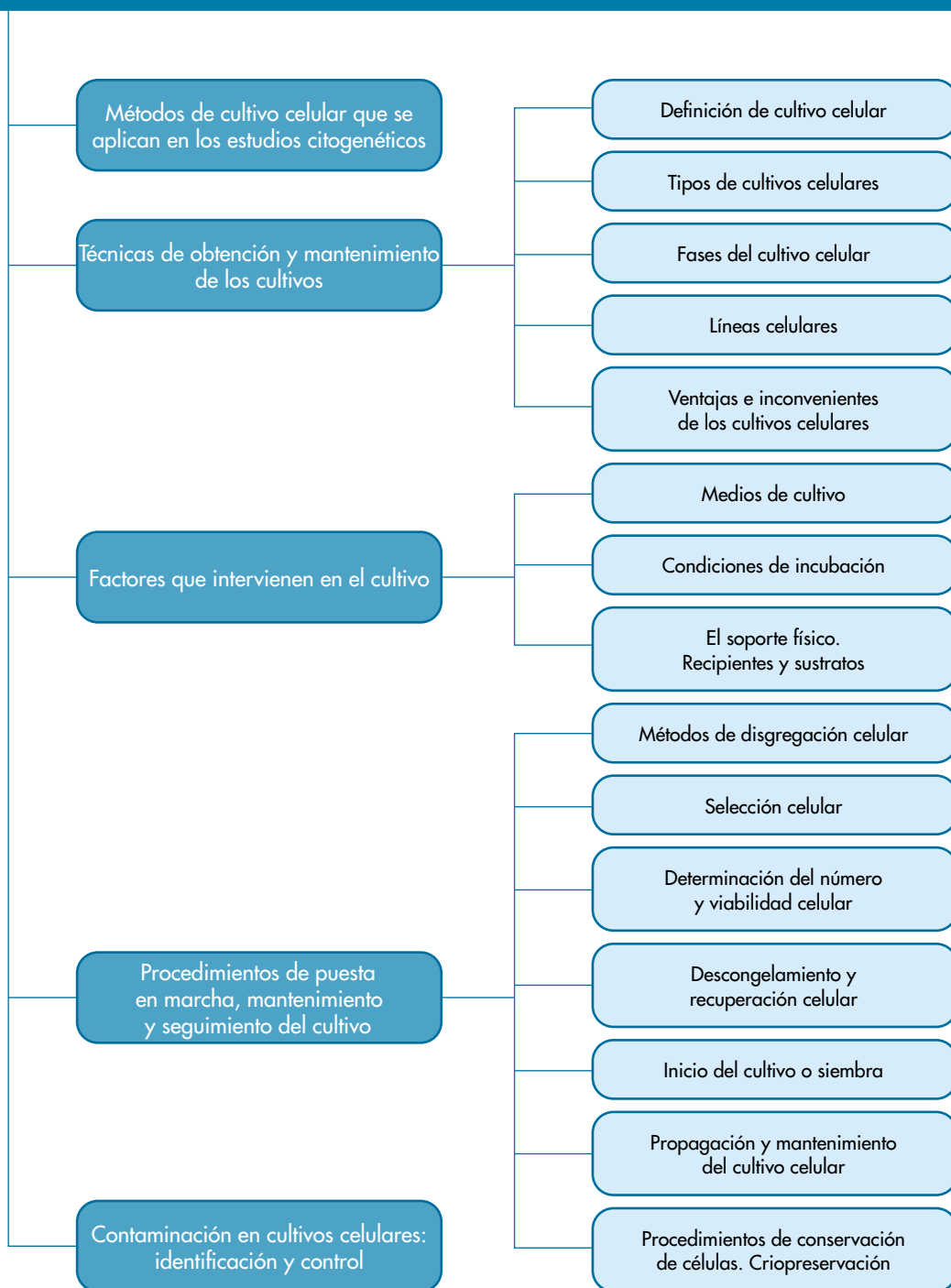
Objetivos de Desarrollo Sostenible

En este capítulo se van a trabajar los ODS 12 y 15.



MAPA CONCEPTUAL

TÉCNICAS PARA CULTIVOS CELULARES





GLOSARIO

- Agente mitógeno.** Sustancia que induce la división de determinadas células.
- Apirógeno.** Sustancia o material que no induce fiebre ni respuesta pirogénica.
- Cofactores enzimáticos.** Moléculas o iones necesarios para la actividad de una enzima.
- Enzima proteolítica.** Enzima que degrada proteínas rompiendo enlaces peptídicos.
- Equilibrio osmótico.** Balance de solutos que evita el movimiento excesivo de agua a través de la membrana celular.
- Factores de crecimiento.** Proteínas que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular.
- In vitro.** Realizado fuera del organismo, en condiciones controladas de laboratorio.
- Metafase.** Fase de la mitosis en la que los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial.
- Técnicas de bandeó.** Métodos citogenéticos que permiten identificar cromosomas mediante patrones de tinción característicos.
- Vellosidades coriónicas.** Pequeñas estructuras de la placenta, formadas por tejido fetal, que permiten el intercambio de nutrientes y oxígeno entre la madre y el feto. Se utilizan en diagnóstico prenatal porque contienen material genético fetal.

