



Los cultivos celulares: una herramienta clave

Los científicos han desarrollado metodologías para aislar células y obtener, a partir de ellas, poblaciones homogéneas que luego pueden ser analizadas, e incluso multiplicarse *in vitro* (“en vidrio” = en el laboratorio). Esto ofrece ventajas en la investigación básica ya que permite estudiar diversos procesos que ocurren en las células, y en la investigación aplicada para la producción de moléculas de interés, ingeniería de tejidos, entre otras.

Las células pueden ser aisladas y separadas en diferentes tipos

El primer paso para aislar células del mismo tipo a partir de un tejido (formado por células de diversos tipos) es separar la matriz extracelular que las une. Para lograrlo, la muestra de tejido es tratada con diversas enzimas proteolíticas (como tripsina y colagenasas) que degradan las proteínas de la matriz; también se utilizan agentes (como el EDTA - ácido etilendiaminotetraacético-) que pueden secuestrar al ion calcio, del cual depende la adherencia celular. De esta forma, y mediante una suave agitación, se obtiene a partir del tejido, una suspensión celular con más de un tipo de célula, probablemente.

Se pueden utilizar varios métodos para separar los diferentes tipos celulares de la suspensión celular, según sus propiedades:

1. La diferencia de tamaño de las células permite separarlas por centrifugación.
2. La capacidad que tienen algunos tipos celulares de adherirse al vidrio o al plástico, permite separarlos de otras células que se adhieren débilmente.
3. Algunos anticuerpos se unen específicamente a sustancias presentes en determinadas células. Luego, se emplea diferentes matrices (como colágeno, bolitas de polisacáridos, plástico) a la cuales sólo las células reconocidas por los anticuerpos podrán adherirse. Las células pueden, luego, recuperarse por agitación, por tratamiento con tripsina que digiere las proteínas que median la adhesión o, en el caso de una matriz digerible (como el colágeno), degradando la propia matriz con enzimas (como la colagenasa).
4. Se emplean anticuerpos acoplados a colorantes fluorescentes para marcar células específicas adheridas a ellos. Las células marcadas por interacción con el anticuerpo pueden ser separadas de las no marcadas en un separador de células activado por fluorescencia o *cell sorter* (ver figura 1).

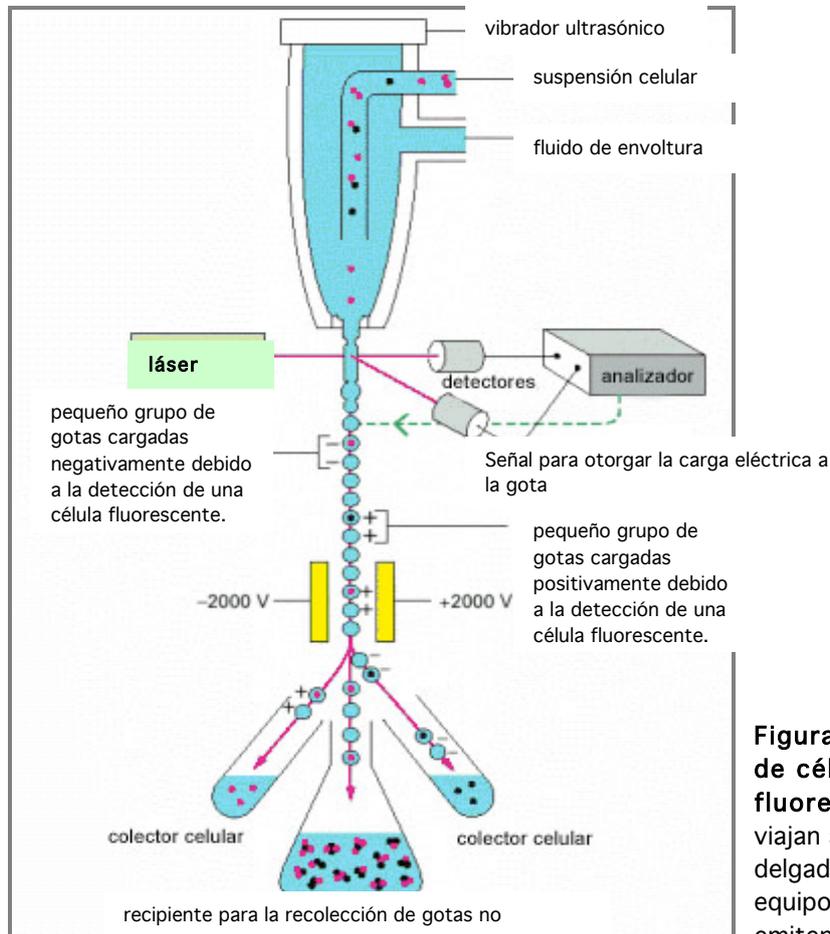


Figura 1. Equipo para la separación de células activado por fluorescencia. Las células individuales viajan a través de un conducto muy delgado y son iluminadas por un láser. El equipo puede detectar qué células emiten fluorescencia (por el anticuerpo adherido).

Cada célula es incorporada en una gota que es “cargada” eléctricamente como negativa o positiva en función de la presencia o ausencia del colorante fluorescente. Luego, las gotas son separadas por un campo eléctrico hacia los recipientes colectores según su carga (adaptado de Alberts y col., MBC 2002).

5. Disección de un grupo de células a partir de una sección de tejido que ha sido preparada para microscopía (ver Cuaderno N° 80). La región que contiene las células de interés es irradiada con un pulso de láser infrarrojo, que funde un pequeño círculo con las células que están por debajo. Estas células capturadas son luego removidas para mayor análisis. La técnica, denominada “*microdisección de captura por láser*”, puede utilizarse, por ejemplo, para aislar diferentes partes de un tumor, y analizarlas.

El Cuaderno de Por Qué Biotecnología es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología de ArgenBio. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso.

Otra técnica relacionada emplea un láser para disectar un grupo de células y catapultarlas a un contenedor apropiado para comenzar los análisis de las mismas (figura 2).

