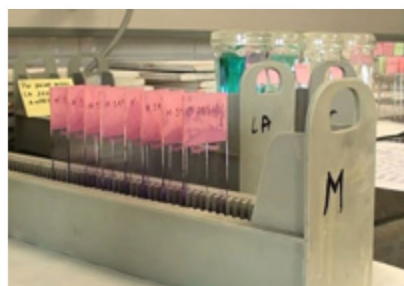


Técnicas de análisis cromosómico. Citogenética convencional.

Técnicas de análisis cromosómico. Citogenética convencional.

Caso práctico



Marta está contenta con los alumnos que este año han venido a realizar la FCT al Servicio de Genética, parecen muy responsables e interesados en el tema.

Tras una semana de adaptación a las costumbres del servicio, empezarán a trabajar en la sección de citogenética. Las tareas a realizar en esta sección son bastante entretenidas ya que muchas de las técnicas son manuales. El cultivo y sacrificio cromosómico será una oportunidad buena para verles desenvolverse en el laboratorio.

Marta les plantea la posibilidad de realizar un cariotipo desde el comienzo, empezando por establecer el cultivo hasta dar el resultado final tras haber analizado el patrón de bandas de cada cromosoma.

—El cariotipo que estudiéis puede ser el vuestro, de esta manera os implicaréis más en el procedimiento. Además las muestras de sangre periférica son las mejores para iniciarse en los estudios citogenéticos, las metafases son de una calidad muy buena, por

lo que luego os será más fácil analizarlas—dice Marta.

A Carlos todo lo relacionado con la sangre y las agujas no le hace mucha gracia, así que prefiere estudiar uno de los casos que lleguen al laboratorio pero a Susana le parece una idea buenísima. Marta ayuda a Susana a hacer los trámites para que le sea realizada la extracción de una muestra de sangre para estudio citogenético.

En esta Unidad acompañaremos a Carlos y a Susana a lo largo de todos los procedimientos que deberán realizar a su muestra de sangre hasta conseguir el cariotipo. Aprenderemos a cultivar células en el laboratorio y a mantenerlas durante un tiempo. Prepararemos extensiones cromosómicas de las células cultivadas y las estudiaremos al microscopio para detectar posibles anomalías en sus cromosomas. También conoceremos cuales son las alteraciones cromosómicas más frecuentes de un cariotipo y las aplicaciones de los estudios citogenéticos tanto en el diagnóstico prenatal como en el diagnóstico y pronóstico de ciertos tipos de cáncer.

Los contenidos de esta unidad te servirán de base para poder entender otras modalidades de análisis citogenético en médula ósea, tumores, etc. que puedes tener la posibilidad de realizar en el futuro.



Materiales formativos de FP Online propiedad del Ministerio de Educación y Formación Profesional.

[Aviso Legal](#)

1.- Introducción a los estudios citogenéticos.

Uno de los principales objetivos del laboratorio de Citogenética humana, es el diagnóstico de enfermedades con base genética. Con este fin, el laboratorio de Citogenética se sirve, entre otros, del análisis cromosómico de preparaciones de metafases para obtener su cariotipo, que consiste en el análisis visual del juego completo de cromosomas obtenidos en metafase tras la realización de un cultivo celular. Habitualmente, el [cariotipo constitucional](#) estándar de un individuo se obtiene a partir de cultivos celulares de células de sangre periférica, pero también hay otros tipos de muestra que se pueden utilizar.

Antes de iniciarnos en las técnicas citogenéticas, es necesario conocer:

- los tipos de muestras de las que partimos para hacer los estudios,
- la estructura de los cromosomas y su evolución durante el ciclo celular,
- y los métodos de cultivo celular utilizados para la obtención de los cromosomas.



1.1. Tipos de muestras

¿Qué tipos de muestras recibe un laboratorio donde se realizan estudios citogenéticos?

Los tipos mas frecuentes de muestras que llegan al laboratorio son los siguientes:

- Sangre periférica.
- Médula ósea.
- Muestras de líquidos biológicos (líquido amniótico).
- Vellosidad corial.
- Biopsias de tumores sólidos.

Tipos de muestras estudiadas en un laboratorio de citogenética



[Jeringa utilizada para la extracción](#) [Obtención de vellosidades coriales mediante](#)
[de médula ósea](#) [amniocentesis.](#)

- La sangre periférica es la muestra más asequible para realizar un estudio citogenético. Se obtiene fácilmente y se utiliza para realizar estudios cromosómicos en niños y adultos en los que se sospecha que hay una alteración cromosómica. También se utiliza en estudios de infertilidad o abortos repetidos.
- Las muestras de médula ósea se obtienen por [métodos invasivos](#) y se utilizan para diagnóstico y pronóstico de enfermedades hematológicas como leucemias, síndromes mielodisplásicos y linfomas.
- Muestras de líquidos biológicos entre los que destaca el líquido amniótico: Obtenido a partir de las semana 14 de gestación. El líquido amniótico contiene células del feto que

pueden utilizarse para estudios citogenéticos, bioquímicos o para análisis molecular, propios del diagnóstico prenatal.

- Vellosidades coriales: Tejido que procede del área vellosa del [corion](#) que es aspirado de manera [transcervical](#) o [transabdominal](#). Se utiliza para descartar alteraciones en el feto mediante estudios citogenéticos y moleculares. El porcentaje de éxito en estudios citogenéticos es menor que el obtenido en líquido amniótico.
- Muestras de tumores sólidos (cáncer de mama, cáncer de pulmón...) donde se investiga la presencia de alteraciones cromosómicas. Estas muestras, obtenidas mediante biopsia, son tratadas en el laboratorio para poder cultivar sus células y analizar el contenido cromosómico de las mismas. Las técnicas de citogenética convencional están incluidas en la rutina del diagnóstico genético del cáncer, junto a las técnicas de [FISH](#) (citogenética molecular) y el análisis molecular del ADN mediante [PCR](#) y secuenciación.

Al laboratorio pueden llegar asimismo productos de concepción y abortos espontáneos para estudio de alteraciones cromosómicas en ellos.

1.2.- Ciclo celular

Antes de iniciarnos con las técnicas citogenéticas, es necesario estudiar la evolución de los cromosomas durante el ciclo celular.

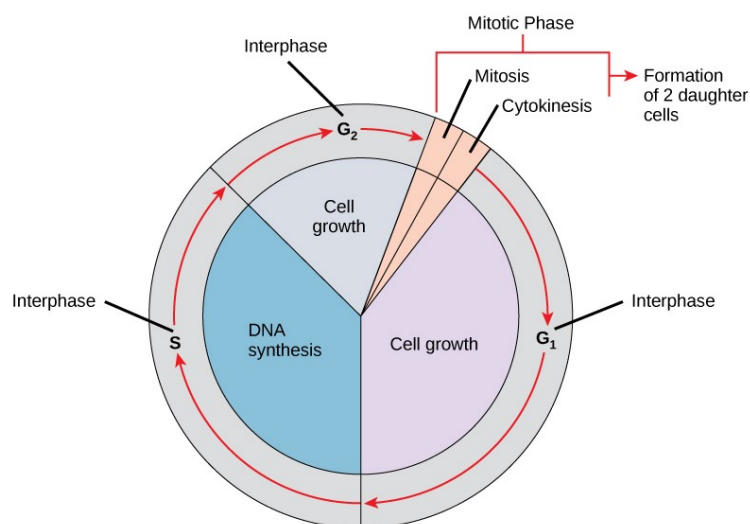
El ciclo celular puede considerarse como el ciclo de vida de una célula. En otras palabras, es la serie de pasos de crecimiento y desarrollo que experimenta una célula entre su "nacimiento", la formación por división de una célula madre, y su división para formar dos nuevas células hijas.

Etapas del ciclo celular.

Para dividirse, una célula debe completar varias tareas importantes: debe crecer, copiar su material genético (ADN) y dividirse físicamente en dos células hijas. Las células realizan estas tareas en una serie de pasos organizados y predecibles que conforman el ciclo celular. El ciclo celular es un ciclo, en lugar de una ruta lineal, porque al final de cada ronda, las dos células hijas pueden comenzar exactamente el mismo proceso desde el principio.

En las células eucariotas, o células con núcleo, las etapas del ciclo celular se dividen en dos fases principales:

- Interfase
- Fase mitótica (M).



Durante la interfase, la célula crece y hace una copia de su ADN.

Durante la fase mitótica, la célula separa su ADN en dos conjuntos y divide su citoplasma, formando dos nuevas células.

La interfase se compone de la fase G1 (crecimiento celular), seguida de la fase S (síntesis de ADN), seguida de la fase G2 (crecimiento celular). Al final de la interfase llega la fase mitótica, que se compone de mitosis y citocinesis y conduce a la formación de dos células hijas. La mitosis precede a la citocinesis, aunque los dos procesos generalmente se superponen.

Interfase

Ingresemos al ciclo celular tal como se forma una célula, por división de su célula madre. ¿Qué debe hacer esta célula recién nacida después si quiere continuar y dividirse?

La preparación para la división ocurre en tres pasos:

- Periodo G1: La célula crece físicamente, copia orgánulos y crea los bloques de construcción moleculares que necesitará en pasos posteriores.
- Periodo S: En la fase S, la célula sintetiza una copia completa del ADN en su núcleo. También duplica una estructura organizadora de microtúbulos llamada centrosoma. Los centrosomas ayudan a separar el ADN durante mitosis.
- Periodo G2: la célula crece más, produce proteínas y orgánulos, y comienza a reorganizar su contenido en preparación para la mitosis. Esta fase finaliza cuando comienza la mitosis.

Fase M o fase mitótica

Durante la fase mitótica (M), la célula separa su ADN y citoplasma para formar dos células nuevas. La fase M involucra dos procesos distintos relacionados con la división: mitosis y citocinesis.

En la mitosis, el ADN nuclear de la célula se condensa en cromosomas visibles y es separado por el huso mitótico, una estructura especializada hecha de microtúbulos.