PUNTO DE PARTIDA



Procedimiento normalizado de trabajo (PNT): cultivo de la línea celular EPC

En el laboratorio de cultivos celulares, se te solicita elaborar un protocolo para el cultivo de la línea celular de pez EPC (Epithelioma papulosum cyprini), utilizando la información disponible en las colecciones ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, QR1) y ATCC (American Type Culture Collection, QR2).



QR1



QR2

El protocolo debe incluir los siguientes datos mínimos: especie de origen (*Pimephales promelas*), aplicaciones, enfermedades asociadas, tipo celular, grupo de riesgo, morfología y modo de crecimiento.

Además, se deberá detallar la rutina de descongelación, condiciones de cultivo (densidad de siembra aproximada, criterio para el momento del pase, medio de cultivo recomendado con sus suplementos, concentración de suero fetal bovino, rango de temperatura de incubación y la necesidad de atmósfera con CO₂) y protocolo de subcultivo (porcentaje de confluencia recomendado, relación de pase, uso de tripsina/EDTA).

Finalmente, debe contener la identificación de los principales peligros, primeros auxilios, información toxicológica básica de los reactivos clave y el procedimiento de eliminación de residuos según la normativa vigente.

2.1. Introducción

El análisis citogenético tiene como finalidad obtener el cariotipo de una persona para detectar alteraciones en el número o la estructura de los cromosomas. Para observarlos con claridad, deben encontrarse en metafase, momento en el que alcanzan su máximo nivel de compactación. Por ello, se realizan cultivos *in vitro* de células y tejidos humanos que permiten estudiar los cromosomas en el momento adecuado.

En este capítulo aprenderás cómo se obtienen y mantienen los cultivos celulares, las condiciones necesarias para favorecer el crecimiento celular y las estrategias para prevenir y controlar contaminaciones. También conocerás los principales equipos utilizados y la importancia de la técnica aséptica y la bioseguridad en el laboratorio. Estos conocimientos constituyen la base del trabajo citogenético.

2.2. Técnicas de obtención y mantenimiento de los cultivos

Los procedimientos de cultivo varían según el tipo de célula estudiada. Antes de profundizar en las metodologías específicas aplicadas a cada tejido, es conveniente revisar algunos aspectos generales del crecimiento celular *in vitro*.

2.2.1. Definición de cultivo celular

El cultivo celular se define como la serie de métodos mediante los cuales células extraídas de un organismo se mantienen y multiplican fuera de él (*in vitro*), en condiciones controladas de temperatura, pH, nutrientes y demás variables ambientales. Estas células se desarrollan dentro de un medio nutritivo apropiado, lo que garantiza su supervivencia y facilita el análisis reproducible de sus características y funciones.

2.2.2. Tipos de cultivos celulares

Existen diversas formas de clasificar los cultivos celulares, según el nivel de conservación de la estructura del tejido u órgano de origen, sus características y el tiempo que pueden mantenerse en el laboratorio.

- a) Según el nivel de conservación de la estructura del tejido u órgano de origen, se distinguen los cultivos de órganos, de explantes y de células.
 - *Cultivo de órganos*: consiste en mantener pequeños fragmentos de tejido u órganos completos (ganglios linfáticos, piel, fragmentos hepáticos...) *in vitro*. Para ello, el órgano se coloca sobre una rejilla en contacto con el medio de cultivo, del cual obtiene nutrientes y al que libera desechos (figura 2.1).

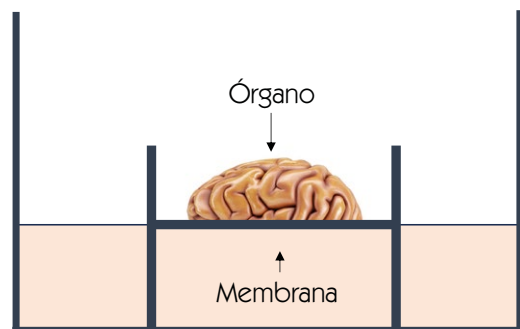


Figura 2.1
Cultivo de órganos

Este método conserva en parte la estructura tridimensional del tejido y mantiene las interacciones entre sus células, por lo que refleja bastante bien el tejido original.