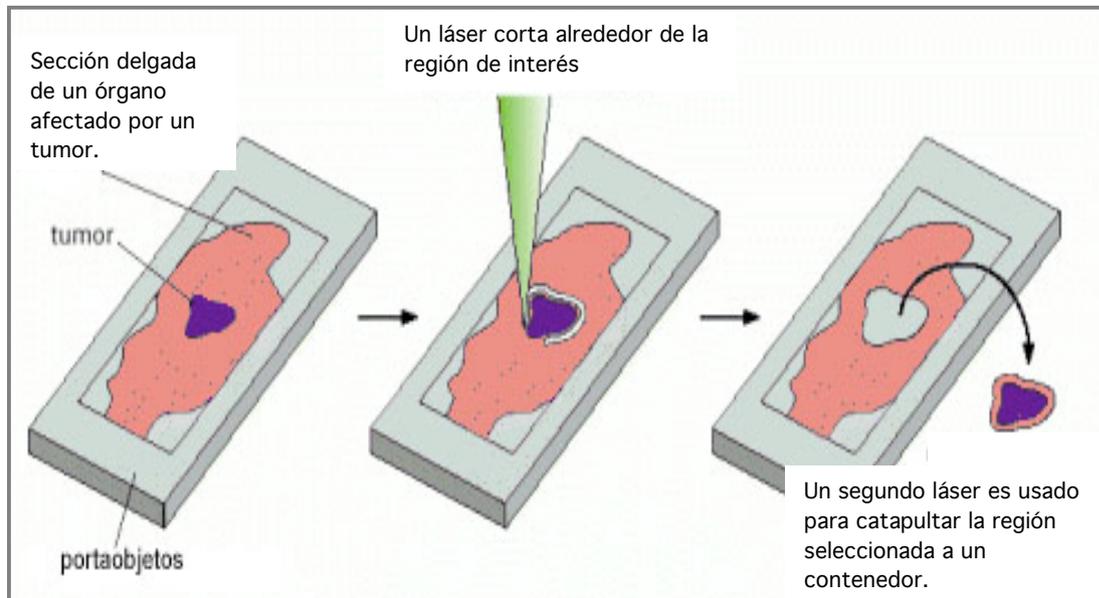


Figura 2. Técnica de microdissección para seleccionar células aisladas a partir de porciones tisulares. Este método emplea un láser para escindir una región de interés y eyectarla a un contenedor, permitiendo el aislamiento aún de una célula individual a partir del tejido. (Fuente: Alberts y col., MBC 2004).

Una vez que se obtiene una población homogénea de células, la muestra puede emplearse para análisis bioquímicos. También provee del material de partida para aumentar el número de células y establecer un cultivo que permita estudiar el comportamiento celular en una placa de cultivo (que no es igual que interactuar con el resto del organismo).

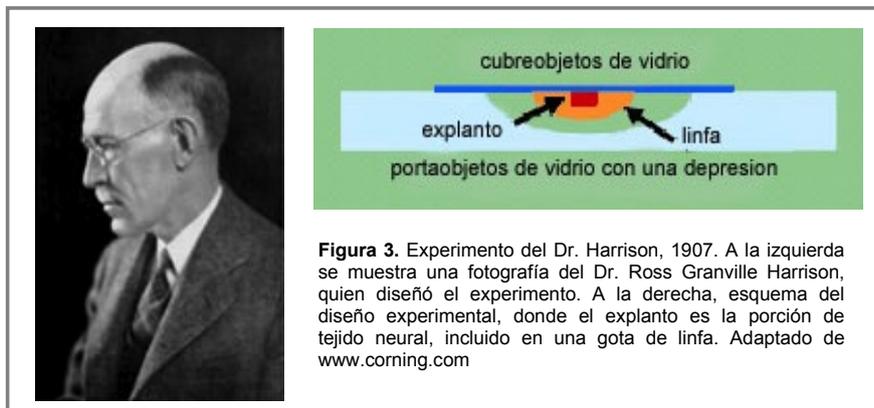
Las células pueden ser crecidas en una placa de cultivo

La mayoría de las células animales y vegetales aisladas pueden vivir, multiplicarse e incluso expresar propiedades diferenciales, si se les provee un medioambiente apropiado en una placa de cultivo. Así, las células pueden ser observadas continuamente bajo el microscopio o analizadas bioquímicamente, con la utilidad de explorar los efectos del agregado o remoción de moléculas específicas, tales como hormonas o factores de crecimiento, al cultivo celular. Además, mezclando dos tipos celulares, las interacciones entre ellas pueden ser estudiadas. Cuando los experimentos se realizan sobre cultivos celulares, se dice que son experimentos “*in vitro*” (“en vidrio”), para diferenciarlos de los experimentos que se llevan a cabo en

organismos completos, a los que se denomina “*in vivo*” (“en el organismo viviente”)¹.

El cultivo de tejidos y células comenzó en 1907 con un experimento diseñado para esclarecer una controversia en la neurobiología por el investigador Dr. Ross Harrison (figura 3), quien trabajaba en la Universidad Johns Hopkins. El investigador publicó un breve pero crítico artículo (“Observaciones de la fibra nerviosa viva en desarrollo”) que introdujo exitosamente una nueva técnica, el cultivo de tejidos, para demostrar experimentalmente cómo las fibras nerviosas se originan. Los experimentos originales en fibras nerviosas se basaron en el cultivo de pequeños fragmentos de tejidos, llamados “explantos”.

Utilizando técnicas asépticas desarrolladas para la manipulación de embriones de ranas, Harrison tomó a partir de uno de ellos, fragmentos del tubo neural (tejido embrionario precursor del sistema nervioso), depositándolo en una gota de líquido linfático fresco (“medio de cultivo”) de rana colocada sobre un cubreobjetos estéril (figura 3). Una vez que la linfa coaguló, invirtió el cubreobjetos sobre un portaobjetos de vidrio que poseía una depresión, creando así un cultivo en gota suspendida, técnica utilizada por los microbiólogos para estudiar las bacterias. Luego de periódicas observaciones al microscopio, pudo describir el desarrollo de fibras nerviosas *in vitro* a partir de las neuronas presentes en el tejido extirpado. Así, además de argumentar sólidamente la “doctrina neural”, resolvió los problemas básicos del cultivo celular, como el medio, la observación y la contaminación.



Con este experimento, el cultivo de células comenzó su camino para convertirse en una gran herramienta tanto para la investigación como para la producción de anticuerpos monoclonales, vacunas y productos farmacológicos a gran escala.

Distintos tipos de cultivos celulares

Actualmente, los cultivos se establecen principalmente a partir de suspensiones celulares generadas por disgregación de tejidos (explicado anteriormente). A

¹ En los laboratorios de bioquímica, por *in vitro* se entienden aquellas reacciones químicas que se llevan a cabo en un tubo de ensayo en ausencia de células, mientras que *in vivo* se refiere a las reacciones químicas que ocurren dentro de la célula, aún en cultivo.



diferencia de las bacterias, la mayoría de las células obtenidas de tejidos no están adaptadas para vivir en suspensión, y requieren una superficie sólida en la cual crecer y dividirse. Para los cultivos celulares, este soporte está generalmente provisto por la superficie de una placa de cultivo plástica. De todas formas, como las diferentes células varían en sus requerimientos, a veces el crecimiento y diferenciación de las mismas sólo se logra recubriendo el soporte plástico con componentes de la matriz extracelular (sustancia que rodea y contiene a las células en los tejidos, con la cuál interactúan), como por ej. colágeno y laminina.