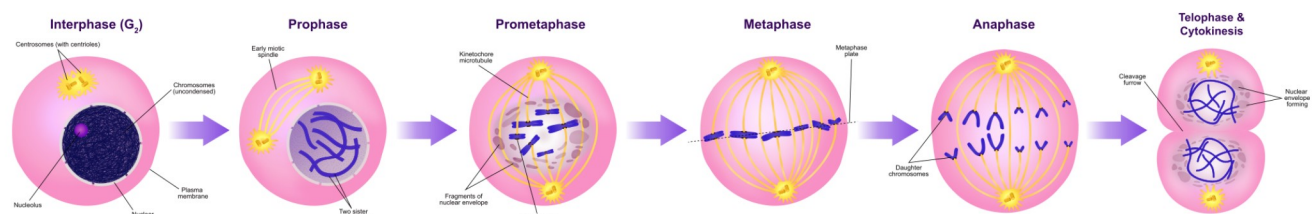
La mitosis tiene lugar en cuatro etapas:

- profase,
- metafase,
- anafase y
- telofase.

La mitosis consta de cuatro fases básicas: profase, metafase, anafase y telofase. Algunos libros de texto enumeran cinco, dividiendo la profase en una fase temprana (llamada profase) y una fase tardía (llamada prometafase). Estas fases ocurren en estricto orden secuencial, y la citocinesis, el proceso de dividir el contenido celular para formar dos células nuevas, comienza en anafase o telofase. La citocinesis generalmente se superpone con anafase y / o telofase.

Lo más importante es entender lo que sucede en cada etapa y por qué es importante para la división de los cromosomas.

Comencemos mirando una célula justo antes de que comience la mitosis. En el periodo G₂ de la interfase, la célula ya ha copiado su ADN, por lo que los cromosomas en el núcleo consisten en dos copias conectadas, llamadas [cromátidas](#) hermanas. No se pueden ver los cromosomas muy claramente en este punto, porque todavía están en su forma larga, fibrosa y descondensada. La célula animal también ha hecho una copia de su [centrosoma](#), un orgánulo que desempeñará un papel clave en la orquestación de la mitosis, por lo que hay dos centrosomas. Las células vegetales generalmente no tienen centrosomas con [centriolos](#), pero tienen un tipo diferente de centro organizador de microtúbulos que juega un papel similar.



Profase

Profase temprana. La célula comienza a descomponer algunas estructuras y construir otras, preparando el escenario para la división de los cromosomas

- Los cromosomas comienzan a condensarse (haciéndolos más fáciles de separar más adelante).
- El huso mitótico comienza a formarse. El huso es una estructura hecha de microtúbulos, fibras fuertes que forman parte del "esqueleto" de la célula. Su trabajo es organizar los cromosomas y moverlos durante la mitosis. El huso crece entre los centrosomas a medida que se separan.
- El [nucleolo](#) (o nucleoli, plural), una parte del núcleo donde se forman los [ribosomas](#), desaparece. Esta es una señal de que el núcleo se está preparando para

descomponerse.

Profase tardía. En la profase tardía (a veces también llamada prometáfase), el huso mitótico comienza a capturar y organizar los cromosomas.

- La envoltura nuclear se descompone y libera los cromosomas.
- Los cromosomas están completamente condensados.
- El huso mitótico crece más y algunos de los microtúbulos comienzan a "capturar" los cromosomas. Los microtúbulos pueden unirse a los cromosomas en el cinetocoro (un parche de proteína que se encuentra en el centrómero de cada cromátida hermana). Los centrómeros son las regiones de ADN donde las cromátidas hermanas están más estrechamente conectadas. Los microtúbulos que se unen a un cromosoma se denominan microtúbulos de cinetocoro. Los microtúbulos que no se unen a los cinetocoros pueden aferrarse a los microtúbulos desde el polo opuesto, estabilizando el huso. Más microtúbulos se extienden desde cada centrosoma hacia el borde de la célula, formando una estructura llamada aster.

Metafase

Los cromosomas se alinean en la placa metafásica o placa ecuatorial (no es una estructura física, solo un término para el plano donde se alinean los cromosomas). Las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma son capturadas por microtúbulos.

En esta etapa, los dos cinetocoros de cada cromosoma deben estar unidos a los microtúbulos de los polos opuestos del huso.

Antes de proceder a la anafase, la célula verificará para asegurarse de que todos los cromosomas estén en la placa de metafase con sus cinetocoros correctamente unidos a los microtúbulos. Esto se llama el punto de control del huso y ayuda a garantizar que las cromátidas hermanas se dividan de manera uniforme entre las dos células hijas cuando se separan en el siguiente paso. Si un cromosoma no está correctamente alineado o unido, la célula detendrá la división hasta que se solucione el problema.

Anafase

Las cromátidas hermanas se separan unas de otras y son empujadas hacia los polos opuestos de la célula. Los microtúbulos que no están unidos a los cromosomas separan los dos polos del huso, mientras que los microtúbulos del cinetocoro tiran de los cromosomas hacia los

polos.

En anafase, las cromátidas hermanas se separan unas de otras y son arrastradas hacia los extremos opuestos de la célula.

La proteína "pegamento" que mantiene unidas las cromátidas hermanas se descompone, lo que les permite separarse. Cada cromátida hermana constituye ahora un cromosoma.

Todos estos procesos son impulsados por proteínas motoras, máquinas moleculares que pueden "caminar" a lo largo de pistas de microtúbulos y transportar una carga. En la mitosis, las proteínas motoras transportan cromosomas u otros microtúbulos mientras caminan.

Telofase

El huso desaparece, se vuelve a formar una membrana nuclear alrededor de cada conjunto de cromosomas y reaparece un nucleolo en cada nuevo núcleo. Los cromosomas también comienzan a descondensarse.

En la telofase, la célula está a punto de dividirse y comienza a restablecer sus estructuras normales a medida que se produce la citocinesis (división del contenido celular).

- El huso mitótico se descompone en sus bloques de construcción.
- Se forman dos nuevos núcleos, uno para cada conjunto de cromosomas. Reaparecen las membranas nucleares y los nucléolos.
- Los cromosomas comienzan a descondensarse y volver a su forma "fibrosa".

Citocinesis en células animales y vegetales.

La citocinesis, la división del citoplasma para formar dos nuevas células, se superpone con las etapas finales de la mitosis. Puede comenzar en anafase o telofase, dependiendo de la célula, y termina poco después de la telofase.

En la citocinesis, el citoplasma de la célula se divide en dos, formando dos células nuevas. La citocinesis generalmente comienza justo cuando termina la mitosis, con una pequeña superposición. Es importante destacar que la citocinesis tiene lugar de manera diferente en las células animales y vegetales.

Citocinesis en una célula animal: En las células animales, la citocinesis es contráctil, dividiendo

la célula en dos como un monedero con un cordón. El "cordón" es una banda de filamentos hecha de una proteína llamada actina, y el pliegue se conoce como el surco de escisión

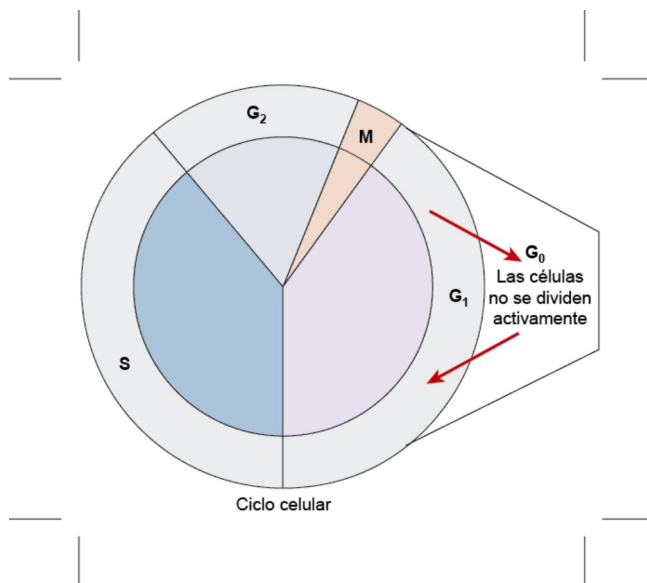
Citocinesis en una célula vegetal: Las células vegetales no se pueden dividir así porque tienen una pared celular y son demasiado rígidas. En cambio, una estructura llamada placa celular se forma en el medio de la célula, dividiéndola en dos células hijas separadas por una nueva pared.

Cuando termina la citocinesis, terminamos con dos células nuevas, cada una con un conjunto completo de cromosomas idénticos a los de la célula madre. Las células hijas ahora pueden comenzar sus propias "vidas" celulares y, dependiendo de lo que decidan ser cuando crezcan, pueden sufrir mitosis, repitiendo el ciclo.

Cuando se completa la división, produce dos células hijas. Cada célula hija tiene un conjunto completo de cromosomas, idéntico al de su hermana (y al de la célula madre). Las células hijas ingresan al ciclo celular en G1.

¿Qué les sucede a las dos células hijas producidas en una ronda del ciclo celular? Esto depende de qué tipo de células sean. Algunos tipos de células se dividen rápidamente, y en estos casos, las células hijas pueden sufrir inmediatamente otra ronda de división celular. Por ejemplo, muchos tipos de células en un embrión temprano se dividen rápidamente, al igual que las células en un tumor.

Otros tipos de células se dividen lentamente o no se dividen en absoluto. Estas células pueden salir del periodo G1 y entrar en un estado de reposo llamado periodo G0. En este periodo la célula no se está preparando activamente para dividirse, solo está haciendo su trabajo. Por ejemplo, podría conducir señales como una neurona o almacenar carbohidratos como una célula hepática. Este estado, es un estado permanente para algunas células, mientras que otras pueden reiniciar la división si obtienen las señales correctas.



¿Cuánto dura el ciclo celular?

Las diferentes células tardan diferentes tiempos para completar el ciclo celular. Una célula humana típica puede tardar unas 24 horas en dividirse, pero las células de mamífero de ciclo rápido, como las que recubren el intestino, pueden completar un ciclo cada 9-10 horas cuando crecen en cultivo. En general la mitosis es un proceso relativamente rápido en casi todas las células, de manera que la duración del ciclo celular depende fundamentalmente de la interfase. Células con una tasa de [replicación](#) elevada, tendrán una interfase más corta que las células con tasa de replicación más baja.

1.3.- Los cromosomas

¿Qué estructura tiene un cromosoma metafásico?

Bajo el microscopio los cromosomas se ven como estructuras delgadas y alargadas, formadas por dos fibras longitudinales, que reciben el nombre de cromátidas. Estas cromátidas se unen en un punto denominado centrómero. Cada cromátida es una doble hebra de ADN.

Debes conocer

En la siguiente animación puedes identificar las diferentes partes de un cromosoma.