Sin embargo, estos cultivos no crecen mucho, ya que la proliferación se limita a algunas células periféricas, y no pueden propagarse. Además, su reproducibilidad es baja, porque se necesita un nuevo fragmento de tejido para cada experimento, lo que aumenta el trabajo y dificulta obtener resultados consistentes.

- **Cultivo de tejidos (explantos):** en este tipo de cultivo, pequeños fragmentos de tejido se colocan directamente sobre la superficie de un soporte, donde se adhieren. A partir de estos fragmentos, las células ubicadas en la periferia comienzan a migrar y a multiplicarse, extendiéndose sobre la superficie del soporte (figura 2.2).

Una de las principales ventajas de este método es que el tejido conserva parte de su organización original y las interacciones entre sus células. Gracias a ello, las células mantienen durante más tiempo características muy similares a las que presentaban en el organismo de origen, lo que lo convierte en un modelo muy útil para su estudio.

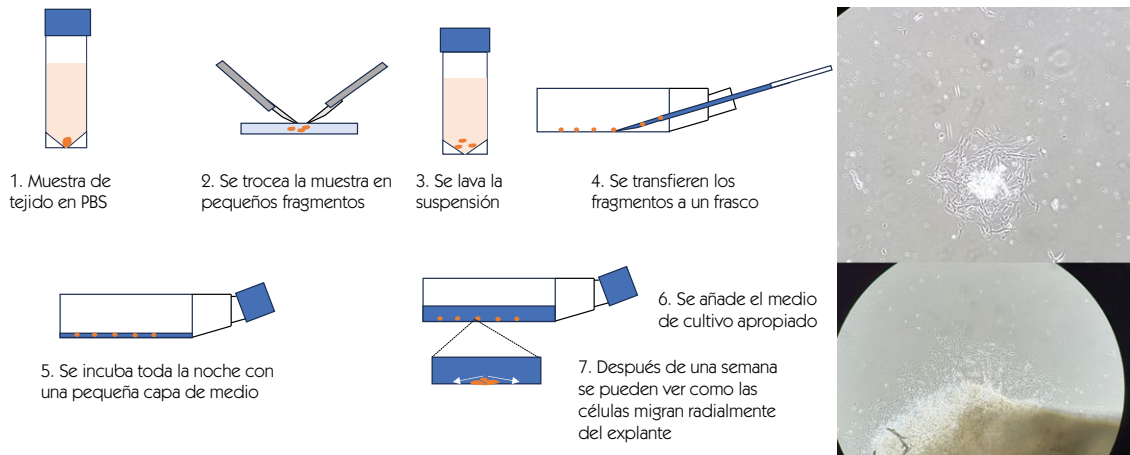
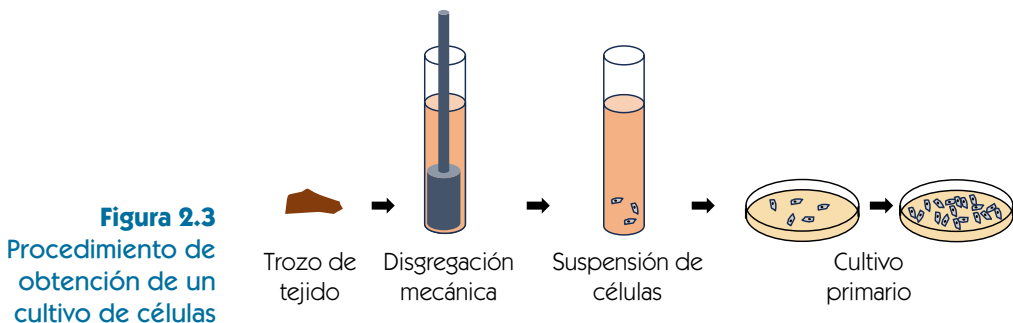


Figura 2.2
Procedimiento del cultivo de explantes (izquierda) y observación al microscopio de un cultivo de explantes (derecha)

- **Cultivos celulares (por disgregación de tejidos):** este tipo de cultivo se obtiene a partir de muestras de distintos tejidos, que se separan en células individuales para formar una suspensión celular (figura 2.3). Esta disgregación puede realizarse mediante métodos mecánicos, químicos o enzimáticos. También es posible esta-



blecer estos cultivos a partir de líneas celulares comerciales o de muestras biológicas como sangre periférica, médula ósea, células hematopoyéticas o líquido amniótico.

En este proceso se pierden las interacciones naturales entre las células y entre las células y la matriz extracelular.

Este es el tipo de cultivo más utilizado en el laboratorio, ya que permite una alta capacidad de crecimiento y propagación celular.