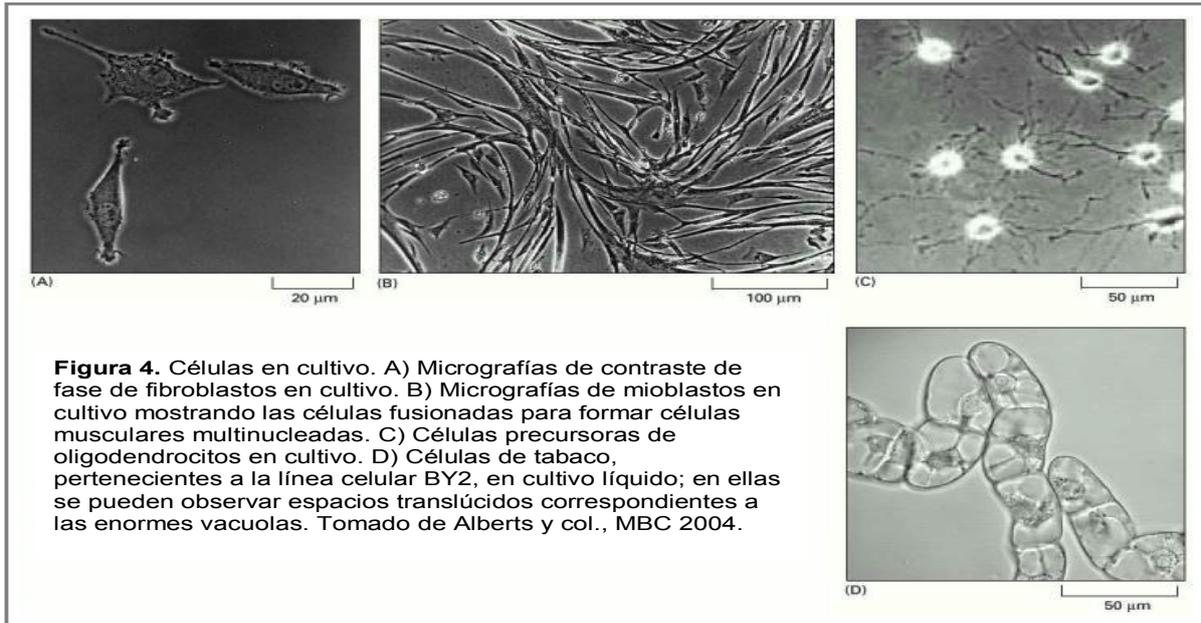
Los cultivos se pueden clasificar en:

- **Cultivos primarios**

Se denomina **cultivo primario** a aquellos cultivos preparados directamente a partir de los tejidos de un organismo, sin proliferación (multiplicación) *in vitro*. Este tipo de cultivo puede iniciarse con o sin fraccionamiento para separar los distintos tipos celulares. En la mayoría de los casos, las células de los cultivos primarios pueden ser removidas del recipiente de cultivo a uno nuevo donde proliferarán para formar varios **cultivos secundarios**.

- **Cultivos secundarios**

En estas condiciones, las células suelen crecer hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una *monocapa* (capa de una célula de espesor), donde como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco; así podrán subcultivarse durante semanas o meses. En este estadio, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades en función de su origen. Por ejemplo, los fibroblastos (células que sintetizan fibras y mantienen la matriz extracelular del tejido de muchos animales) secretarán colágeno; las células derivadas de tejido muscular esquelético se fusionarán para generar fibras musculares con capacidad contráctil espontánea; las células nerviosas extenderán prolongaciones (axones) eléctricamente excitables que podrán conectarse (establecer sinapsis) con otras células nerviosas; las células epiteliales formarán largas capas con varias propiedades de un epitelio intacto (figura 4). Gracias a que estos fenómenos ocurren en cultivo, es posible estudiarlos con diferentes metodologías, a veces no aplicables a tejidos intactos.



• Cultivos continuos o Líneas celulares

La mayoría de las células de los vertebrados cesan su división celular luego de un número finito de divisiones en cultivo, por un proceso llamado *senescencia celular*. Por ejemplo, los fibroblastos humanos normales se dividen solamente entre 25 y 40 veces en cultivo, antes de detenerse. En estas células, así como en muchas otras, la capacidad limitada de proliferación es el resultado de un acortamiento progresivo de los *telómeros* (porción de ADN que se encuentra en los extremos de los cromosomas). En las células somáticas (todas las células que no son células sexuales) se encuentra “apagado” el gen que codifica para la enzima *telomerasa*, que se encarga de mantener la integridad de los telómeros; como consecuencia, los telómeros se acortan en cada división celular. A los fibroblastos humanos se los puede forzar a proliferar indefinidamente si se les provee el gen que codifica para la telomerasa; así, pueden propagarse como una **línea celular** “inmortalizada”. Pero como se mencionó, no todas las células humanas se inmortalizan de la misma manera. Algunas células, a pesar de que sus telómeros permanezcan largos, pueden frenar sus divisiones celulares como consecuencia de la activación de mecanismos denominados “puntos de control” (*check points*) del ciclo celular. Para inmortalizar estas células, hay que lograr la inactivación de los *check-points*. Una forma de hacerlo es introducir ciertos “*oncogenes*” (genes promotores del cáncer) que pueden ser obtenidos de virus cancerígenos (como algunas cepas de HPV o virus del papiloma humano, adenovirus, etc.).

El Cuaderno de Por Qué Biotecnología es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología de ArgenBio. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso.



A diferencia de las células humanas, las de los roedores no tienen “apagado” el gen de la telomerasa, por lo que sus telómeros mantienen el largo a través de las divisiones celulares. Pero cuando son cultivadas, esas células experimentan cambios genéticos que inactivan los mecanismos de check-point, produciendo líneas celulares inmortalizadas espontáneamente.

Ambos tipos de líneas celulares son muy útiles en la investigación celular, como fuente de un gran número de células uniformes, que pueden ser conservadas y almacenadas en nitrógeno líquido (a -196°C) por un período muy largo de tiempo, reteniendo su viabilidad, y constituyen un buen modelo experimental para las primeras etapas de una investigación.

A pesar de la gran similitud que las células de una línea tienen entre sí, no son idénticas. La uniformidad genética en una línea celular puede mejorarse por clonado celular, donde una única célula es aislada y prolifera para formar una gran colonia de células clonales. Una de las aplicaciones más importantes de esta estrategia es el aislamiento de líneas celulares mutantes que poseen defectos en ciertos genes. La información que su estudio puede proporcionar es de gran valor, ya que permite inferir el rol que la proteína ausente o alterada tiene en las células normales.