[Resumen textual alternativo](#)

El centrómero, también llamado constricción primaria juega un papel muy importante en la división celular, es el punto por el que el cromosoma se une a los filamentos del huso acromático durante la mitosis. El centrómero divide a las cromátidas en dos secciones o partes, denominadas brazos. Podemos diferenciar en los cromosomas un brazo corto, denominado con la letra p (de petit), y un brazo largo, denominado con la letra q. Así por ejemplo si hablamos del 5q estaremos refiriéndonos al brazo largo del cromosoma 5.

Al observar las imágenes de las preparaciones al microscopio óptico te habrás fijado que los cromosomas no son todos iguales. En un cariotipo humano se pueden diferenciar tres formas básicas de cromosomas, teniendo en cuenta las longitudes de sus brazos y la posición del centrómero.

- Cromosomas metacéntricos: Son aquellos que tienen los brazos p y q

aproximadamente de la misma longitud, el centrómero en estos cromosomas estará situado por tanto en el punto medio.

- Cromosomas submetacéntricos: Tienen los brazos corto y largo de diferente longitud, con el centrómero está localizado más próximo a uno de los extremos.
- Cromosomas acrocéntricos: Aquellos que tienen el centrómero muy cerca de uno de los extremos, con un brazo corto muy pequeño. Estos cromosomas tienen con frecuencia pequeñas masas de [cromatina](#), llamadas satélites, unidas a los extremos de sus brazos cortos por unos pequeños segmentos o tallos, reciben el nombre de constricciones secundarias.

2.- Métodos de cultivo celular.

Caso práctico

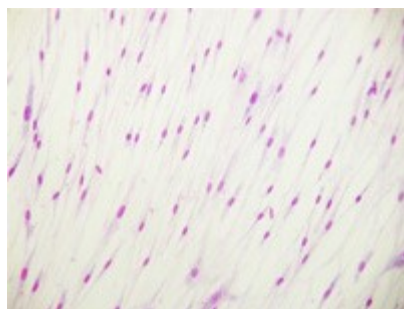


Susana está realmente entusiasmada con la tarea que se le ha encargado, la realización de su propio cariotipo y ayuda a Marta a preparar los materiales y medios de cultivo necesarios para realizar, cuanto antes, el cultivo celular de las muestras que han llegado al laboratorio.

Los tipos de medios que se utilizan en los estudios citogenéticos son diferentes para cada muestra, lo mismo ocurre con los recipientes y los tiempos de cultivo.

La temperatura de cultivo es la misma para todos, 37 °C. Es muy importante que las células no experimenten un gran cambio a su alrededor cuando se las ponga en contacto con el medio de cultivo, que se guarda en refrigeración. Susana coloca los medios en el baño termostatzado y mientras alcanzan la temperatura requerida trata de recordar con Carlos las bases del cultivo celular.

En esta imagen puedes observar el aspecto que tiene un cultivo de células realizado, en este caso, sobre un portaobjetos y posteriormente teñido con [Giemsa](#). Este colorante tiñe el núcleo celular que es la parte de las células que aparece intensamente teñida en la imagen.



El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX. Surgió como un método para el estudio del comportamiento de las células animales que, de este modo, se encontraban libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo. El concepto de mantener líneas de células vivas separadas del tejido de origen surge cuando el fisiólogo inglés Sydney Ringer desarrolló una solución salina (solución de Ringer) que contenía cloruro de sodio, potasio, calcio y magnesio. Esta solución era capaz de mantener latiendo el corazón de un animal fuera del cuerpo.

En 1866, Reclinhhausen, consiguió mantener vivas, por un corto periodo de tiempo, células sanguíneas de anfibio. El desarrollo del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Roux 1885 en cultivos de células de embrión de pollo. Una serie de innovaciones como el desarrollo de medios de cultivo Eagle, 1955, el uso de antibióticos, las técnicas de tripsinización en 1952 y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de células de origen vertebrado.

El cultivo celular es una parte muy importante del trabajo en un laboratorio de diagnóstico citogenético. Es necesario para obtener las metafases que se necesitan para el estudio de las alteraciones cromosómicas. Se puede definir como el conjunto de procedimientos que hacen posible el mantenimiento de las células de organismos pluricelulares *in vitro*, en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas, preservando sus características bioquímicas, genéticas y fisiológicas al máximo para asegurar su supervivencia y multiplicación, manteniendo todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el huésped.

El cultivo celular es el proceso por el cual tanto [células procariotas](#) como eucariotas pueden cultivarse en condiciones controladas. En la práctica el término cultivo celular ha venido a referirse al cultivo de células aisladas de eucariotas (pluricelulares), especialmente células animales.

¿En qué consiste un cultivo celular?

El objetivo del cultivo es proporcionar a las células, en un ambiente artificial (*in vitro*), unas condiciones óptimas para que se dividan. Estas condiciones incluyen además de nutrientes unos valores de [pH](#), temperatura, [presión osmótica](#) y concentración de gases adecuados.

Aunque potencialmente se puede obtener un cultivo de cualquier tipo de tejido, normalmente los que mejor funcionan son los cultivos de células embrionarias, células que todavía conservan la capacidad de división, como las células del [trofoblasto](#) o las de la médula ósea.

Los cultivos de células tumorales también funcionan bien ya que sus células tienen la capacidad de dividirse indefinidamente. Sin embargo si queremos obtener metafases de otros tejidos, como sangre o tejidos como la piel, deberemos inducir su división artificialmente, bien utilizando mitógenos o mediante factores de crecimiento que ayuden a las células a dividirse.

Podemos definir a los mitógenos como todas aquellas sustancias añadidas al cultivo que inducen la proliferación de sus células *in vitro*.

Existen varias sustancias que realizan esta función, como el extracto de levadura, o mitógenos vegetales como la [concanavalina A](#) y la [fitohemaglutinina](#). Estas sustancias pueden actuar selectivamente sobre un tipo específico de células. Así por ejemplo la fitohemaglutinina activa únicamente la proliferación de los linfocitos T mientras que la concanavalina A activa tanto a los linfocitos B como T.

Es importante resaltar, que tal y como se recoge en el RD 664 / 1997 de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, en su artículo 2, se define el cultivo celular como el resultado del crecimiento *in vitro* de células obtenidas de organismos multicelulares, considerándolo como un agente biológico. Y establece las disposiciones mínimas aplicables a las actividades en las que los trabajadores estén o puedan estar expuestos a agentes biológicos debido a la naturaleza de su actividad laboral.

¿Sabes cuáles son las diferencias fundamentales entre células *in vivo* e *in vitro*?

Con respecto a las condiciones *in vivo*, en un cultivo *in vitro* existe:

- Pérdida de la geometría tridimensional
- Pérdida de interacciones celulares específicas
- Pérdida de la regulación homeostática por el Sistema Nervioso y Endocrino

- Metabolismo energético se basa en la glicólisis

Podemos decir que las ventajas principales del método *in vitro* son:

- Control del medio y las condiciones de cultivo
- Caracterización y homogeneidad de las muestras
- Es más económico
- Motivaciones éticas respecto al uso de animales.

Por el contrario son desventajas a tener en cuenta:

- Necesidad de esterilidad estricta
- Cantidad y costo
- Inestabilidad de las células en cultivo con el paso del tiempo
- Los modelo *in vitro* deben ser validados por estudios *in vivo*

2.1.- Tipos de cultivo celular.

¿Cuántas formas de cultivo celular existen?

Existen tres tipos principales de cultivos:

- Cultivo de órganos
- Cultivo de explantes
- Cultivo de células

Cultivo de órganos.

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

Cultivo de explantes.

Constituidos por fragmentos pequeños de tejidos que se adhieren a una superficie en la que generalmente crecen las células más periféricas del explante. Se podrán cultivar fragmentos de diferentes tejidos, como por ejemplo vellosidades coriónicas, tejidos epiteliales, conjuntivos, biopsias, etc.

Cultivo de células.

Este tipo de cultivo está formado por células dispersas que crecen en suspensión o adheridas a una superficie. Generalmente son cultivos que contienen un único tipo de célula y estas

suelen ser homogéneas genéticamente. Es el tipo de cultivo más utilizado en la actualidad debido a su capacidad de propagación, es decir, de crecimiento mantenido. Según la procedencia de las células, los cultivos celulares pueden ser primarios o secundarios.

Un cultivo se denomina cultivo primario cuando las células o tejidos procedentes de un ser vivo crecen sin haber pasado previamente por una fase de crecimiento *in vitro*. Un cultivo se denomina cultivo secundario cuando procede de una fase previa de crecimiento *in vitro*.

Cultivos de células primarios: Son cultivos preparados directamente a partir de un órgano o tejido. Las células de la sangre, líquido amniótico, médula ósea y tejidos se colocan directamente en los recipientes en contacto con el medio de cultivo idóneo. El cultivo de las muestras de sangre y médula ósea se realiza en suspensión, las células crecen libres en el medio, sin adherirse a un sustrato. Los recipientes utilizados en estos cultivos son tubos, como el que se observa en la imagen. Algunos de ellos tienen la base plana para facilitar el que todas las células estén en contacto con el medio al mismo tiempo.



El cultivo de las muestras de líquido amniótico y biopsias, se realiza en monocapa. En esta modalidad, las células se cultivan en unos recipientes especiales, placas o frascos de material plástico como los de la imagen, que han sido tratados específicamente para facilitar la adhesión de las células a su superficie. Las células se pegan a las paredes del recipiente y forman una capa o sábana que recubre la parte inferior del recipiente bañada por el medio de cultivo.



En el caso de las biopsias de tejidos la muestra puede cultivarse directamente, cortando el tejido en pequeños fragmentos (explantes) y colocando después cada uno de ellos en el recipiente de cultivo, o puede tratarse primero con [enzimas proteolíticas](#) del tipo [colagenasa](#) o [tripsina](#) que separan las células del tejido disolviendo la sustancia que las mantiene unidas antes de introducirlas en el recipiente de cultivo. A este tratamiento se le denomina digestión enzimática.

Los cultivos primarios tienen la ventaja de conservar la morfología y las características genéticas de las células del tejido original, pero tienen un período de vida corto.