COMPLEMENTO DIGITAL 2.1

Cultivo celular: técnicas avanzadas, recursos y aplicaciones

En este complemento digital encontrarás información sobre los cultivos histotípicos y organotípicos; las fases del cultivo celular y las bases de datos oficiales de colecciones de cultivos celulares; las ventajas, inconvenientes y aplicaciones de los cultivos celulares; los componentes de los medios de cultivo, tipos de suero utilizado en cultivos celulares y las características físico-químicas de los medios de cultivo; una descripción detallada de los tipos de recipientes para el cultivo celular; las dos técnicas principales de separación y aislamiento celular basadas en propiedades inmunofenotípicas; el procedimiento de descongelación; y el procedimiento general para la criopreservación de células cultivadas. Para acceder, visita la web de Síntesis (www.sintesis.com) e introduce el código que aparece en la página 13 de este libro.

Dependiendo de la forma en que mantienen el pH del medio, los cultivos pueden ser cerrados o abiertos:

- Los *cultivos cerrados* son aquellos en los que los tubos o recipientes permanecen completamente sellados. Estos cultivos incluyen HEPES para mantener estable el pH. Este sistema no necesita incubadoras con control de CO₂ ni de humedad, lo que evita los problemas asociados a estos equipos.
- Los *cultivos abiertos* son aquellos en los que los recipientes de cultivo se dejan entreabiertos dentro de la incubadora, que posee una atmósfera con un 95 % de aire y un 5 % de CO₂. Esta composición mantiene el equilibrio del CO₂ en el medio, evitando cambios bruscos de pH.



TOMA NOTA

El mantenimiento del pH del medio de cultivo entre los límites 7-7,4 es fundamental para la supervivencia de las células. Se puede conseguir añadiendo un *buffer* como el HEPES al medio de cultivo, o bien con una atmósfera de CO₂ y un medio con bicarbonato.

Dependiendo de las condiciones en las que estos se realicen, los cultivos celulares se pueden clasificar, según el estado en el que se encuentran las células en el cultivo, en dos tipos: en monocapa y en suspensión (figura 2.4).

- *Cultivos en monocapa*: las células se adhieren al fondo del recipiente de cultivo, se dice que son dependientes del anclaje, porque necesitan una superficie sólida para crecer. Una vez que se adhieren, empiezan a dividirse y proliferar formando colonias en una única capa celular.

El soporte suele ser el fondo de una placa o de un frasco de plástico, aunque en algunos casos los requerimientos son más complejos, y necesitan recubrir previamente el plástico con componentes de la matriz extracelular, como colágeno o fibronectina, que rodean a las células en los tejidos y con los que estas interactúan. Es el método más empleado para cultivar la mayoría de las células.

- *Cultivos en suspensión*: las células que crecen libres en el medio líquido, sin necesidad de adherirse a ninguna superficie. Este método se utiliza principalmente con células que, por naturaleza, no requieren fijación para proliferar, como las células sanguíneas o ciertas líneas celulares adaptadas para este tipo de crecimiento.

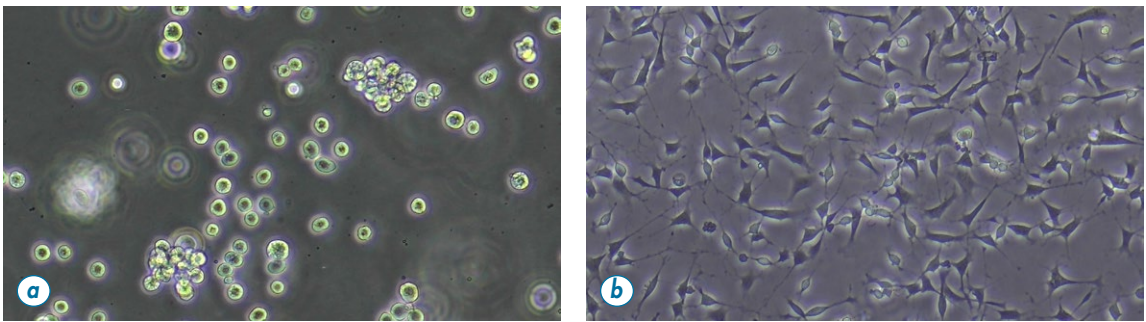


Figura 2.4

a) Cultivo de células en suspensión. b) Cultivo de células en monocapa

- b) Según la procedencia de la suspensión celular de partida, los cultivos pueden ser primarios o secundarios:
- *Cultivo celular primario*: es aquel que se obtiene directamente a partir de un tejido u órgano recién extraído. Las células se aíslan mediante métodos mecánicos, químicos o enzimáticos y se cultivan *in vitro*.
 - *Cultivo celular secundario*: se obtiene cuando se realiza un subcultivo o pase de células que ya han sido cultivadas previamente *in vitro*, ya sea a partir de un cultivo primario o de otro secundario. Este proceso se lleva a cabo cuando las células han crecido hasta cubrir completamente la superficie del recipiente, formando una monocapa; al alcanzar la *confluencia* (figura 2.5), dejan de proliferar y es necesario trasladarlas a un nuevo frasco con medio fresco para que continúen creciendo. Los cultivos secundarios permiten mantener las células durante períodos más prolongados y son útiles en diversos estudios, como ensayos bioquímicos, toxicológicos o de virología. Sin embargo, con cada pase, las células pueden acumular cambios genéticos y su

capacidad para dividirse disminuye con el tiempo. Por otra parte, a medida que se realizan más subcultivos, predominan los tipos de células que se reproducen más rápidamente, y la población se vuelve más uniforme, dando lugar a lo que se conoce como línea celular primaria o finita.