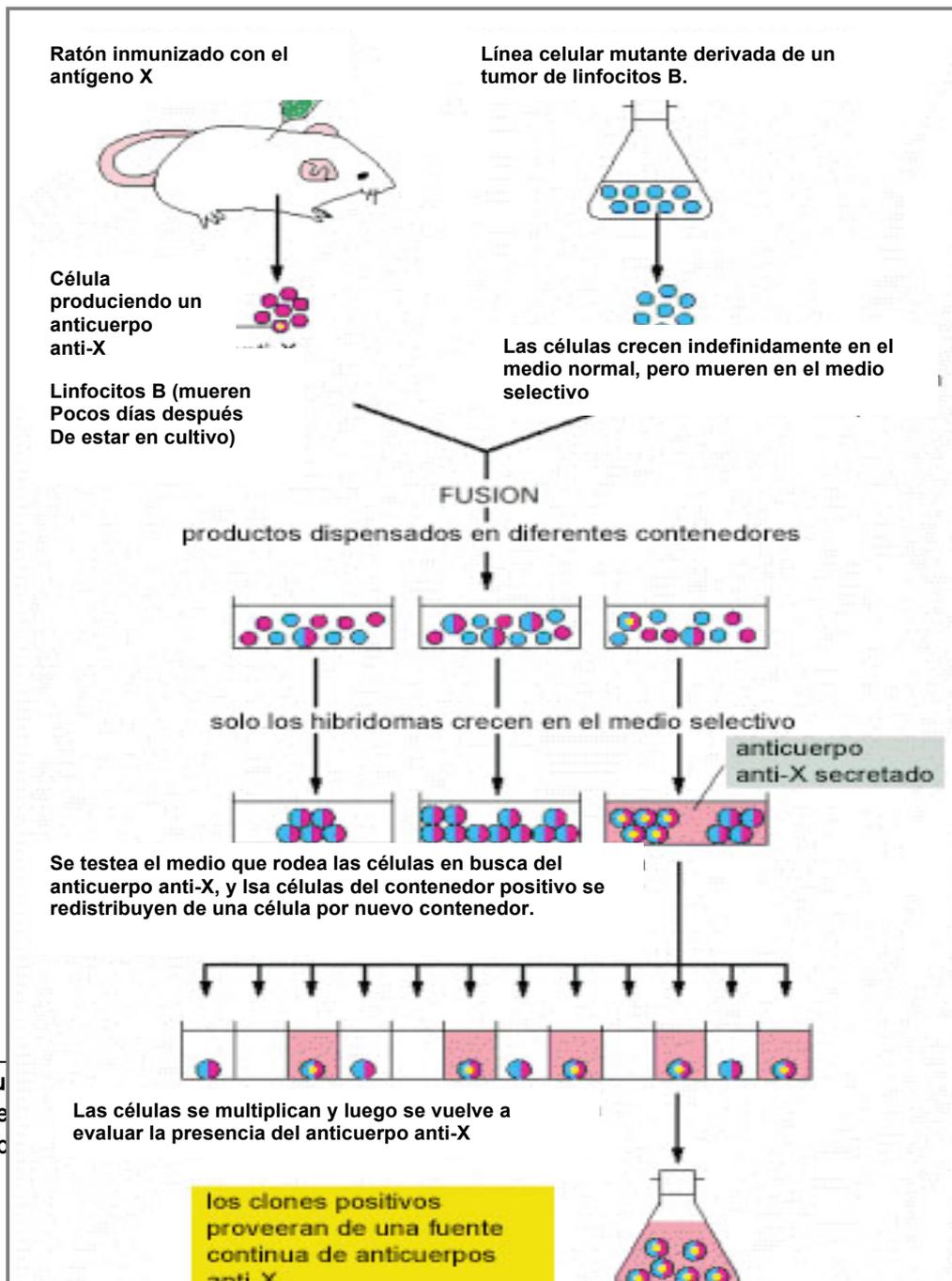
Entre los cultivos celulares más polémicos y promisorios, desde un punto de vista médico, se encuentran las líneas de células madre embrionarias humanas (ver Cuaderno N° 83). Estas células, obtenidas del macizo celular interno de un embrión en los primeros estadios del desarrollo, pueden proliferar indefinidamente reteniendo la habilidad de originar cualquier tipo celular del cuerpo. Estos cultivos celulares podrían potencialmente revolucionar la medicina al proveer de células capaces de reemplazar o reparar tejidos dañados. Otra fuente de células madre que se está investigando es el tejido adulto.

¿Qué son los hibridomas?

Se sabe que es posible fusionar dos células formando un **heterocarionte**, es decir, una célula con dos núcleos separados pero con los contenidos citoplasmáticos compartidos. Para lograrlo, una suspensión de células es tratada con compuestos que inducen la fusión de membranas (fusógenos), tales como ciertos virus o el compuesto polietilenglicol (PEG). Eventualmente, un heterocarionte puede entrar en mitosis, produciendo una **célula híbrida** en la cual las envolturas de ambos núcleos se han disgregado, permitiendo juntar los cromosomas de ambos en un único gran núcleo. Tales células híbridas pueden clonarse estableciendo una línea celular, pero se sabe que en muchos casos la línea resultante es inestable genéticamente, y tiende a perder parte del material genético.

En 1975, un equipo integrado por el científico argentino Dr. César Milstein desarrolló, mediante la técnica de fusión, una línea celular híbrida clave para la producción de anticuerpos monoclonales (todos iguales) para fines de diagnóstico y terapéuticos: los **hibridomas** (este desarrollo llevó al Dr. Milstein a ser galardonado con el Premio Nobel). Los hibridomas son líneas celulares resultantes de la fusión de dos tipos celulares: un linfocito B secretor de inmunoglobulinas (anticuerpos) y una línea celular

derivada de un tumor de linfocitos B. Los linfocitos B secretores de anticuerpos se generan mediante la inmunización de una rata o ratón con un antígeno de interés contra el cual se quieren generar los anticuerpos. Se obtiene como resultado una mezcla heterogénea de células híbridas, seleccionándose a partir de ellas aquellas células con la capacidad de producir el anticuerpo deseado y de proliferar indefinidamente. Estos hibridomas son propagados como clones individuales, cada uno de los cuáles provee una fuente estable y permanente de un único tipo de anticuerpo monoclonal (figura 5). Dicho anticuerpo reconoce un único epítipo antigénico (es decir, por ej., un grupo particular de 5-6 aminoácidos en una conformación espacial también específica). Entre las ventajas de los hibridomas frente a un cultivo clonal de un linfocito B secretor particular, está que los mismos tienen una vida limitada en cultivo.



El Cu
por e
repro
este

sarrollada
enBio. Su
piedad de



Figura 5. Preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales contra un antígeno en particular. Aquí el antígeno de interés es designado como “antígeno X”. El medio de crecimiento selectivo utilizado luego del paso de fusión celular, contiene un inhibidor (aminopterina) que bloquea las rutas biosintéticas normales por las cuales se sintetizan los nucleótidos. Como consecuencia, las células deben utilizar una vía alternativa para fabricar sus ácidos nucleicos. Esta vía es defectiva en la línea celular mutante derivada del tumor de linfocitos B, pero está intacta en las células obtenidas del ratón inmunizado. Debido a que ninguna de las células utilizadas para la fusión inicial puede crecer por sí sola, solo las células híbridas sobreviven. Adaptado de Alberts y col., MBC 2004.

¿Qué contienen los medios para el cultivo de células?

Hasta los años ´70, el cultivo de tejidos parecía resultar de la fusión entre la ciencia y la brujería. De a poco, los fluidos coagulados (como en el experimento de Harrison) fueron reemplazados por placas con medios líquidos que contenían pequeñas cantidades de una serie de moléculas necesarias para la supervivencia y multiplicación celular: sales, glucosa, aminoácidos y vitaminas; además, la mayoría de los medios incluían una mezcla poco definida de macromoléculas adicionadas bajo la forma de suero fetal bovino o equino, o extracto crudo de embriones de pollo. Dichos medios se siguen utilizando en la actualidad (ver tabla 3, para cultivo de células animales) para los cultivos de rutina, generando la dificultad para muchos investigadores en conocer cuáles son las macromoléculas específicas que un dado tipo celular requiere para funcionar normalmente.