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

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

Cultivos de células secundarios: Son aquellos que se obtienen a partir de un subcultivo o [pase](#) de las células obtenidas en un cultivo primario o de otro secundario. También pueden proceder de una [línea celular](#) conservada en congelación. Cuando partimos de un cultivo primario, una vez seleccionado el tipo celular podemos mantener el cultivo durante un período de tiempo variable que depende del tipo y del origen de las células. Este tipo de cultivos puede propagarse un número limitado de veces, por ejemplo los [fibroblastos](#) se pueden subcultivar, alrededor de 30 veces. Pasado este tiempo, las células entran en [senescencia](#) y pierden la capacidad de dividirse. Por lo tanto las células tienen una capacidad

finita de divisiones mitóticas. A lo largo de las generaciones, las características de las células van cambiando. Al aumentar el número de pases, las células acumulan anomalías genéticas y van perdiendo su capacidad para dividirse. Los cultivos secundarios se utilizan en una gran variedad de estudios: bioquímicos, en ensayos de toxicidad, en virología, en investigación etc.

¿Cuál es la dinámica de crecimiento de un cultivo?

La dinámica de crecimiento de un cultivo se conoce como la curva de crecimiento. La curva de crecimiento es una curva sigmoidea en la que se distinguen varias fases:

- Fase de latencia: Inmediatamente después de realizar un pase de células pueden entrar en una fase de latencia del crecimiento donde hay poco aumento en el número de células. Durante este tiempo, la densidad celular es baja, con células que cubren menos de 50% de la superficie (conocido como 50% de confluencia). La fase de latencia puede durar alrededor de 1-2 días.
- Fase de crecimiento (o exponencial): El número de células aumenta exponencialmente durante esta fase, y el crecimiento celular continuará siempre y cuando haya suficientes nutrientes para mantener el número de células en crecimiento. Las células son un 50-80% confluentes, aproximadamente.
- Fase estacionaria: Durante esta fase, el número de células permanece constante, ya que algunas células mueren y otras se dividen lentamente. Eventualmente, todas las células morirán a menos que se agregue un medio de subcultivo fresco. En este punto, las células están a una densidad del 90-100%.

¿Cómo pueden crecer las células en los distintos soportes?

Como acabamos de mencionar, el crecimiento de las células en cultivo puede ser de dos tipos, en monocapa y en suspensión.

Crecimiento en monocapa:

Las células formarán una monocapa que cubrirá la correspondiente superficie de crecimiento. Cuando ocupen toda la superficie, es decir, cuando alcancen la confluencia y su multiplicación sea inhibida cuando se establecen contactos entre sí, las células entran en un estado de [quiescencia](#). Los recipientes para el cultivo de este tipo de células serán placas de Petri, frascos para el cultivo Roux, entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado. El anclaje al sustrato es un prerequisite para la proliferación celular. Es el método utilizado para la mayoría de las células excepto para las hematopoyéticas.

Las células se adhieren a la superficie y su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realiza con agentes proteolíticos como la tripsina. Coincidiendo con el periodo de latencia, en un primer momento, las células se adhieren a la superficie del soporte, una vez que las células se han "pegado" a la pared del frasco de cultivo, comienzan a proliferar, extendiéndose por toda la superficie y formando colonias de células. Con el paso del tiempo, las células ocupan toda la superficie disponible. En este momento se produce el fenómeno conocido como inhibición por contacto. En este momento las células detienen su crecimiento aunque siguen vivas. Este momento coincide con la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Es el periodo en el que las células se asemejan más a las células de origen. Llegada esta fase, para que reanuden su crecimiento, deberemos hacer un pase de células a un nuevo frasco de cultivo.

Crecimiento en suspensión.

En este caso, las células no necesitan adherirse a una superficie para crecer. Este tipo de crecimiento, es típico de células hematopoyéticas. Inicialmente, y coincidiendo con el periodo de latencia, las células se adaptan al nuevo medio y a las nuevas condiciones de cultivo antes de iniciar la proliferación. Pasado este periodo, las células crecen forma exponencial dispersas en el medio de cultivo. Llega un momento, en que el cultivo alcanza un volumen crítico en relación con el volumen de medio y los nutrientes que contiene. En este momento se produce el fenómeno de inhibición por densidad. Donde las células dejan de crecer pero siguen vivas. De nuevo para que continúen su crecimiento, necesitamos realizar un pase, que en este caso no necesitará de tripsina.

¿Cómo se comportan las células tras sucesivos pases?

Los sucesivos pases de un cultivo celular primario, dan lugar a una línea celular primaria.

Una línea celular primaria, es aquella obtenida a partir de un explante, o de tejidos u órganos mediante métodos mecánicos y/o enzimáticos. Aunque inicialmente el cultivo primario consistirá en un conjunto de células de diferentes tipos con diferentes capacidades de crecimiento, según se van realizando pases, la población celular con mayor tasa de crecimiento irá desplazando al resto, por lo que la población celular se hará uniforme y homogénea. Esto sucede alrededor del tercer pase.

Una línea celular primaria, tiene una vida finita. Las células crecen durante un cierto número de pases que depende, sobre todo, del tipo celular y de las condiciones de cultivo. Así, los

hepatocitos de adultos sólo se mantienen como cultivo primario, las células endoteliales de cordón umbilical humano permanecen en cultivo de 3 a 9 pases y los fibroblastos dérmicos humanos pueden superar los 20 pases. Sin embargo, al final, todas ellas entran en una fase de senescencia en la que se acumulan numerosas anormalidades y se pierden las funciones especializadas, lo que conduce a la muerte del cultivo.

Sólo ocasionalmente líneas celulares procedentes de un cultivo primario pueden mantenerse durante más generaciones de las esperadas. Ello es debido a la aparición en el cultivo de células inmortales. Estas células forman líneas estables o continuas. En la mayoría de los casos se desconoce la razón de la aparición de células inmortales pero se ve favorecida por infecciones virales o tratamientos con mutágenos (físicos o químicos), lo que podría estar relacionado con la pérdida, espontánea o inducida, de las vías de control de la división celular.

La capacidad de un cultivo celular primario para establecerse como línea estable está relacionada directamente con su variabilidad genética. En general, una línea celular estable será tanto más fácil de establecer o cultivar cuanto más indiferenciada esté, con las excepciones de las líneas tumorales de células diferenciadas. Los cultivos primarios de muchos tipos celulares son posibles porque las células pierden algunas de sus propiedades diferenciadas, entre ellas la capacidad de dividirse. Esta pérdida de algunas de sus propiedades características puede deberse a desdiferenciación o a desadaptación. La desdiferenciación implica una pérdida irreversible de una propiedad diferencial del tipo celular. En la desadaptación, la pérdida no es irreversible ya que se debe a la ausencia de algún tipo de señal (hormonal, nerviosa, etc.) y que basta con recuperar esa señal para que la característica se vuelva a expresar.

Las líneas celulares continuas, son células resultantes de un proceso de transformación de las células normales, relacionado con una pérdida de los mecanismos de control celular. Son células que crecen indefinidamente en cultivo (inmortales), pierden la dependencia de anclaje, característica de las células que crecían en monocapa, pierden la inhibición por contacto, pueden invadir tejidos provocando tumores, y acumulan anomalías genéticas. Siendo habitualmente [aneuploides](#).

Existen cultivos abiertos y cerrados.

Hay cultivos celulares que se realizan cerrando herméticamente los tapones de rosca de los tubos y frascos de cultivos. Son cultivos cerrados donde no hay intercambio de gases (oxígeno y CO₂) entre el interior del recipiente y el exterior. Sin embargo hay veces que las

células se cultivan en sistemas abiertos. En estos sistemas el aire del incubador puede pasar al interior del cultivo, gracias a que los tapones de los frascos y tubos se dejan semi-abiertos, en una posición "ventilada" que permite el intercambio de gases. Estos cultivos se realizan en atmósferas de CO₂ a una concentración del 5 %.

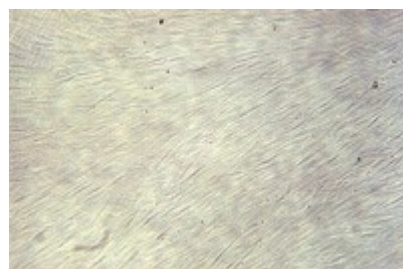
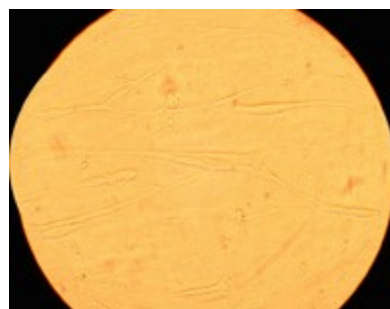
2.2.- Tipos de células.

¿Qué aspecto presentan las células en un cultivo?

Una vez en cultivo las células presentan una gran variabilidad en su aspecto, forma y comportamiento. El aspecto de las células en cultivo varía dependiendo del tipo de medio y de la densidad celular, pero en general podemos establecer tres tipos de morfología básica:

- Las células que crecen en suspensión (células de la sangre y hematopoyéticas) presentan en cultivo una morfología esférica.
- Las células que crecen en monocapa, presentan una forma aplanada, debido a su adhesión al sustrato y morfológicamente pueden clasificarse en dos tipos:
 - Células de tipo fibroblasto. Con forma semejante a la que presentan los fibroblastos, alargada o de huso, bipolar.
 - Células de morfología epitelial: Forma poligonal y aplanada.

Las células de tipo fibroblasto no se asocian fuertemente entre ellas ni con otros tipos celulares. Presentan una forma alargada. Cuando la densidad del cultivo es alta, este tipo de células se disponen en paralelo y muestran un aspecto similar al de las imágenes.

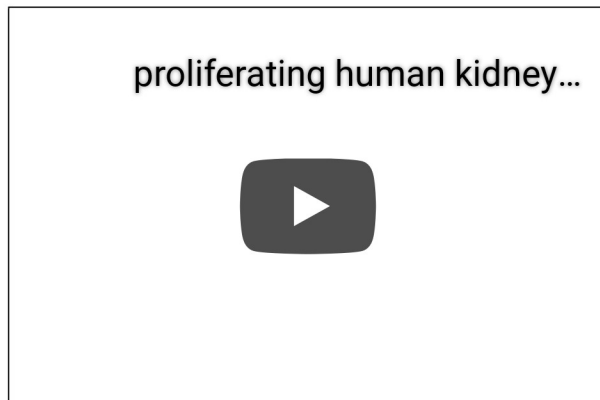


Las células de tipo epitelial tienen una forma más redondeada y se unen unas a otras lateralmente mediante uniones fuertes. Conforme el cultivo aumenta de densidad forman agrupaciones estables de células fuertemente unidas.

