

CULTIVO CELULAR

Objetivos a los que ha servido el desarrollo del Cultivo Celular:

- 1) Aprender a cultivar células de diferentes tipos y orígenes**
- 2) Conocer la potencialidad del cultivo celular como herramienta de investigación**

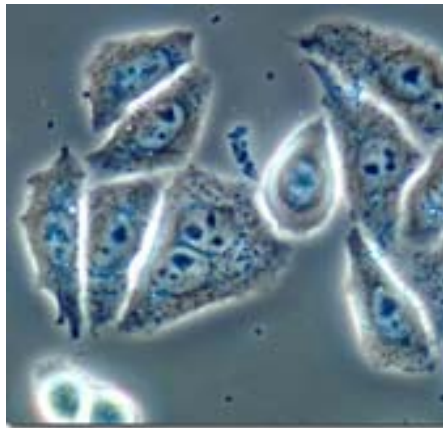
HISTORIA DEL CULTIVO CELULAR

- 1885: Roux, crecimiento de células fuera del cuerpo
- 1913: Carrel, se establecen las condiciones asépticas
- 1952: Gey, se establecen las células HeLa, las primeras células humanas en ser cultivadas. Se obtuvieron a partir de un tumor maligno (carcinoma) de cuello uterino. A estas células se las llama INMORTALES.
- 1960-1965: Stoker, Dulbecco, Green, Transformación con virus
- 1965: Ham, crecimiento clonal de células de mamíferos
- 1976: Sato, Hormonas y Factores de crecimiento requeridos para el medio de cultivo
- 1986, Martin and Evans, se establecen las células ES (Embryonic Stem) de ratón
- 1998, Thomson and Gearhart, se establecen las células ES de humanos

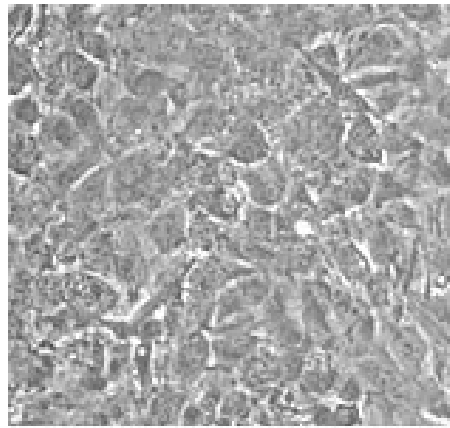
Como cultivar células

Qué se necesita? **CÉLULAS!**

Cultivo Establecido
Ejemplo: HeLa



Cultivo Primario
Ejemplo: Fibroblastos de
embriones



Células Madre o
troncales (stem cells)



CULTIVOS ESTABLECIDOS

- Proliferan indefinidamente por una mutación al azar o dirigida
- Ventajas:
 - muchas clases de líneas celulares
 - en general fáciles de crecer, manipular y almacenar
 - proliferan indefinidamente
- Desventajas:
 - problemas de ploidía
 - pérdida de las propiedades bioquímicas de las células parentales

Cultivos Primarios

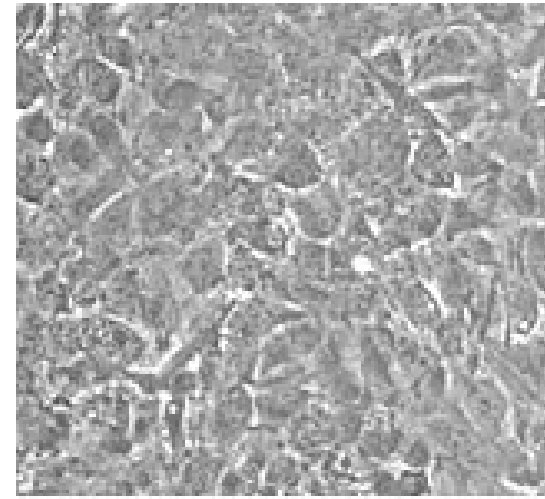
Remover el órgano, digerir con tripsina y colocar en una caja de Petri con medio de cultivo.