Como consecuencia se desarrollaron numerosos medios químicamente definidos, denominados “libres de suero”, que poseen, además de las pequeñas moléculas

El Cuaderno de Por Qué Biotecnología es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología de ArgenBio. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso.

mencionadas, varias proteínas específicas necesarias para la supervivencia y proliferación, como factores de crecimiento (estimulan la proliferación celular). Así se descubrieron muchas moléculas de señalización extracelulares esenciales para la supervivencia, desarrollo y proliferación de determinados tipos celulares, gracias a estudios que buscaban establecer las condiciones mínimas de cultivo para un comportamiento celular adecuado.

Otro componente de importancia para los medios de cultivo son compuestos indicadores de pH. Los mismos le otorgan color al medio, que puede ir virando hacia otro color en función de los cambios de acidez del medio, permitiendo monitorear un parámetro muy importante para el cultivo celular.

Tabla 3. Composición de medios de cultivo para células eucariotas animales

Aminoácidos	Vitaminas	Sales	Otros compuestos	Proteínas requeridas en los medios definidos libres de suero
Arginina	Biotina	NaCl	glucosa	Insulina
Cystina	Colina	KCl	Penicilina*	Transferían
Glutamina	Folato	NaH ₂ PO ₄	Streptomicina*	Factores de crecimiento específicos
Histidina	Nicotinamida	NaHCO ₃	Rojo fenol	
Isoleucina	panotenoato	CaCl ₂	suero	
Leucina	piridoxal	MgCl ₂		
Lisina	Tiamina			
Metionina	riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptofano				
Tirosina				
Valina				

*Penicilina y estreptomicina son antibióticos adicionados para suprimir el crecimiento de bacterias contaminantes. El rojo fenol es un colorante indicador de pH cuyo color es monitoreado para asegurar que el pH sea aproximadamente 7,4. Los cultivos crecen usualmente en contenedores de plástico o vidrio con una superficie apropiada para la adhesión celular. Los contenedores con el cultivo se mantienen en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% aire.

Cultivos celulares y una variedad de contenedores

Existen numerosos dispositivos diseñados para realizar cultivo de tejidos, dependiendo de las características de las células a cultivar, y de la dimensión de cultivo que se quiera alcanzar.

La mayoría de los cultivos de tejidos o células se llevan a cabo en pequeña escala, donde un número de células relativamente pequeño es necesario para realizar experimentos. En dicha escala, las células crecen frecuentemente en frascos de entre 25 a 175 cm², una medida que se refiere a la superficie de uno de los lados sobre el cuál las células se adhieren y crecen (ver figura 6: frascos T). En un recipiente típico de 175cm², el rendimiento es de aproximadamente 1x10⁷ células de una línea

adherente, y 1×10^8 células de líneas que crecen en suspensión (siempre dependiendo del tipo celular). En los frascos T estándares, no es posible producir cantidades mayores de células, dada la cantidad de tiempo insumida para los repetidos pasajes necesarios a medio fresco, la demanda de espacio en un incubador (que controla la composición de gases, la temperatura y la humedad del entorno) y el costo. Cuando se considera aumentar la escala del cultivo (escalado o *scaling-up*), se deben tener en cuenta numerosos parámetros, incluyendo problemas asociados a la depleción de nutrientes, el intercambio gaseoso (especialmente depleción de oxígeno), y la aparición de metabolitos tóxicos como el amonio y el ácido láctico.

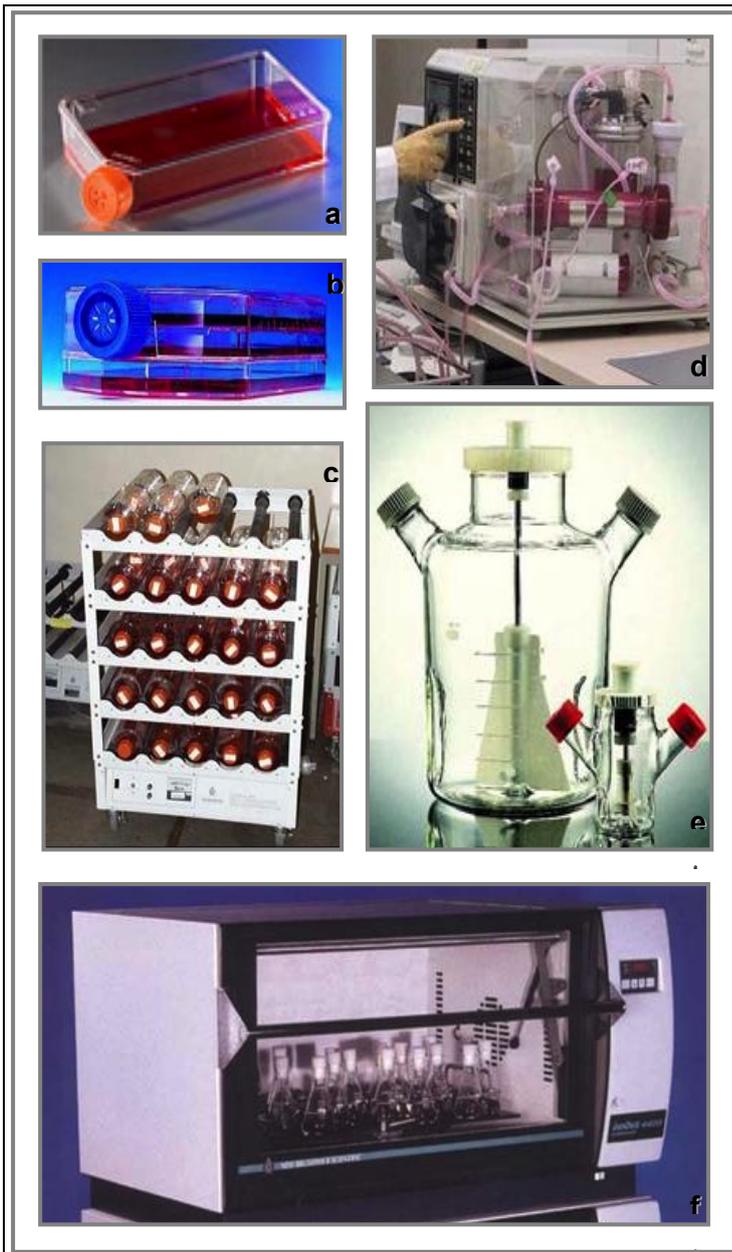


Figura 6. Distintos contenedores para cultivo de células. A) Frasco T; b) Frasco triple; c) botellas rodantes; d) biorreactor; e) frasco con paletas; f) frascos con agitación (erlenmeyer).
Fotos: www.sigma-aldrich.com

Existen muchos sistemas para escalar los cultivos celulares, que se muestran en la figura 6. Entre ellos, es posible encontrar desde arreglos de frascos triples y botellas cilíndricas, hasta biorreactores más complejos en su estructura. En todos los casos, es necesario asegurar el correcto intercambio gaseoso y la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, el arreglo de botellas de cultivo sobre rodillos que se muestra en la figura 6 (c), está diseñado de forma tal que las células cubran toda la superficie interna de la botella, con rodillos que al girar aseguran que el medio de cultivo bañe a todas las células, aportándole nutrientes y retirando desechos. Otro ejemplo es el biorreactor (d) que permite

obtener un rendimiento importante de anticuerpos a partir de un cultivo celular.