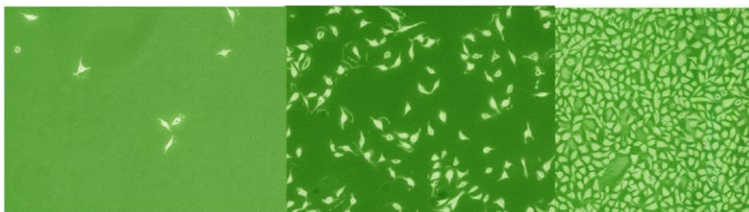


Figura 2.5
Diferencia de densidad celular hasta alcanzar la confluencia



TOMA NOTA

Es importante conocer y registrar el número de pase en un cultivo celular porque las células cambian con cada subcultivo; su estabilidad genética, su comportamiento y su capacidad de respuesta pueden alterarse con pases elevados. Llevar este control garantiza la calidad del experimento, la reproducibilidad de los resultados y evita trabajar con líneas celulares deterioradas o senescentes.

Puedes leer sobre las fases del cultivo celular y las bases de datos oficiales de colecciones de cultivos celulares en el apartado 2 del complemento digital 2.1.



ACTIVIDADES PROPUESTAS

- 2.1.** Respecto a los cultivos de órgano, de explantes y de células, indica en cuál de ellos:
 - a) Se mantienen mejor las características tridimensionales del tejido.
 - b) Es necesario aplicar procedimientos de disgregación mecánica.
 - c) Se observa un crecimiento más rápido y se alcanza una mayor densidad celular.
 - d) El crecimiento se limita principalmente a las zonas periféricas.
- 2.2.** Describe el procedimiento para obtener un cultivo primario y cómo se origina un cultivo secundario.
- 2.3.** Explica el concepto de confluencia, cómo se alcanza durante el cultivo celular y qué acciones deben realizarse una vez alcanzada.
- 2.4.** Explica la utilidad de los cultivos secundarios.
- 2.5.** Indica la diferencia entre cultivo en suspensión y monocapa y los tipos de células que crecen en cada uno de ellos.

2.2.3. Líneas celulares

Las líneas celulares se clasifican en dos tipos principales: las líneas finitas y las continuas o inmortales.

- *Las líneas celulares finitas*, generalmente derivadas de cultivos primarios, provienen directamente de tejidos y tienen una capacidad limitada de divisiones, entrando en senescencia tras unas pocas decenas de pases. Para mantener su viabilidad, deben criopreservarse en los primeros subcultivos, registrando siempre el número de pases para estimar su vida útil restante.
- *Las líneas celulares continuas o inmortales* derivan de cultivos primarios que han sufrido transformaciones genéticas que les permiten dividirse indefinidamente, ya sea de forma espontánea o inducida.

Estas células presentan cambios como crecimiento acelerado, menor adherencia, independencia de factores de crecimiento y alteraciones morfológicas, además de inestabilidad genética y cariotipos anormales, lo que las hace útiles como modelos para el estudio del cáncer.

Puedes leer sobre las ventajas, inconvenientes y aplicaciones de los cultivos celulares en el apartado 3 del complemento digital 2.1.

2.3. Factores que intervienen en el cultivo

El éxito de un cultivo celular depende de un control adecuado de diversos factores, como la composición del medio de cultivo, el tipo de soporte utilizado para el crecimiento celular y las condiciones de incubación (temperatura, humedad y aporte de CO₂). Asimismo, resulta fundamental prevenir la contaminación mediante el uso de técnicas asépticas y, en ocasiones, con la incorporación de antibióticos y antifúngicos.

2.3.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo celular son soluciones nutritivas diseñadas para mantener y estimular el crecimiento y la función de las células fuera del organismo, recreando un entorno físico-químico similar al del medio in vivo. Sus funciones principales incluyen el aporte de nutrientes esenciales, la provisión de factores de crecimiento y hormonas necesarios para el crecimiento celular, y la regulación del pH y la presión osmótica del cultivo, lo que asegura la viabilidad y el comportamiento adecuado de las células.