Ventajas:

- Número de cromosomas similar al del tejido parental
- Mantiene las propiedades bioquímicas de las células parentales

Desventajas

- Tiempo de vida limitado



Fibroblastos de embrión de ratón

Cultivo de tejido (explanto)

- Se coloca una pieza de tejido en una caja de petri con medio de cultivo y se permite que las células migren fuera del tejido
- Primer tipo de cultivo celular desarrollado
- Se utiliza en los casos en que las células que quieren aislarse son sensibles a proteasa (p. ej. cél. de músculo liso, cél. de hueso)
- También se usa en el caso de pequeñas muestras de tejido (cuando se realiza una biopsia con aguja)
- Método poco efectivo con células que tienen poca adhesión (poca migración)
- Fibrinógeno y trombina pueden utilizarse para estimular la adhesión
- Desventajas: La selección se hace por velocidad de migración; tipo de adhesión, localización dentro del tejido, etc.

CÉLULAS MADRE

- Células con capacidad de autogenerarse que en condiciones adecuadas de crecimiento pueden diferenciarse en diferentes tipos celulares con funciones biológicas específicas.

Ventajas:

- Pueden inducir múltiples tipos celulares
- Potencialidad en terapéutica



Células madre de embrión humano

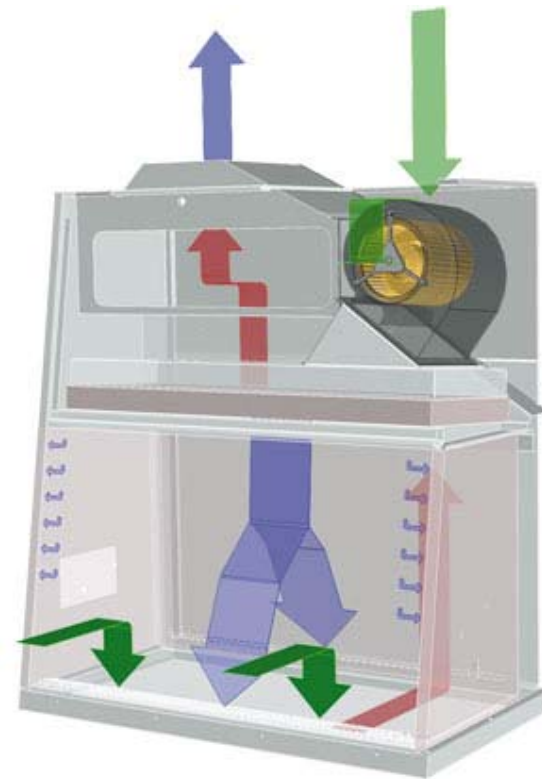
Desventajas:

- Consideraciones éticas por provenir de embriones
- La mayoría de las células madre necesitan crecer sobre células que las alimentan

Composición de Medio de Cultivo (standard)

- Sales inorgánicas: 11%
- Aminoácidos: 2%
- Vitaminas: 1%
- Azúcares: 5%
- Suero: 10%
- Agua: 68%
- Otros: 3%