La morfología de las células en cultivo está relacionada con su origen: Los fibroblastos, al igual que las células musculares y las del endotelio vascular derivan del [mesénquima](#). Las células epiteliales tienen un origen [ectodérmico](#).

Para saber más

En este vídeo podrás ver los cambios que experimenta un cultivo de células epiteliales a lo largo de los días, observa la formación de agregados celulares característica de este tipo celular.



[Resumen textual alternativo](#)

Autoevaluación

Señala las respuestas correctas en relación a los cultivos celulares:

- ☐ La citogenética utiliza en sus estudios cultivos celulares primarios.
- ☐ El cultivo de la sangre periférica se realiza generalmente en monocapa.
- ☐ Los cultivos en suspensión son la opción más idónea cuando se siembran explantes.
- ☐ El cultivo de las células de sangre periférica se realiza añadiendo al medio sustancias que induzcan la proliferación celular.

Mostrar retroalimentación

Solución

1. Correcto

- 2. Incorrecto
- 3. Incorrecto
- 4. Correcto

2.3.- Medios de cultivo y aditivos.



a

Un punto importante en las técnicas de cultivo celular es la selección del medio de cultivo adecuado para el crecimiento celular. Un medio de cultivo es un medio artificial preparado mediante la mezcla de componentes purificados que ayudan al crecimiento y mantenimiento de una variedad de estirpes celulares de mamíferos y de otros tipos *in vitro*, ya sea como cultivos dependientes de anclaje o cultivos en suspensión. Los cultivos celulares proporcionan comodidad, control y reproducibilidad de los resultados. Los medios de cultivo celular se suministran habitualmente como líquidos, concentrados, en polvo u otras formas sólidas preesterilizados listos para usar en frascos, o como bolsas selladas de un solo uso para su integración en sistemas de cultivo celular compatibles.

En la imagen se observa una botella de medio utilizado para cultivar células. Si miras con atención su etiqueta verás una serie de nombres que corresponden a las sustancias más importantes que ese medio lleva en su composición. Al lado tienes otra botella más pequeña con una sustancia que si te fijas bien está congelada.

¿Cuáles son estos componentes y qué función realizan en el cultivo celular?

Todos los medios que se utilizan para cultivar células son medios definidos (es decir, se conoce exactamente su composición) que aportan los nutrientes necesarios para que las células puedan realizar su metabolismo, esto es obtener la energía necesaria para crecer y multiplicarse. Los medios de cultivo constan generalmente de dos partes: Un medio basal nutriente y los suplementos.

Componentes del medio de cultivo:

Salas minerales

La base de un medio de cultivo es una solución salina equilibrada que es una mezcla de sales inorgánicas, de la que se disuelven el resto de componentes. Son componentes habituales, el cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, cloruro de magnesio, fosfato sódico, fosfato potásico y bicarbonato sódico. Este conjunto de sales permite controlar el pH y la presión osmótica del medio. Esta solución de sales recibe el nombre de solución salina equilibrada y permite el cultivo de las células durante un tiempo corto (2 o 3 días). Aunque normalmente es la base de los medios de cultivo, también puede usarse de forma individual para diluir medios más completos, como medio de disección o lavado, o para incubaciones cortas que requieren un medio isotónico no completo nutricionalmente. Hay dos tipos de soluciones salinas equilibradas que se utilizan frecuentemente en cultivo celular y cuyos nombres verás en catálogos y manuales:

- HBSS (Solución salina equilibrada de Hanks).
- EBSS (Solución salina equilibrada de Earle).

Glucosa

Suministra a las células una fuente de carbono y energía. La glucosa, supone la fuente de energía en muchos medios. *In vitro*, es metabolizada preferentemente vía glucólisis hacia piruvato que puede ser convertido en lactato o acetoacetato que entra el ciclo de Krebs, y genera CO₂.

Aminoácidos

Es necesario suplementar el medio basal con los aminoácidos esenciales. Un suplemento común es el de glutamina, a 2 mM final, aunque hay algunas líneas celulares pueden usar el glutamato. La glutamina es inestable en el medio, y se recomienda añadirla a partir de un stock concentrado (100x) que se mantiene congelado, no más de una semana antes de añadirla al medio al cultivo (conservando a 4 C).

Vitaminas

En medios bien definidos se suplementan todas las vitaminas. La limitación de vitaminas afecta a la supervivencia de las células y provoca una reducción de la tasa de crecimiento sin alterar en exceso la densidad celular.

Suplementos orgánicos de bajo peso molecular

Como pueden ser lípidos, ácidos grasos, piruvatos, nucleosidos, intermediarios del ciclo de

Krebs, etc

Antibióticos y antifúngicos

A fin de evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo se suele suplementar éste con sustancias antibióticas de diferente espectro de acción. La adición de antibióticos ha de ser estrictamente controlada para evitar efectos nocivos sobre el cultivo. Es importante tener especial cuidado cuando se combinan dos o más antibióticos.

Mezclas de antibióticos de uso más común:

Penicilina (100 U/ml) / Estreptomicina (100 µgr/ml). Combinación anti-microbiana.

Penicilina (100 U/ml) / Estreptomicina (100 µgr/ml) / Fungizona. Combinación antimicrobiana y antifúngica.

Gentamicina (50 µgr/ml). Antimicrobiana, conviene ir alternándola con la penicilina-estreptomicina.

Anfotericina-B (2.5 µgr/ml). Antifúngico. Se han observado algunos efectos secundarios sobre el crecimiento de células de médula ósea humana en cultivo.

Suero

Aporta hormonas y factores de crecimiento, factores de adhesión e inhibidores de proteasas. Los tipos de suero empleados más habitualmente son:

suero de ternera (CF), suero bovino fetal (FCS), suero de caballo (HS), y suero humano (HuS). El más usado es el suero de ternera, mientras que el suero bovino fetal es usado en líneas más exigentes, y el suero humano en líneas humanas.

La utilización del suero puede suponer varios problemas:

En el suero existen gran cantidad de componentes presentes en cantidades variables que pueden influir notablemente en el cultivo (hormonas, factores de crecimiento...). Algunos factores séricos como el factor de crecimiento plaquetario (PDGF) estimula la proliferación de fibroblastos, lo que puede ser un problema en el establecimiento de cultivos primarios especializados.

Además, el suero no tiene una composición definida y esta varía de lote a lote. Cada lote se

puede emplear como máximo 1 año, probablemente deteriorándose a lo largo de ese tiempo, a pesar del almacenamiento a baja temperatura (-20°C). Cada cambio de lote de suero requiere realizar una serie de controles tediosos y costosos para valorar el comportamiento de las células ante el nuevo suero. Si se cultivan varios tipos celulares cada uno puede requerir un lote diferente, lo que complica el almacenamiento e incrementa los costes. Crea una dependencia importante de un suministro que no siempre puede mantenerse con la periodicidad y calidad requerida. Si se han de purificar productos del medio de cultivo la presencia de los componentes del suero dificulta notablemente estos procesos.

Por último, el suero supone uno de las fuentes más común de contaminación por microorganismos, sobre todo por virus y micoplasma, lo que representa un grave peligro para el cultivo. En conjunto supone un gran inconveniente para la estandarización de protocolos experimentales y de producción.

Todo esto, supone un gran inconveniente en la estandarización de protocolos experimentales. Por eso en los últimos años a fin de reemplazar el suero se han desarrollado una serie de sustitutos comerciales como son SerXtend, Ventrex, Nu-serum.

Aunque como hemos dicho un medio de cultivo generalmente es un medio de composición definida. La adición de suero convierte al medio, en medio no definido, debido precisamente a la variabilidad tanto cualitativa como cuantitativa de los componentes del suero. Para evitar esta variabilidad, es posible utilizar componentes individuales que se añaden al medio con composición definida (factores de adhesión, hormonas, factores de crecimiento, etc).

Por tanto podríamos definir medio no definido como aquel medio que tiene componentes cuya composición química y concentración no están determinados. Cuando a un medio definido se le adiciona el suero, este medio pasa a ser medio no definido.

Respecto al porcentaje de suero, lo normal es empezar con porcentajes altos de entre el 10-20%, y probar a introducir suplementos que permitan reducir esta cantidad.

Un aspecto importante a tener en cuenta respecto al suero, es la necesidad de llevar a cabo la descomplementación del suero para inactivar las [proteínas del complemento](#) que, en algunos casos, pueden producir alteraciones en los cultivos celulares. Para ello, basta con mantener el suero en el baño a 56°C , durante 30 minutos.

Soluciones amortiguadoras o soluciones tampón:

Las células son muy sensibles a los cambios de pH, por ello los medios de cultivo deben estar tamponados. Las soluciones tampón más habituales son:

- **Tampón bicarbonato:** se utiliza en cultivos abiertos en atmósferas de CO₂, a una concentración de 10 mM.
- **HEPES:** un tampón no iónico que se utiliza en los sistemas de cultivo cerrados.

La solución tamponadora más empleada es el tampón bicarbonato, que equilibra el CO₂ atmosférico, a pesar de su escasa capacidad tamponadora, debido a su bajo coste, baja toxicidad, y beneficios nutricionales para el cultivo.

El **HEPES** es la solución tamponadora de elección para células de crecimiento rápido por su elevada capacidad tamponadora en el rango de 7,2 a 7,6 y se emplea en concentraciones de entre 10 y 20 mM.

Indicadores de pH:

Los medios de cultivo son generalmente medios tamponados (con HEPES o bicarbonato) para mantener un pH alrededor de 7,4. Los indicadores de pH, como el rojo fenol, cambian de color a medida que aparecen catabolitos ácidos en el medio como resultado del metabolismo celular. En condiciones normales, a pH 7,4 el color del medio será rojo. El rojo fenol presenta los siguientes colores según el pH del medio:

- rojo a pH 7,4
- naranja a pH 7,0
- amarillo a pH 6,5
- púrpura a pH 7,8

Los medios de cultivo se pueden preparar en el laboratorio a partir de sus componentes, pero lo más habitual es adquirir los medios comerciales. Son medios de cultivo comunes:

Medio Basal de Eagle (BME). Aminoácidos esenciales.

Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM). Contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME. Se ha convertido en el medio estándar del cultivo celular. Contiene HBSS o EBSS y se puede suplementar con varios aminoácidos no esenciales y vitaminas dependiendo del tipo de células a cultivar.

R.P.M.I. 1640. Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares

leucémicas. Es el medio utilizado para cultivar muestras de sangre que contienen linfocitos estimulados con fitohemaglutinina.