A) Tipos de medios de cultivo

La selección del medio adecuado resulta fundamental para garantizar un crecimiento celular óptimo y un comportamiento fisiológico apropiado. Existen numerosos tipos de medios de cultivo (figura 2.6) que se diferencian por su composición:

- *Las soluciones salinas equilibradas* contienen sales y sistemas tampón en condiciones isotónicas que mantienen estable el pH y la osmolaridad, imitando el entorno fisiológico. Estas soluciones sirven de base para muchos medios de cultivo, se utilizan para reconstituir reactivos como tripsina y permiten conservar células de mamífero durante lavados, disecciones o incubaciones cortas (menos de 4 horas). Algunas fórmulas carecen de glucosa o de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} . Ejemplos habituales son solución salina de tampón fosfato (PBS), solución salina de tampón fosfato de Dulbecco (DPBS), solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), y solución salina equilibrada de Earle (EBSS).
- *El medio basal* es una mezcla de nutrientes y sales. Existen diversas formulaciones como el Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) y Roswell Park Memorial Institute (RPMI).

Las células pueden sobrevivir durante un breve tiempo en este tipo de soluciones salinas, pero si han de ser cultivadas por períodos más largos necesitan medios completos.

- *El término medio completo* es un medio basal al que se han añadido los nutrientes necesarios para el crecimiento celular. Los componentes inestables se añaden justo antes de su uso (glutamina, suero, factores de crecimiento u hormonas). Se utilizan dos tipos de medios completos, los de composición no definida y los de composición definida.
- *Los medios completos no definidos*, también denominados clásicos o complejos, se preparan a partir de un medio basal al que se añaden aminoácidos, vitaminas y componentes de origen biológico, como suero o extractos, que aportan factores de crecimiento necesarios para la proliferación de células con mayores requerimientos. Sin embargo, debido a la naturaleza de estos aditivos, su composición química exacta no es conocida, lo que los hace muy nutritivos, pero introduce una mayor variabilidad entre lotes y entre experimentos. En el cuadro 2.1 se muestran ejemplos de medios clásicos.



Figura 2.6
Medios de cultivo, Corning®

CUADRO 2.1. Ejemplos de medios de cultivo clásicos

Nombre del medio	Características	Utilidad
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Baja concentración de calcio. Se complementa con suero fetal bovino, L-glutamina, antibióticos y, en cultivos cerrados, un regulador de pH como HEPES.	Para cultivos en suspensión. Por ejemplo, para obtener cariotipos de linfocitos de sangre periférica.
HAM'S F10 y F12	Medios muy ricos. Requiere de suplementos similares al RPMI.	Para células especializadas que crecen en monocapa, especialmente fibroblastos de líquido amniótico, vellosidades coriales y otros tejidos.
Medio Chang	Permite trabajar con poco suero. Necesita la adición de L-glutamina y antibióticos.	Reduce aproximadamente a la mitad el tiempo de cultivo de células fetales.

- *Los medios de cultivo completos definidos*, también llamados medios libres de suero o medios sintéticos, se caracterizan por tener una composición química completamente conocida y controlada de manera exacta, lo que permite un control riguroso y reproducible de las condiciones de cultivo celular. Estos medios no requieren la adición de suero, ya que incorporan en su formulación factores de crecimiento específicos adaptados a los requerimientos de diferentes tipos celulares. Debido a su alta especificidad, suelen estar diseñados para un solo tipo celular o para un grupo reducido de células, lo que optimiza su rendimiento en experimentos donde se busca minimizar la variabilidad y maximizar la reproducibilidad.

B) *Los componentes básicos de los medios de cultivo son:*

Un medio de cultivo típico incluye agua, sales minerales, glucosa, vitaminas, suero, aminoácidos (como L-glutamina), factores de crecimiento, reguladores e indicadores de pH (por ejemplo, HEPES y rojo fenol) y antibióticos como penicilina y estreptomina.



RECUERDA

Los medios específicos para cada tipo celular se pueden adquirir comercialmente y se someten a controles de calidad rigurosos que verifican esterilidad, propiedades bioquímicas y físicas, funcionalidad y niveles de endotoxinas. Estos medios y las soluciones salinas equilibradas se suministran tanto en formato líquido como en polvo; las presentaciones líquidas pueden venir listas para usar (1×) o como concentrados (por ejemplo, 10×), que resultan más económicos, pero requieren dilución antes de su utilización.

Los medios de cultivo celular contienen agua ultrapura en la que se disuelven sales minerales que mantienen el equilibrio osmótico, el pH y aportan iones esenciales para la función celular.

Incluyen hidratos de carbono, principalmente glucosa, como fuente de energía, y aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas, junto con glutamina, clave para el metabolismo celular aunque inestable, por lo que a veces se sustituye por formas más estables.