Campanas de Flujo Laminar



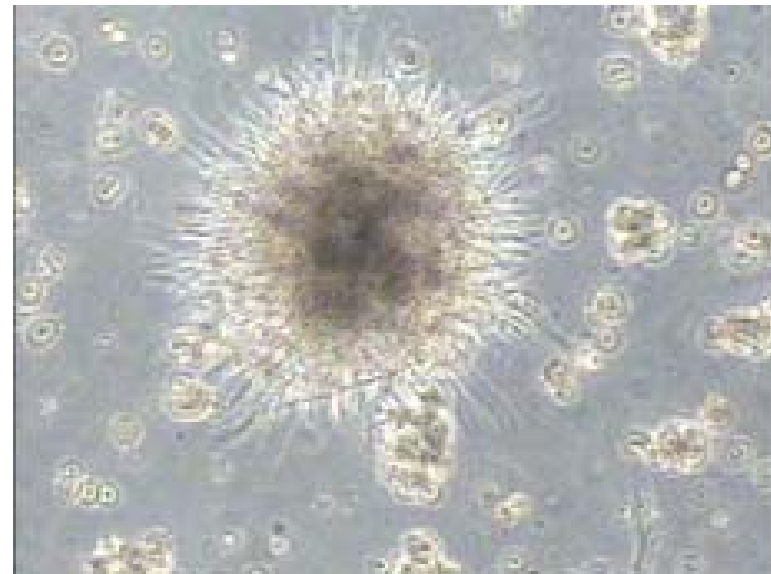
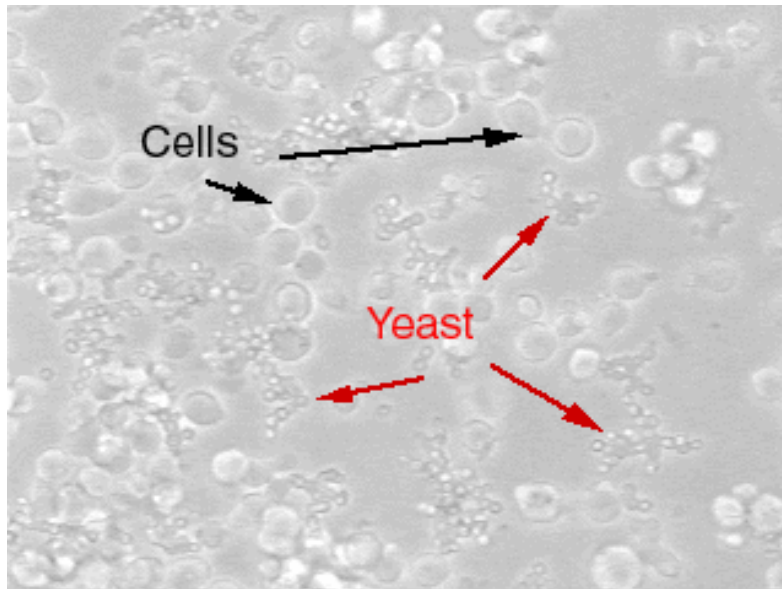
Incubador



- CO₂
- Humedad
- Temperatura

Contaminación

- Bacteria, Moho, Levadura
- Micoplasma
- Contaminación cruzada con otras células



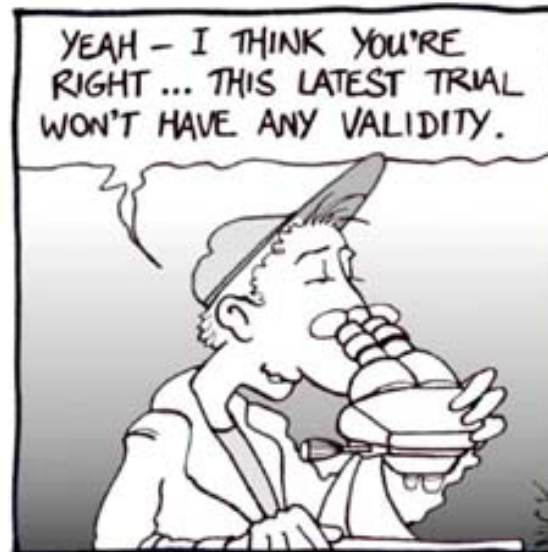
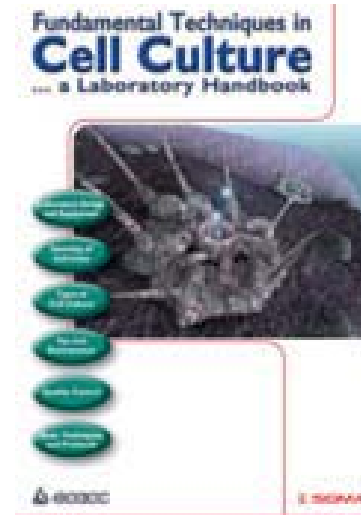
Fuentes de Información adicional

American Type Culture Collection

www.atcc.org

European Collection of Cell Cultures

www.ecacc.org



Cultivo de células como herramienta de investigación

- Sistema Modelo
- Producción de proteínas
- Análisis por químicos
- Desarrollo
- Células utilizadas como fábricas

Sistema Modelo

- Estudio de parámetros relacionados al crecimiento de las células
- Morfología de la células
- Alteraciones Metabólicas
- Niveles de Proteínas

Transfecciones

- Introduce material foráneo en células eucariotas
 - Sobre-expresión (overexpression)
 - Sub-expresión (Downregulation) (RNAi, knock down)
 - Producción de proteínas (baculovirus, adenovirus)