Medio MEM modificado por Dulbeco (DMEM). Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el B.M.E.

Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM). Es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, etc

McCoy 5A. Medio diseñado para el crecimiento de líneas celulares diploides.

Medio L-15 de Leibovitz. Utilizado para el cultivo de virus.

Medio F-10 de Ham. Para el crecimiento de líneas celulares humanas. Debe ser suplementado con proteínas y hormonas. Contiene Fe, Cu, Zn.

Medio F-12 de Ham. Útil para el crecimiento de líneas celulares con suplementos proteínicos. Tanto este como el anterior, se utilizan para cultivar células de líquido amniótico.

Medio 199. Muy usado para el cultivo de células no diferenciadas y estudio de cromosomopatías

Debes conocer

En la siguiente presentación encontrarás una explicación detallada de los componentes que forman parte de los medios de cultivo celular.



[Resumen textual alternativo](#)

2.4.- Condiciones para un cultivo óptimo.



Para cultivar células no basta solo con añadir al medio nutrientes, debemos asegurarnos que las condiciones del medio no varían a lo largo del período de cultivo. Esto se hace añadiendo a los medios determinados componentes que aseguren unas condiciones óptimas de T^a (habitualmente, 37°C), pH y [osmolalidad](#), y una concentración de gases adecuada (5% CO_2 y 95% O_2). Por otra parte, un cultivo supone sacar a las células de su entorno fisiológico para hacerlas crecer en un recipiente que las aísla del exterior. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo celular, y la variación de las condiciones para un tipo celular concreto, puede dar lugar a la expresión de diferentes [fenotipos](#).

El soporte físico en el que se cultivan las células.

- **Plástico desechable:** Existen en el mercado un gran número de recipientes que permite crecer las células a pequeña, mediana y gran escala. Los contenedores más comunes, son los frascos de cultivo, también llamados Flask, diseñados y tratados para facilitar la adherencia y el crecimiento de las células. Fabricados en poliestireno, son estériles y con áreas de crecimiento desde 25 hasta 175 cm^2 , que cuentan con un tapón diseñado para favorecer el intercambio gaseoso. En general, son no reutilizable, lo que supone una menor manipulación y un menor riesgo de contaminación. También son muy utilizadas las placas multipocillo, con un número de pocillos variable que oscila entre 6 y 96. Los pocillos están cubiertos por una tapa no hermética que les hace buenos recipientes para experimentos puntuales pero malos para evitar contaminaciones. Un tipo especial de placa multipocillo son las placas Transwell, dotadas de cámaras individuales que se acoplan a los pocillos, muy utilizadas para estudios de migración e invasión. Cuando se plantea un cambio de tamaño del soporte físico, se deben tener en cuenta múltiples factores entre los que se encuentran el aporte suficiente de nutrientes y el garantizar el

intercambio suficiente de gases entre otros.

Otros materiales menos usados son:

- Vidrio: Reutilizable, fácil de limpiar y esterilizar por calor (autoclave) y con buena capacidad óptica para observaciones con microscopía.
- Matrices tridimensionales: Forman redes tridimensionales porosas que ayudan a que determinados tipos celulares crezcan de forma parecida a como lo hacen *in vivo*.
- Microesferas de Sephadex: Son microesferas en suspensión, en donde crecen adheridas las células. De esta manera las células dependientes de anclaje crecen adheridas a una superficie (microesfera) pero aumentando notablemente la superficie de crecimiento disponible.
- Sustratos metálicos: Apropriados para determinados tipos de células, como las células de glía.

Son parámetros fisicoquímicos del medio que deben ser controlados:

Temperatura:

la temperatura tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las células, por lo que un buen control de la misma es importante durante la incubación. La temperatura de 37 °C es ideal para cultivos células humanas. Las células toleran relativamente bien las bajadas de T^a , pero son sensibles a las temperaturas elevadas. En general, toleran bien variaciones de entre 35 y 38 °C, pero hay que tener cuidado porque un aumento de temperatura mayor producirá la muerte de las mismas.

Influye en el pH del medio, por lo que se recomienda ajustar el pH del medio 0,2 unidades por debajo del óptimo, a temperatura ambiente, o bien preparar el medio completo, incluso suero, dejar equilibrar O/N en la estufa y después ajustar el pH, antes de añadirlo al cultivo.

Humedad:

Debe ser suficiente para evitar la evaporación del medio de cultivo. Es controlada por el incubador que posee dispositivos para mantener la humedad en niveles óptimos de alrededor del 95%.

pH:

El crecimiento de las células animales en un medio de cultivo es óptimo cuando el pH del

medio se encuentra en el intervalo entre 7,2 y 7,4, similar al pH fisiológico. Para mantener este pH sin apenas variaciones se incorporan a los medios de cultivo tampones.

Distintas situaciones pueden ocasionar cambios en el pH del medio de cultivo, aunque solo algunas reflejan sufrimiento en las células. Por ejemplo, el metabolismo celular, conlleva la liberación de ácidos al medio de cultivo. Esta liberación puede ser más elevada dependiendo de los nutrientes incorporados al medio de cultivo y de la densidad de la población celular. Normalmente las soluciones tamponadoras que incluyen los medios de cultivo y los cambios periódicos de dichos medios, evitan cambios en el pH debido a este factor. Una disminución de la Tª del incubador, favorece la disolución de CO₂ en el medio y lo acidifica. Por otro lado, algunos microorganismos contaminantes de los cultivos animales pueden acidificar o alcalinizar el medio de cultivo. En este caso, el indicador de pH facilita rápidamente la identificación de la contaminación. Un cambio en el color del medio producido por un viraje del indicador de pH de dicho medio hacia pH más ácidos indicará normalmente un exceso de productos de desecho en el medio y aconsejará el cambio de medio por medio fresco.

Osmolaridad:

La osmolaridad, es la concentración de partículas (moléculas o iones) en disolución. Se define el osmol, como un mol de partículas. Por lo tanto:

osmolaridad: número de moles de partículas / Litro de disolución (osmoles/L)

osmolalidad: número de moles de partículas / Kilo de disolución (osmoles/Kg)

Ambos términos son similares a molaridad y molalidad, pero mientras que estos hacen referencia a concentraciones de un único soluto (elemento o compuesto) en una disolución, osmolaridad y osmolalidad se refieren al conjunto de todos los solutos presentes en la disolución.

Mantener la osmolaridad en el cultivo es importante porque ayuda a regular el flujo de sustancias que entran y salen de las células. El rango de presión osmótica óptima para el cultivo varía entre 260 y 320 mOsmol/L. Un medio de cultivo hiperosmótico, provoca la salida de agua del interior de la célula y un medio de cultivo hipoosmótico, la entrada de agua al interior de la célula a través de la membrana plasmática. Cualquiera de las dos situaciones provocan la muerte de la célula. Se regula controlando la concentración de sal del medio de cultivo. La osmolaridad del medio se mantiene estable evitando la evaporación del medio de cultivo colocando los frascos de cultivo en un incubador saturado de humedad.

Muchas células en cultivo tienen una amplia tolerancia frente a la osmolalidad del medio, creciendo bien con pequeñas variaciones dependiendo de la especie considerada.

Es recomendable emplear medios ligeramente hipotónicos para compensar la evaporación durante el periodo de incubación, especialmente en incubadores sin control de la humedad ambiente.

Hay que tener en cuenta que la adición de HEPES, de drogas disueltas en ácidos fuertes y la neutralización posterior pueden afectar fuertemente a la osmolalidad del medio.

Tensión superficial:

Se ha de mantener baja, y en general sólo se ve alterada por la aparición de espumas en los cultivos en suspensión donde se burbujea CO₂.

La espuma produce un aumento de la desnaturalización de proteínas e incrementa el riesgo de contaminación si la espuma alcanza el cuello del recipiente de cultivo. En estos casos es recomendable emplear un agente antiespumante de silicona.

Viscosidad:

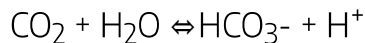
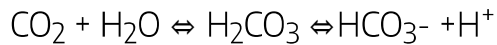
La viscosidad del medio viene determinada fundamentalmente por el contenido en suero y tiene poca influencia sobre el crecimiento. Es inversamente proporcional al daño celular, por lo que sí es importante para evitar el daño celular en la agitación del cultivo (menor daño a más viscosidad) y en la tripsinización.

Se puede incrementar la viscosidad, especialmente en medios libres de suero, añadiendo al medio carboxi-metil-celulosa o polivinilpirrolidona.

Atmósfera gaseosa:

CO₂: El CO₂ tiene un papel importante en los cultivos celulares. Cuando no es posible controlar el CO₂, los medios de cultivo que utilizan bicarbonato como tamponador de pH se alcalinizan (pH > 8). En esas situaciones se pueden emplear medios con tampones orgánicos como HEPES o Tris, estos tampones ajustan rápidamente el pH del medio a pH 7,4, pero hay que tener en cuenta que pueden ser tóxicos para bastantes tipos celulares o generar problemas de adaptación. Por lo que se emplearán en pequeñas cantidades cuando sea difícil mantener el pH con el tampón CO₂ -bicarbonato.

La fracción de CO₂ disuelta en el medio debe estar en equilibrio con el ión bicarbonato:



Como resultado, el nivel de CO₂ se mantiene estable dentro del frasco de cultivo, lo que permite que el pH permanezca en un nivel compatible con el crecimiento de las células.

Los cultivos abiertos necesitan para tener éxito concentraciones de CO₂ entre el 5 y el 10 % y también ciertos niveles de humedad. La atmósfera de CO₂ se consigue conectando la estufa a una fuente regulable de este gas y la humedad colocando en la parte baja de la estufa una bandeja con agua estéril a la que se le añade un compuesto que reduzca el riesgo de contaminación bacteriana o fúngica ([benzoato de sodio](#)).

Oxígeno: Es aportado por la atmósfera y queda disuelto en el medio. En general, las concentraciones de oxígeno atmosférico son suficientes para cubrir las necesidades de cualquier cultivo de células.

Luz Visible:

Tanto las células como los medios de cultivo deben ser expuestos lo menos posible a la luz, ya que puede favorecer la aparición de componentes tóxicos que afecten a la célula negativamente.

Para saber más

En este vídeo podrás conocer el material que necesitas utilizar para realizar las técnicas de cultivo celular.

BIOMATERIALES CULTIVO...



[Resumen textual alternativo](#)

Autoevaluación

Señala cuáles de las siguientes afirmaciones son ciertas.