La adición de bolitas de distintos materiales inertes puede ayudar también a aumentar la densidad celular en cultivos al aumentar la superficie de cultivo entre 10 y 100 veces.

Tabla 4. Tipo de contenedores para cultivo de células y sus capacidades

Tecnología	Max Vol (ml)	Max células (suspensión)	Max células (adhesión)
Frasco T	150	1.5×10^8	$\sim 10^7$
Frasco triple	150	1.5×10^8	3×10^7
Factoría celular	8000	-----	1.5×10^{10}
Botellas rodantes	1000	1×10^9	1×10^8
Frascos para agitación (erlenmeyer)	1000	1×10^9	-----
Frascos con paletas	1000	1×10^9	-----

Como ya se mencionó, las finalidades de los cultivos de células son múltiples, desde la investigación básica hasta muchas aplicaciones biotecnológicas. Entre estas aplicaciones se pueden mencionar: la producción de compuestos de interés farmacológico y otros en células animales (anticuerpos, eritropoyetina, etc.), reparación de daño tisular mediante cultivo de células madre (en desarrollo), producción de compuestos de interés en células vegetales, transformación vegetal empleando como explanto un cultivo celular, etc.



CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

Este texto se adapta especialmente a estudios terciarios y universitarios y, aunque puede ser complejo para alumnos de primaria y secundaria, resulta una fuente interesante de información que se puede adaptar al aula en trabajos más simples destinados a comprender cómo trabajan los investigadores, cómo se realiza un cultivo de células y cómo es posible observar células.

Se sugiere introducir estas ideas a partir de conocimientos más cotidianos que tienen los alumnos. Por ejemplo, es posible que a muchos alumnos se les haya practicado en alguna oportunidad un exudado de fauces (mediante un hisopo que se introduce en la garganta) como consecuencia de una infección o dolor de garganta. Se puede utilizar este caso para explicar qué hace luego el médico con esa muestra, cómo se hace el cultivo de células en el laboratorio de análisis, la detección de bacterias y la realización de un antibiograma para determinar el antibiótico a recetar. Esta sería una aplicación práctica y más próxima a los alumnos que podría acercar el concepto de cultivo de células y su utilidad, más allá de su uso en la investigación básica. Para trabajar estas ideas se sugiere en las actividades una experiencia simple de cultivo de microorganismos.

A partir de esta idea, uno de los conceptos interesantes para trabajar en el aula se refiere al tamaño celular y la posibilidad de “observar” células. Las células que se cultivan en laboratorio tienen un tamaño microscópico y, por lo tanto, requieren de metodologías especiales para verlas (microscopios) o métodos de detección a partir de reactivos. Esto es interesante para la reflexión del docente y el trabajo en el aula ya que implica que los alumnos deban “creer” o “aceptar” la idea de que “eso” que se ve (un círculo blanco en una placa, un líquido turbio, o un líquido con color) es resultado de la presencia de células. Seguramente, para quien trabaja en investigación o tiene conocimientos más avanzados, “esos círculos que aparecen en el medio de cultivo son colonias de células”. Sin embargo, hay que tener presente que para los alumnos esto no resulta obvio; ellos no “ven” allí lo que el docente considera que se debe interpretar a partir de sus propios conocimientos. Lo que ellos ven frente a ellos son “círculos” posiblemente de diferentes colores. A partir de tener en cuenta esta idea, y trabajarla en clase a partir de las ideas previas de los alumnos acerca de “lo que ven”, y la “interpretación de lo que ven”, se podría introducir el concepto de colonias de células, métodos de detección, reactivos, y otras técnicas que se emplean para “ver” lo que no se puede ver a simple vista. Se pretende que los alumnos entiendan el concepto de *colonia de células*, como un agrupamiento de células de la misma “familia” que quedan unidas y que permiten visualizarlas en conjunto, aunque no se puede ver a simple vista una célula particular. Si se cuenta con microscopios se puede intentar hacer un preparado a partir de esas colonias y verlo al microscopio con la idea de detectar células individuales.

Actividades



Las actividades que se presentan a continuación pueden adaptarse a alumnos de niveles superiores y también a alumnos de primaria y secundaria, particularmente las actividades 2 y 3 que presentan experiencias que se pueden realizar en la escuela.

Actividad N°1. Interpretación de conceptos.

Esta actividad tiene por objetivo repasar conceptos trabajados en el texto del Cuaderno.

Responder Verdadero o Falso a las siguientes afirmaciones, y justificar las falsas:

- a) El primer paso para aislar células del mismo tipo a partir de un tejido (formado por células de diversos tipos) es separar la matriz extracelular que las une.
- b) Un medio de cultivo contiene pequeñas cantidades de una serie de moléculas necesarias para la supervivencia y multiplicación celular: sales, glucosa, aminoácidos y vitaminas, entre otras.
- c) Un cultivo de células primario es mantenido indefinidamente en el tiempo, solamente refrescando el medio de cultivo.
- d) Las líneas celulares se pueden establecer únicamente a partir de células tumorales.
- e) Las células de un cultivo celular, se comportan exactamente igual que las células del tejido original.
- f) Un hibridoma es el resultado de la fusión entre dos linfocitos B normales, y su producto es la secreción de varios anticuerpos diferentes.
- g) Cuando los experimentos se realizan sobre cultivos celulares, se dice que son experimentos “*in vitro*” (“en vidrio”).

Respuestas:

a) Verdadero.

b) Verdadero

c) Falso. El cultivo primario es aquel que se establece, luego o no del fraccionamiento, a partir de un tejido, sin etapas de multiplicación *in Vitro*, por lo que duran un tiempo finito.

d) Falso. Las líneas celulares también pueden establecerse a partir de células normales en las cuales se induce la pérdida de control del número de divisiones celulares posibles por mecanismos de mutagénesis, introducción de oncogenes, etc.

e) Falso. Las células en un cultivo celular no siempre se comportan de la misma manera que en el tejido del cual se extrajeron originalmente; pueden conservar características diferenciales pero al perder la comunicación con la matriz extracelular en la que estaban inmersas, así como el contacto con otros tipos celulares, muchas señales bioquímicas que sensaban se pierden, alterando entonces su comportamiento.

f) Falso. Un hibridoma es el resultado de la fusión entre una línea celular derivada de un tumor de linfocitos B con un linfocito B que secreta anticuerpos, obtenido de un ratón inmunizado con un antígeno particular. El hibridoma resultante luego de un proceso de selección exhaustivo, secreta solo un tipo de anticuerpo capaz de reconocer al antígeno de interés.

g) Verdadero.

Actividad 2. Cultivo de bacterias y el efecto de antibióticos

Las bacterias no pueden verse a simple vista. Sin embargo, es posible observar sus colonias, que son agrupaciones de bacterias de la misma especie, que se origina a



partir de la multiplicación de una bacteria original. Esta experiencia permitirá comprobar la presencia de bacterias a nuestro alrededor.

• **Materiales:**

- ü 6 placas de Petri u otros recipientes poco profundos con tapa;
- ü agar o gelatina sin sabor;
- ü leche o yogur,
- ü una varilla metálica o hisopos esterilizados;
- ü un trozo de papa u otro vegetal cocido que se debe dejar pudrir varios días en un recipiente con agua.
- ü Discos embebidos en diferentes antibióticos (aportado por la escuela).