Introducción del DNA en la célula

- Químicos (Fosfato de Ca^{2+} , DEAE-dextran)
- Liposomas
- Electroporación
- Virus (Baculovirus, Adenovirus, Lentivirus)

Transfección Transiente

- **Transiente**

- El DNA no se inserta en el DNA genómico de la célula huésped
- El DNA se pierde luego de la división celular

Ventajas:

- Rápido y fácil

Desventajas:

- No se puede controlar la expresión de la proteína

Transfección Estable

- **Estable**

- El DNA se inserta en el genoma de la célula huésped
- La presión de selección mantiene el DNA foráneo

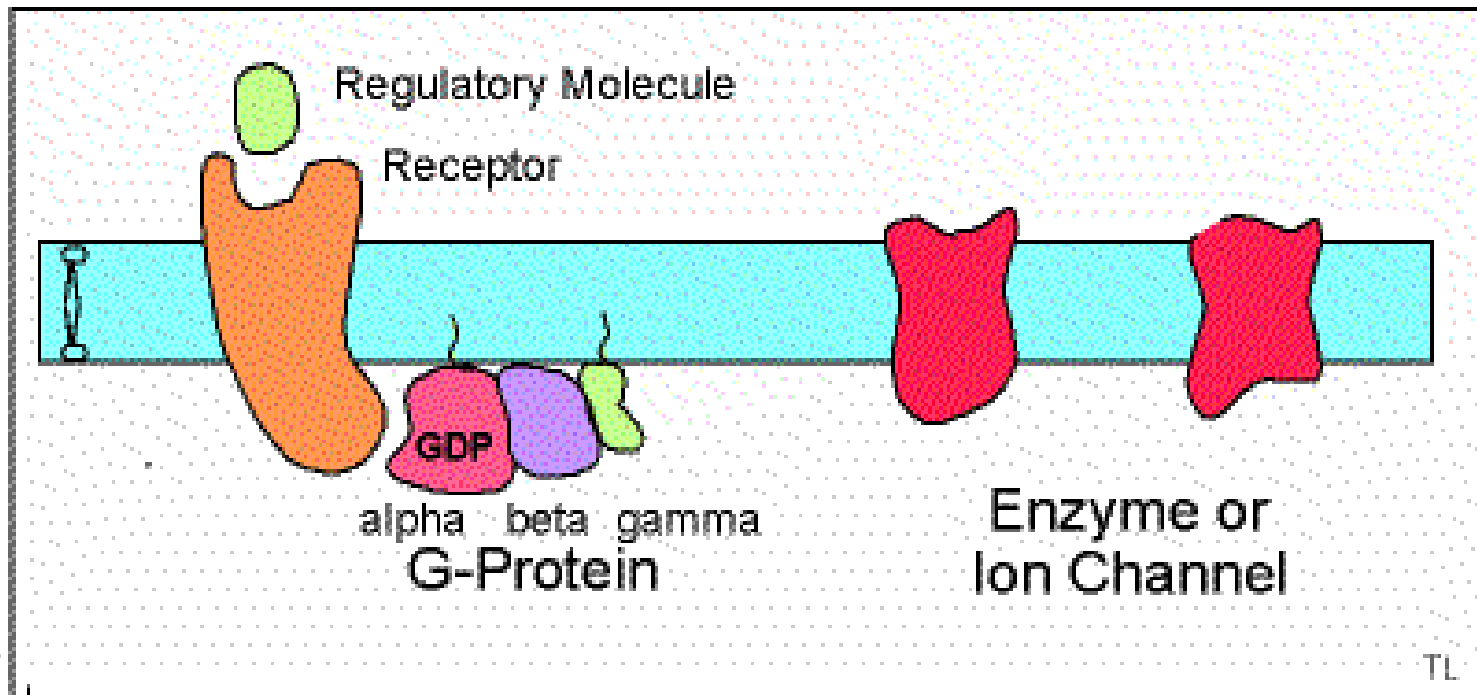
Ventajas

- Genera una línea celular que puede ser mantenida
- Todas las células expresan la proteína al mismo nivel

Desventajas

- Requiere más tiempo para el establecimiento de la expresión estable
- No se puede controlar el lugar donde se inserta el DNA foráneo

G-Protein (trimeric G-binding proteins)



Activation of K-channels and
adenylate cyclase by G-
protein