- ☐ El tampón utilizado para cultivar células en sistemas de cultivo abierto es el HEPES.
- ☐ Un color amarillo del medio de cultivo indica que este se ha acidificado.
- ☐ El medio EBSS se utiliza para cultivar las muestras de líquido amniótico.
- ☐ El medio EBSS se utiliza para cultivar las muestras de líquido amniótico.
- ☐ El suero de ternera fetal se añade a los medios para regular su pH.

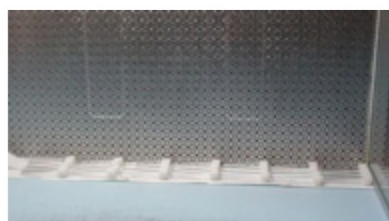
Mostrar retroalimentación

Solución

1. Incorrecto
2. Correcto
3. Incorrecto
4. Correcto
5. Incorrecto

2.5.- Puesta en marcha del cultivo.

Caso práctico



Cabina de flujo laminar con tubos de cultivo celular.

Marta enseña a Carlos y Susana cómo se añaden los suplementos a un medio de cultivo. Muchos de los medios utilizados en las técnicas de rutina vienen ya listos para ser usados, sin necesidad de manipulación previa, pero Marta considera importante que los alumnos y alumnas que pasen por esta Sección conozcan la manera de incorporar los suplementos al medio base por separado. Es una buena oportunidad para trabajar en la cabina de flujo laminar.

Una vez mezclados todos los componentes, entre los tres y, trabajando por turnos en la cabina de seguridad, distribuyen los mililitros del medio de cultivo preparado en los tubos y frascos que se van a utilizar antes de añadirles la muestra. En el día de hoy además de la muestra de sangre periférica de Susana hay varios líquidos amnióticos para diagnóstico prenatal y ha llegado también una biopsia de un tumor de colon. Carlos da un repaso a los protocolos antes de comenzar con el procedimiento de cultivo.

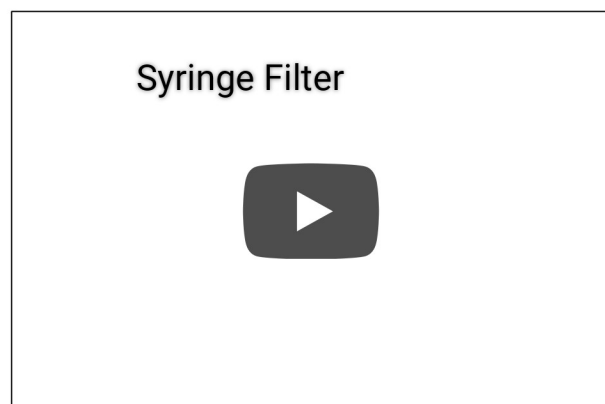
Muchos de los medios utilizados para cultivo celular deben ser suplementados antes de su utilización. Los suplementos necesarios para realizar el cultivo en condiciones óptimas se añaden bajo estrictas condiciones de [asepsia](#). Se trabajará siempre en cabina de flujo laminar, los materiales con los que trabajemos deberán ser estériles, y aquellos componentes que no pueden ser esterilizados, por ser termosensibles y estropearse con el calor, se añaden al medio de cultivo por [filtración](#) con filtro de 0,22 micras.

Para saber más

En este vídeo se muestra la forma de realizar la preparación de un medio de cultivo a partir de un producto liofilizado comercial.

[Resumen textual alternativo](#)

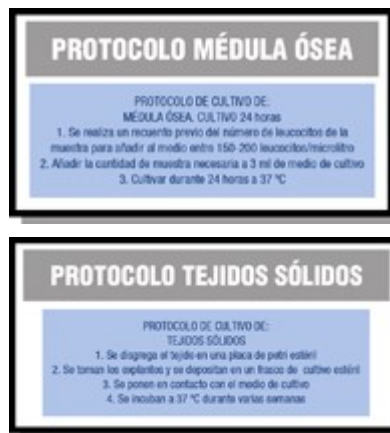
En este vídeo podrás ver la manera de realizar la filtración de una solución de componentes sensibles al calor y que por tanto no pueden ser autoclavados.



[Resumen textual alternativo](#)

Una vez preparado y suplementado el medio se preparan [alícuotas](#) del mismo en los recipientes de cultivo y se añade en ellos la muestra. Los protocolos de puesta en marcha del cultivo varían en función de la muestra a cultivar, a continuación se indican algunos pasos generales incluidos en la mayoría de los protocolos.

En relación a la puesta en marcha de los diferentes cultivos, debes tener en cuenta que:



- Al cultivar sangre periférica debes añadir un mitógeno al medio (si éste no está incorporado ya en el). El mitógeno utilizado es la fitohemaglutinina, una sustancia que estimula la proliferación de los linfocitos T.
- En algunos tipos de cultivo de médula ósea es necesario también utilizar mitógenos. A veces es necesario añadir mitógenos para facilitar la división de los linfocitos B. En otros casos se puede realizar un estudio directo de la muestra en el momento de su recepción.
- En el cultivo de líquido amniótico: No se debe mover el tubo de cultivo durante la fase inicial de asentamiento (de 5 a 7 días) para que las células puedan adherirse bien al sustrato. A partir de ahí los cultivos se examinan periódicamente para comprobar el estado de proliferación, subcultivándolos cuando sea preciso.
- Tejidos sólidos: Se realiza a partir de los explantes de la biopsia y se desarrollan sobre todo fibroblastos. Tras el período inicial los cultivos se examinan cada dos o tres días, para comprobar el estado de proliferación celular.

2.6.- Mantenimiento de cultivos.



¿Qué entiendes por mantenimiento?

Podemos definir mantenimiento como el conjunto de labores encaminadas a que el cultivo celular se realice de forma óptima. Una vez que éste se ha puesto en marcha las células comenzarán a dividirse. El crecimiento de las células en el cultivo es exponencial. El número de células aumenta cada generación de acuerdo con una progresión geométrica, 2, 4, 8, 16, 32... En la imagen se observa a un técnico examinando un cultivo celular en el microscopio invertido.

El mantenimiento de los cultivos es importante en los cultivos de larga duración.



Dentro del recipiente de cultivo las células continuarán dividiéndose de forma exponencial hasta que algún factor de crecimiento comience a escasear en el medio o el espacio disponible comience a disminuir. Entonces el crecimiento se detiene y el cultivo entra en una fase de meseta, en la que no se producen divisiones. A esta fase se le llama fase estacionaria o de quiescencia.

Cuando el factor limitante se recupera, el cultivo vuelve a dividirse de nuevo. De ahí que en los cultivos de larga duración, para asegurar el crecimiento exponencial de las células, sea necesario cambiar cada cierto tiempo el medio de cultivo. Esta es una de las labores incluidas en el mantenimiento.

Además del cambio de medio, que debe realizarse en estrictas condiciones de asepsia, ya explicadas en la unidad de trabajo anterior, otra de las labores propias del mantenimiento es la inspección de los cultivos.

Debes inspeccionar los cultivos diariamente. Es conveniente mantener un registro en el consten las acciones realizadas sobre cada uno de ellos.

A la hora de la inspección debes anotar:

- Su aspecto: comprueba el color del medio, recuerda que está relacionado con su pH. El medio en condiciones óptimas debe tener un color rojo. Un color amarillo del medio de cultivo, indicaría acidificación del mismo. La acidificación del cultivo suele indicar la posibilidad de contaminación.
- Su transparencia: cualquier signo de turbidez en él puede indicar presencia de contaminación.
- Al microscopio las células sanas son brillantes y en un cultivo en monocapa estarán pegadas al sustrato. Un alto porcentaje de células despegadas indicaría un problema en el cultivo.
- También se debe comprobar si el cultivo progresa. El cese de la multiplicación de un cultivo podría ser debido a una infección vírica. Es importante anotar el grado de confluencia de las células. Se define el grado de confluencia como el porcentaje de la superficie del recipiente que ocupan las células.

En las imágenes puedes observar dos momentos del mismo cultivo celular. En la imagen de la izquierda todavía se pueden observar huecos entre las células. En la imagen de la derecha estos huecos han desaparecido y las células comienzan a formar grumos. Si estas células se mantienen así el cultivo se detendrá.

Porcentajes de confluencia de las células en cultivo

Confluencia 60 %

Confluencia 100 %



2.7.- Técnicas de propagación de cultivos.



Medio de cultivo y reactivo utilizado en la tripsinización.

Disgregación celular.

Cuando se quieren realizar cultivos celulares a partir de órganos o tejidos, el primer paso consistirá en separar las células de interés de la [matriz extracelular](#) en la que se encuentran y entre si.

Existen varios procedimientos para realizar la separación de las células de los sustratos:

- Mecánicos: se basan en cortar, incluso triturar, fragmentos de órganos o tejidos colocados sobre una placa Petri con medio de cultivo o solución tampón. Las células pueden ser disgregadas con la ayuda de un bisturí, tijeras o pinzas. A continuación las células pueden ser filtradas a través de una malla con un diámetro de poro lo suficientemente grande como para permitir solo el paso de estas. Las células que se han separado del tejido, serán recogidas en un tubo aparte.
- Enzimáticos: se trata el tejido o el órgano con enzimas (colagenasa, tripsina, [pronasa](#)) para eliminar las uniones célula-célula, célula-matriz. El tiempo y la temperatura de actuación de estas enzimas sobre las células debe estar ajustada para asegurar su viabilidad. Transcurrido el tiempo de digestión enzimática, se eliminan los restos de tejidos mediante el uso de un embudo provisto de varias capas de gasa muy fina y estéril.

En la práctica se suelen emplear técnicas que combinan varios métodos. La elección del método depende de la naturaleza de las células y los tejidos.

Propagación de los cultivos.

Otra labor básica en el laboratorio de cultivo celular es la propagación de los cultivos.

Cuando queremos seguir manteniendo el cultivo y el espacio en el recipiente se agota es necesario realizar un subcultivo. Dividir el cultivo original en dos o más partes y sembrar cada una de ellas (alícuota) en un frasco diferente, para que de esta manera las células vuelvan a tener espacio y la división pueda seguir realizándose. En células adherentes que crecen en monocapa se debe proceder a "levantar" (despegar) las mismas de la superficie en la que crecen. Para ello será necesario romper la malla de proteínas que mantiene a las células unidas al soporte físico del cultivo, mediante tripsinización o raspado. En células en suspensión será suficiente con realizar una dilución en medio nuevo (o bien adición de medio tras centrifugación).