• **Procedimiento:**

- ü preparar la gelatina con agua hirviendo como indica el envase (se le puede agregar caldo en polvo).
- ü Cuando está aún caliente volcar una capa delgada sobre cada recipiente y cerrarlo inmediatamente.
- ü Colocar los recipientes boca abajo (para evitar que las gotas condensadas caigan sobre el medio de cultivo) y dejar enfriar.
- ü Una vez fríos:
 - placa 1: dejarlo sin abrir
 - placa 2: dejarlo abierto durante toda la experiencia
 - placa 3: toser dentro y cerrar inmediatamente
 - placa 4: distribuir suavemente sobre el agar una pequeña gota de leche o yogur con un hisopo o la varilla metálica (esterilizada en alcohol o fuego). Cerrar inmediatamente.
 - placa 5: tomar una pequeña gota de agua en la que se dejó pudrir la papa y pasarla suavemente sobre el agar (como en el frasco 4). Cerrar inmediatamente.
 - placa 6: hacer lo mismo que en la placa 5.
- ü Dejar las placas a temperatura ambiente, durante 7 días.
- ü A los 4 días, abrir la placa 6, con mucho cuidado, y colocar sobre el agar seis discos embebidos en diferentes antibióticos (que proveerá el docente). **Nota. En caso de no poder realizar este paso de la experiencia se incluye a continuación un resultado de un antibiograma para que sea analizado en clase**
- ü Anotar diariamente los cambios que se observan.

Preguntas para el análisis de la experiencia:

1. ¿Cómo se percibe en la placa la presencia de bacterias?
2. ¿Cuál es el objetivo de la placa 1?
3. ¿De dónde provienen los microbios que crecen sobre la placa 2? ¿Y los que aparecen sobre la placa 3?
4. ¿Se notan diferencias entre las colonias provenientes de diferentes orígenes? ¿Cuáles son esas diferencias?

5. ¿Podrían ser patógenas las bacterias que crecen en la placa 4? ¿Por qué? ¿Cómo se puede determinar a partir de la placa con antibióticos cuál de los antibióticos examinados es el más efectivo?



Resultado de un antibiograma. Cada pastilla blanca es un antibiótico diferente.

Respuestas:

1. Se pueden ver colonias separadas, de diferentes tamaños y colores, o en caso de ser un único tipo de bacteria, se puede extender como una cubierta de pequeñas colonias del mismo color.
2. La placa 1 es un control o testigo que muestra que en un medio esterilizado (al hervir el agua) no crecen microorganismos; es decir que provienen de alguna fuente externa.
3. Los microorganismos en la placa 2 provienen del aire, del ambiente, y los de la placa 3 provienen de la respiración de la persona que también es consecuencia de la entrada al cuerpo de microorganismos del ambiente (a través de la respiración, de los alimentos, etc.).
4. Posiblemente noten diferencias entre las colonias, en su aspecto y color, dependiendo del origen.
5. Se supone que, si no hubo contaminación de otros microorganismos, las bacterias que son parte de los alimentos no son patógenas.
6. Se debe observar el círculo que se forma alrededor del disco de antibiótico. El antibiótico mata bacterias o impide que se multipliquen, por lo tanto donde haya un círculo claro alrededor del antibiótico significa que allí no hay bacterias, es decir que el antibiótico funcionó. Cuanto más grande sea ese círculo se supone que más efectivo fue el antibiótico en eliminar las bacterias a su alrededor.

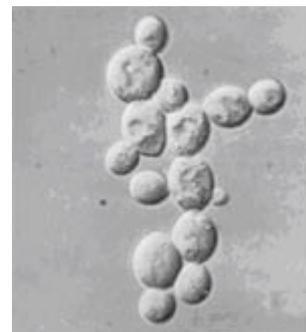
ACTIVIDAD 3. Observación de levaduras al microscopio

Las levaduras son seres vivos, unicelulares que se reproducen asexualmente mediante un proceso conocido como gemación que consiste en la formación de brotes o yemas que luego se desprenden de la célula original para formar un nuevo organismo independiente.

Es posible observar las levaduras al microscopio y, en algunos casos, detectar los brotes que están en proceso de formación.

Materiales:

- ü levaduras (bloques o sobres que se compran en comercios)
- ü agua tibia
- ü azúcar
- ü portaobjetos y cubreobjetos
- ü microscopio



Levaduras en división

Procedimiento:

1. Preparar una mezcla con una pizca de levaduras, una cucharada de agua tibia y una pizca de azúcar.
2. Dejar reposar 5-10 minutos.

El Cuaderno de Por Qué Biotecnología es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología de ArgenBio. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso.



3. Colocar sobre el portaobjetos y cubrir con el cubreobjetos.
4. Observar bajo el microscopio con un objetivo de fuerte aumento.
5. Dibujar lo que se observa.

Nota: en caso de no poder observar claramente se debe probar alternativas para mejorar el preparado, por ejemplo, variando la cantidad de levadura que se coloca en la muestra.

Preguntas para el análisis de la experiencia

1. ¿Qué se observa al microscopio?
2. ¿Por qué se coloca agua y azúcar al preparado? ¿Cuál es la función de estos componentes? *Rta. Son nutrientes que aportan materia y energía a los hongos y les permiten crecer y multiplicarse.*
3. Teniendo en cuenta que las levaduras son seres vivos, ¿por qué no se reproducen cuando se encuentran en la góndola del supermercado? (relacionar con la respuesta a la pregunta anterior) *Rta. Para reproducirse, los hongos como todo ser vivo, requiere de las condiciones adecuadas de nutrientes, temperatura, agua, oxígeno, etc. En la góndola del supermercado no tienen estas condiciones y, por lo tanto, detienen su reproducción.*

Actividad 4. Lectura y análisis de un artículo

Logran que células vegetales puedan vivir atrapadas en vidrio...