También contienen vitaminas, esenciales como cofactores para el crecimiento, y factores de crecimiento, que favorecen la proliferación y supervivencia celular, generalmente aportados por el suero fetal bovino, aunque actualmente se tiende a usar medios sin suero por sus inconvenientes.

Los medios de cultivo pueden incluir antibióticos y antifúngicos para reducir contaminaciones, aunque no se recomienda su uso rutinario por posibles efectos citotóxicos y generación de resistencias.

Los indicadores de pH, como el rojo fenol, permiten controlar visualmente el estado del medio y detectar problemas, aunque pueden interferir en algunas técnicas. Para mantener un pH adecuado ($\approx 7,2-7,4$), se emplean sistemas tampón como bicarbonato/ CO_2 o HEPES.

También se añaden agentes mitógenos para estimular la división celular y suplementos orgánicos (lípidos, nucleótidos, proteínas, etc.) que favorecen el crecimiento y funcionamiento celular.

Puedes encontrar información sobre los componentes de los medios de cultivo, los tipos de suero utilizado en cultivos celulares y las características físico-químicas de los medios de cultivo en el apartado 4 del complemento digital 2.1.



ACTIVIDAD GRUPAL 2.1

En grupos, reflexionad cómo la sustitución del suero bovino fetal por medios libres de suero ayuda a la implementación de los ODS 12: Producción y consumo responsables y ODS 15: Vida de ecosistemas terrestres.



2.3.2. Condiciones de incubación

Los cultivos celulares necesitan unas condiciones ambientales estrictamente controladas. En las incubadoras con CO_2 se pueden mantener de forma constante la temperatura, la atmósfera gaseosa (mediante la inyección y regulación del CO_2) y la humedad, creando así un entorno óptimo para el crecimiento celular.

A) La atmósfera gaseosa

En cultivo celular, el oxígeno y el dióxido de carbono de la fase gaseosa son claves para el crecimiento y el metabolismo.

- El oxígeno atmosférico (aprox. 20-21 %) suele cubrir las necesidades de la mayoría de cultivos celulares, aunque algunos cultivos de órganos o tejidos 3D requieren tensiones mayores por la dificultad de difusión gaseosa. Por otra parte, un exceso de O₂ favorece la formación de radicales libres, por lo que para mantener una oxigenación adecuada, se deben ajustar factores como la profundidad del medio y la presencia de componentes protectores.
- El dióxido de carbono (CO₂) es esencial para mantener el pH en muchos medios de cultivo celular porque forma un sistema tampón junto con el bicarbonato sódico. El CO₂ disuelto reacciona con el agua para formar ácido carbónico, que se disocia parcialmente en bicarbonato e iones H⁺.



Si entra una base, los H⁺ del ácido carbónico la neutralizan, y si entra un ácido, el bicarbonato capta esos H⁺ y vuelve a convertirse en ácido carbónico.

Por otra parte, cambios en la cantidad de CO₂ alteran este equilibrio: una disminución de CO₂ reduce el ácido carbónico, eleva el pH alcalinizando el medio, mientras que un aumento de CO₂ incrementa el ácido carbónico y acidifica el medio.



TOMA NOTA

Cuando se utilizan medios con bicarbonato, es necesario aportar CO₂ externo (≈ 5 %) para mantener el pH en valores fisiológicos (7,2-7,4), especialmente en cultivos abiertos o densos.

En cultivos cerrados, el CO₂ producido por las propias células puede ser suficiente si la concentración de bicarbonato es baja, aunque se recomienda añadir HEPES para mejorar la estabilidad del pH.

B) Temperatura

La temperatura es clave para el crecimiento celular y debe controlarse con precisión; en células humanas, el valor óptimo es alrededor de 37 °C.

La hipertermia es más perjudicial que la hipotermia: pequeños aumentos pueden causar rápidamente la muerte celular, mientras que descensos moderados solo ralentizan el crecimiento y suelen ser reversibles, permitiendo incluso la conservación a bajas temperaturas.

Además, la temperatura influye en el pH del medio, ya que el CO₂ es más soluble en frío, por lo que el pH se ajusta ligeramente por debajo del valor final para que, al incubar a 37 °C, alcance el rango adecuado.

C) Humedad

La humedad ambiental también influye en el crecimiento celular, porque si es baja el medio se evapora, los cultivos se “secan” parcialmente y aumenta la concentración de solutos, lo que

altera tanto el pH como la osmolaridad del medio. Para evitarlo, las incubadoras suelen mantener una humedad relativa muy alta, alrededor del 95-98 %, ya sea mediante bandejas con agua que se evapora o mediante sistemas que generan vapor o atomizan agua estéril.