Publicado el : 03/11/2005 en Novedades de Argentina, sitio Por Qué Biotecnología

http://www.porquebiotecnologia.com.ar/doc/reportes/result_indiv.asp?Id=2677

...incluso se reproducen; la técnica podría tener aplicaciones farmacológicas. La unión de un compuesto biológico con un material inerte como el metal o la cerámica no es una novedad. De hecho, ciertos dispositivos para medir la glucemia en sangre se basan en este desarrollo. Lo que sí es novedoso es que las células puedan dividirse (reproducirse) en esa situación de inmovilidad que les confiere el material inorgánico. Pero un equipo de investigadores argentinos logró precisamente eso: que grupos de células vegetales, atrapadas dentro de un vidrio, pudieran no sólo reproducirse, sino también, lo que es más importante, fabricar proteínas. El propósito es obtener productos de interés farmacológico, como la insulina o distintos factores de crecimiento. "El problema fue lograr que las células pudieran vivir, multiplicarse y producir metabolitos de interés", señala la doctora Sara Aldabe Bilmes, profesora en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA e investigadora del Conicet. La clave está en las características del material, cuya porosidad debe permitir que las células reciban los nutrientes necesarios para vivir y que, a su vez, puedan salir los compuestos generados por ellas. "La importancia de que las células puedan vivir y multiplicarse reside en que algunos productos de interés biotecnológico sólo se generan a partir de células en pleno crecimiento", subraya. Pero ¿cuál es el objetivo de enjaular células en una matriz cerámica? Una ventaja es que este método impide la contaminación con virus o bacterias, lo cual -según la investigadora- no es poca cosa cuando se trata de células vegetales, de metabolismo lento, que tardan meses en crecer y ser productivas, lo que implica esfuerzo y dinero. También permite una rápida y fácil separación de las células del medio de cultivo (no es necesario filtrarlas, por ejemplo). "Trabajamos con bacterias, levaduras, algas unicelulares y células vegetales, por ejemplo de zanahoria y tabaco. En todos los casos vemos que las células se dividen y crecen y les llegan los nutrientes y el oxígeno", explica Mercedes Perullini, primera autora del trabajo que acaba de publicarse en la American Chemical Society. Por su parte, Aldabe Bilmes destaca que "lo importante en este trabajo es la confluencia de especialidades, algo poco frecuente en la ciencia argentina: un grupo de biotecnología, que sabe manejar células vegetales (dirigido por el doctor Alejandro Mentaberry, profesor en la Fceyn e investigador del Conicet), y un grupo de química inorgánica, con experiencia en síntesis". Este último, dirigido por Aldabe Bilmes, está conformado por Mercedes Perullini y el doctor Matías Jobbagy. En la actualidad, la biotecnología

El Cuaderno de Por Qué Biotecnología es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología de ArgenBio. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso.



ofrece distintas alternativas a la hora de obtener compuestos de interés farmacológico. Una de ellas es hacer "trabajar" a las bacterias en tambores de fermentación para que realicen su actividad metabólica. Por lo general se les coloca un gen foráneo, en muchos casos humano, para que fabriquen una proteína en particular. Otra posibilidad es que la usina de producción sea un mamífero, por ejemplo la cabra o la vaca, al que se inserta el gen apropiado para que produzca la proteína y ésta pueda extraerse a partir de su leche. Sin embargo, las tendencias más novedosas se inclinan por las células vegetales como fábrica potencial de diferentes compuestos. Para atrapar las células, los investigadores fabrican en el laboratorio un tipo de vidrio, pero no el que se emplea para fabricar botellas. Se trata de un material cerámico transparente que se sintetiza a temperatura ambiente a partir de pequeñas partículas de dióxido de silicio (arena) junto con ciertos agentes orgánicos que permiten la formación de polímeros; es decir, moléculas de gran tamaño. Es como una gelatina, pero se endurece sin necesidad de heladera. El material debe tener poros del tamaño justo para permitir que lleguen los nutrientes y se difundan los metabolitos al medio de cultivo. Pero esos poros no deben permitir la entrada de bacterias u otro tipo de contaminantes. Las células son inmovilizadas primero en una matriz orgánica y luego alrededor de ella se sintetiza el vidrio. "Hay que trabajar muy rápido, porque la síntesis tarda unos pocos minutos", comenta Perullini. Luego, esa matriz, que tiene dos centímetros de diámetro por un centímetro de espesor, se introduce en el medio de cultivo. La bióloga Mercedes Rivero, investigadora del Laboratorio de Agrobiotecnología de la Fceyn, precisa: "Lo interesante es que las matrices permiten conformar módulos que se pueden apilar, y si alguna unidad tiene un problema o se contamina puede descartarse sin afectar el resto de las unidades. Y pueden agregarse nuevos módulos con células nuevas o más activas". Incluso se podrían combinar módulos con distintas cepas que produjeran distintos metabolitos. El hecho de que las células sean capaces de multiplicarse en el interior de la matriz es fundamental para que puedan producir los compuestos de interés, porque las células vegetales sólo cuando están en comunidad pueden producir metabolitos secundarios, aquellos con acción antibacteriana, o factores de crecimiento, por ejemplo. Si bien resta todavía mucho trabajo para producir compuestos farmacológicos en estas matrices cerámicas, el hecho de haber logrado que las células vivan y crezcan en su cárcel de vidrio representa un paso importante, sobre todo si se considera que las células vegetales son muy sensibles."

Responder las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es el hecho de relevancia en el artículo?
- ¿Qué ventajas tiene el desarrollo desde un punto de vista productivo?
- ¿Con qué células vegetales ensayaron la inmovilización?
- ¿Qué tipo de cultivos (cultivos primarios o líneas celulares) convendría utilizar para la inmovilización? ¿Por qué?

Respuestas

- la importancia del descubrimiento radica en que, una vez inmovilizadas células vegetales en una matriz inorgánica, las mismas puedan vivir, dividirse y producir metabolitos que se liberan al medio de cultivo.
- Las ventajas son que las células están inmersas en una matriz cuyos poros son del tamaño exacto para dejar salir los productos celulares de interés productivo, pero no lo suficientemente grandes para dejar entrar patógenos que puedan contaminarlas. Esto es particularmente importante en células vegetales que son muy sensibles. Otra ventaja es que los módulos se pueden apilar, y si alguna unidad tiene un problema o se contamina puede descartarse sin afectar el resto de las unidades. Y pueden agregarse nuevos módulos con células nuevas o más activas. Además, al estar inmovilizadas, los cambios del medio de cultivo se pueden realizar con mayor facilidad
- Se ensayó con células de zanahoria y tabaco.
- Si se utilizan cultivos primarios, la inmovilización debe ser más frecuente, teniendo que preparar células frescas reiteradamente, convirtiendo al procedimiento en poco practicable industrialmente. La opción más adecuada sería emplear líneas celulares (de tabaco, por ejemplo) que tienen una vida en cultivo más larga. Pero, la elección dependerá de varios factores, entre ellos, de la disponibilidad de líneas celulares del cultivo de interés, de la capacidad de las matrices, y de la capacidad de las líneas celulares de producir el compuesto de interés de igual forma que el cultivo primario (aunque si se trata de un transgén que dirige la síntesis de una proteína de interés, entonces la elección podría ser más sencilla).

El Cuaderno de Por Qué Biotecnología es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología de ArgenBio. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso.



Material de consulta

- Nuevo manual de la UNESCO para la enseñanza de las ciencias. Editorial Sudamericana. 1973.
- <http://www.ub.es/biodel/wbc/tecnicas/cap1.htm> Introducción al cultivo celular. Universidad de Barcelona, España.
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, y Peter Walter. "Molecular Biology of the Cell", Editorial Garland, 4ta. Edición (2002). En inglés, pero existen versiones en español. Disponible (inglés) en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mboc4>
- Portal de la empresa de insumos para cultivo de tejidos Corning: "Celebrando un siglo del cultivo de tejidos". Artículo en idioma inglés, disponible en <http://www.corning.com/Lifesciences/cells100/>
- "Técnicas fundamentales en el cultivo celular. Un manual de laboratorio". Artículo en inglés de la empresa Sigma-Aldrich, disponible en http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Culture/Key_Resources/ECACC_Handbook/Cell_Culture_Techniques_5.html