ACTIVIDADES PROPUESTAS

- 2.6.** Explica la utilidad de los siguientes componentes del medio de cultivo: rojo fenol, anfotericina y HEPES
- 2.7.** Explica la utilidad de mantener las células en incubadoras con CO₂ en los cultivos abiertos en los que se usa un medio de cultivo que contiene bicarbonato.

2.3.3. El soporte físico. Recipientes y sustratos

En cultivo celular se utilizan recipientes con distintos soportes para el crecimiento de las células, y su elección depende del tipo celular (adherente o en suspensión), de la cantidad de células que se desea obtener y del objetivo del experimento. Al planificar el cultivo es necesario valorar tres aspectos del recipiente: el material o sustrato del que está hecho, su diseño o geometría y los tratamientos aplicados a la superficie que condicionan la adhesión y el comportamiento celular.

A) Sustrato

Los sustratos utilizados en los cultivos celulares son materiales que proporcionan una superficie de soporte para el crecimiento y la adhesión de las células. Deben ser fácilmente esterilizables, no tóxicos para las células y además presentar una buena calidad óptica que permita la observación de los cultivos mediante microscopio invertido. Los materiales más empleados para este fin son el vidrio y el plástico.

En cultivo celular se emplean distintos soportes según las necesidades del crecimiento:

- El vidrio ofrece una superficie lisa, transparente y fácil de esterilizar, ideal para la observación microscópica. El plástico desechable, generalmente de poliestireno, es el más utilizado por su bajo coste y facilidad de uso; puede tratarse para favorecer la adhesión celular.
- Los microsoportes son estructuras microscópicas que aumentan la superficie de cultivo, permitiendo crecer células adherentes en suspensión, como en biorreactores. Las matrices tridimensionales imitan la matriz extracelular y favorecen un crecimiento más realista en 3D.
- Por último, las capas alimentadoras *feeder layers* son células inactivadas que proporcionan soporte y factores de crecimiento para cultivos más exigentes, como las células madre.

La adhesión de células dependientes de anclaje puede mejorarse mediante el *coating*, que consiste en recubrir la superficie de cultivo con moléculas de matriz extracelular como polilisina, colágeno o fibronectina. Este proceso imita el entorno natural y puede hacerse antes de sembrar las células o añadiendo estas moléculas al medio de cultivo.

Aunque no siempre es necesario, resulta especialmente útil o indispensable en muchos cultivos, sobre todo en los primarios.

B) Tipos de recipientes para el cultivo celular

Existe una gran variedad de recipientes para el cultivo de células (figura 2.7). La característica más importante es la superficie disponible para el crecimiento de las células, ya que de ella depende cuántas células se siembran inicialmente y el número aproximado de células que se obtendrán cuando el cultivo alcanza la confluencia.

En cultivo celular se emplean distintos recipientes según el tipo de experimento y volumen.

Las placas Petri son recipientes simples con gran superficie, usadas en cultivos pequeños y de tejidos. Las placas multipocillos permiten realizar múltiples ensayos en paralelo, aunque no son ideales para cultivos prolongados.

Los frascos Roux ofrecen mayor superficie y pueden funcionar como sistemas cerrados o con intercambio gaseoso, siendo adecuados para mantenimiento celular. Las placas con fondo de vidrio y las *chamber slides* facilitan la observación microscópica directa con alta calidad.

Para cultivos en suspensión se utilizan tubos Falcon y tubos truncados, que permiten manipular pequeños volúmenes. Finalmente, las botellas tipo *roller* permiten cultivos a gran escala mediante rotación, mejorando la distribución de nutrientes y oxígeno.

Puedes encontrar una descripción detallada de los tipos de recipientes para el cultivo celular en el apartado 5 del complemento digital 2.1.

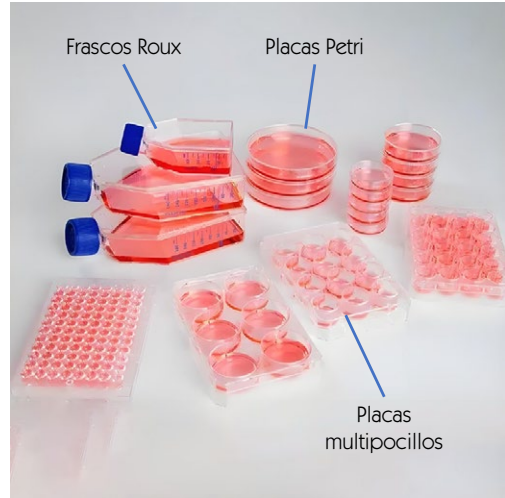


Figura 2.7
Recipientes para cultivo celular,
Thermo Scientific®



Figura 2.8
a) Cámaras de cultivo sobre portaobjetos, MatTek®, b) tubos truncados,
Nunc®, c) botellas para incubadoras tipo *roller*, Pfeiffer®