Existen diferentes métodos para separar las células del soporte, y el uso de un método o de otro dependerá en buena parte del tipo de célula:

- Mecánicos: En cultivos celulares se emplean con frecuencia los métodos de rascado ("scrapping") de la placa para arrancar las células adheridas. Se recorre el cultivo con unas pequeñas espátulas que levantan las células a su paso. También se puede golpear la placa o el frasco ligeramente para que las células se suelten del sustrato.
- Químicos. Se trata de la adición de agentes quelantes de iones divalentes, por ejemplo EDTA. Este compuesto atrapa iones como el Ca⁺⁺ o el Mg⁺⁺ que estabilizan la unión de las células a los soportes. De esta manera, al reducir la concentración de los iones que estabilizan las uniones célula-matriz, las células se despegan más fácilmente.
- Enzimáticos. Tratamiento del cultivo celular con soluciones de proteasas activas como la colagenasa, la elastasa o la tripsina.

Todas estas operaciones deben realizarse manteniendo la viabilidad del cultivo. No debemos dejar que las células mueran durante la operación.

El subcultivo de las células se debe realizar cuando estas han alcanzado una confluencia de aproximadamente el 80% y se quiere seguir manteniendo el cultivo.

Tras el levantamiento de las células la suspensión se reparte en nuevos frascos y se añade medio nuevo, que neutraliza el efecto de la tripsina y permite continuar el cultivo.

Es importante controlar la densidad (la cantidad) de células que se colocan en cada frasco. Se estima que para que el cultivo tenga éxito la densidad inicial de las células debe ser de 10 a $50 \cdot 10^3$ células/ml. si la densidad es menor el cultivo fracasará y si es muy alta las células

morirán.

La tripsinización es el método más empleado para separar del sustrato las células que crecen en monocapa. Es un método enzimático que se basa en la incubación de las células con tripsina a 37 °C durante un corto periodo de tiempo. La fórmula comercial de la tripsina (0,25%) suele ir acompañada de EDTA (1 mM), que favorecerá la acción de la tripsina y a la vez disminuirá su tiempo de actuación. Es importante lavar bien con solución salina (PBS) la monocapa de células para eliminar por completo el suero, puesto que este suele contener inhibidores de la acción de la tripsina.

Debes conocer

En esta presentación se detallan los pasos que se deben seguir al realizar la tripsinización de los cultivos celulares.



[Resumen textual alternativo](#)

Para saber más

En este vídeo se muestra la forma de preparar un medio de cultivo así como los pasos de los que consta el procedimiento de tripsinización de un cultivo en placa. Los pasos de la técnica aséptica también pueden ser repasados aquí.

[Resumen textual alternativo](#)

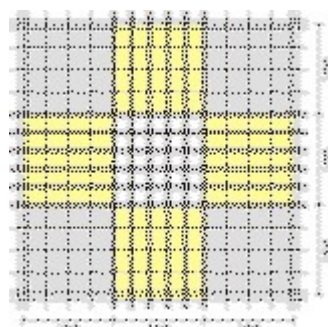
2.8.- Técnica de determinación del número y viabilidad celular. (I).

¿Cómo podemos controlar la cantidad de células que colocamos en cada uno de los frascos tras la tripsinización?

Realizando un recuento celular. Para ello, podemos utilizar diferentes aparatos. Más simples, como puede ser una cámara de recuento o más complejos como el Cell-Counter. El Cell-Counter, mide cambios en la resistencia eléctrica producidos cuando una partícula en suspensión no conductora atraviesa un pequeño orificio. Es un método rápido que permite contar altas densidades de células. Sin embargo, en la mayoría de los laboratorios se usan cámaras de recuento. Una cámara de recuento es una lámina de vidrio de forma rectangular de tamaño algo mayor que un portaobjetos. En la cámara, hay dos zonas de conteo (retículos) que llevan grabadas unas cuadrículas, superior e inferior, separadas por una hendidura. Sobre ellas se coloca un cubreobjetos que deja un hueco entre él y la cámara que se llena con el líquido de la suspensión celular.

Existen varios tipos de cámaras de recuento, la más utilizada es la Neubauer. Sus retículos tienen una superficie de 9 mm^2 (3 mm por cada lado) y están divididos en 9 cuadrados secundarios de 1 mm^2 de superficie. La profundidad de esta cámara es de 0,1 mm.

Para contar empleamos los 4 cuadrados secundarios de las esquinas. Cada uno de ellos está dividido en 16 cuadrados.



Para tener éxito en el cultivo, es importante calcular cuántas de estas células son viables tras el proceso de tripsinización. Para ello utilizamos un colorante vital denominado azul de

tripán.

Los colorantes vitales son aquellos compuestos que se utilizan para teñir células o tejidos vivos.

El azul de tripán es un colorante que está negativamente cargado, igual que la superficie celular, por lo que no puede penetrar en las células vivas. Esta tinción permite detectar las células vivas de las muertas. Si las células están vivas, tendrán intacta su membrana plasmática y el azul tripán no penetrará más allá de la membrana de la célula, de manera que las células se verán con el borde azulado. Si las células están muertas, el azul tripán penetrará fácilmente a través de la membrana plasmática, tiñendo la célula de azul. Esta solución se preparará en proporción 1:1 respecto a la cantidad de suspensión celular que utilicemos para hacer el recuento, de forma que las células quedarán diluidas a la mitad, y esta dilución deberá tenerse en cuenta en los cálculos finales.

Procedimiento:

1. Mezcla 1 parte de la suspensión celular (por ejemplo 0,5 ml) y una parte de colorante azul de tripán (0,4 %).
2. Incuba la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Monta y llena las cámaras del hemocitómetro con 10 μ l de la mezcla.
4. Cuenta bajo el microscopio a 40x únicamente las células no teñidas que serán las viables.

Para hacer el recuento deberás:

1. Montar la cámara colocando un cubreobjetos especial sobre el retículo.
2. Homogeneizar bien la suspensión celular y rellenar la cámara con la solución a medir. Se realiza colocando la punta de la micropipeta en el borde del cubreobjetos, en la zona donde está el retículo. El líquido penetra por capilaridad, caben unos 10 μ l. Hay que tener cuidado para que no se formen burbujas.
3. Permitir que las células se depositen en el fondo del área de recuento durante unos minutos antes de contarlas.
4. Enfocar el retículo con el objetivo de 10x, cambiar el objetivo a 40 aumentos. El recuento se hace recorriendo cada cuadrado en orden por ejemplo en zig-zag.
5. Realizar el recuento solo en los cuatro cuadrados secundarios y suma las células obtenidas en ellos.

6. Calcular la media de células por cuadrado secundario.

Existe una regla que debes seguir para contar y que evitará que cuentes algunas células dos veces. Se aplica a todas aquellas células que caen sobre las líneas del retículo. En estos casos sólo se deben contar las células que caigan encima de los bordes superior y derecho de cada cuadrado, dejando de contar las que caigan en los bordes inferior e izquierdo.

Los resultados se expresan en número de células por mililitro.

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \text{n}^\circ \text{ células contadas} / \text{n}^\circ \text{ cuadrados secundarios contados} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 10^4$$

Siendo:

- El Factor de dilución: el inverso de la dilución previa de la muestra que se ha realizado. Si hemos usado azul tripán para hacer el recuento, deberemos multiplicar por 2. Si las células están muy concentradas, también es posible realizar una dilución previa y también deberemos multiplicar por su factor de dilución.
- 10^4 : Factor de conversión para dar el resultado en ml. Teniendo en cuenta la profundidad de la cámara (0,1 mm) y el tamaño de cada cuadrado secundario (0,1 mm), el volumen de cada cuadrado secundario es $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$. Y sabiendo que 1 mm^3 es 10^{-3} ml .

Autoevaluación

El lavado, con tampón PBS, del cultivo celular en el primer paso del procedimiento de tripsinización tiene como objetivo proporcionar un pH adecuado al cultivo para que la tripsina pueda actuar. ¿Verdadero o falso?

- ☐ Verdadero.
- ☐ Falso.

Revisa los contenidos expuestos anteriormente. La afirmación no es correcta.

En efecto, la función del lavado del cultivo con PBS, es eliminar los restos del suero fetal bovino que llevaba el medio de cultivo y que inhibirán la acción de la tripsina.

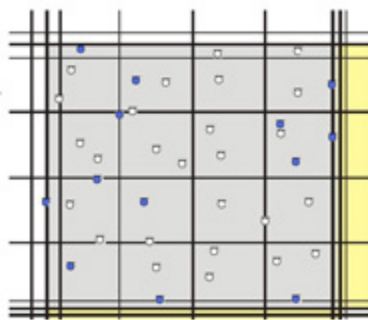
Solución

1. Incorrecto
2. Opción correcta

2.8.1.- Técnica de determinación del número y viabilidad celular. (II).

Ejercicio resuelto

Cuenta las células viables que aparecen en este cuadrado del retículo de un hemocitómetro donde se ha colocado una suspensión celular tratada con azul tripán. Imagina que en los otros tres cuadrados has obtenido el siguiente número de células: 35, 25 y 40, respectivamente. Indica el número de células vivas por ml que hay en la muestra.



Mostrar retroalimentación

El recuento se realiza contando las células no teñidas de cada cuadrado grande siguiendo las reglas mencionadas. En este caso hay 26 células vivas en este cuadrado. Siguiendo la fórmula tendremos:

La media de células en los cuatro cuadrados grandes del retículo será: 31,5.

Factor de dilución: En este caso hemos realizado una dilución de la suspensión a la mitad, con el colorante antes de medir (recuerda que tomamos una parte de colorante y una parte de suspensión), por lo que en realidad la suspensión contiene el doble de las células que contamos. Factor de dilución: 2.

Factor de conversión: 10^4 .

Resultado: $31,5 \cdot 2 \cdot 1000 = 63 \cdot 10^4$ células/ml.

Para saber más

En este vídeo, además de la manera de realizar el recuento puedes ver otro protocolo de tripsinización diferente. Se añade sobre las células del cultivo la solución de tripsina y se la deja actuar un tiempo corto. La mayor parte de la solución de tripsina se retira y las células se incuban con la tripsina residual hasta su completa separación.

[Resumen textual alternativo](#)

2.9.- Congelación y descongelación de células

Congelación de células.

Es importante disponer de [alícuotas](#) congeladas de las células con el fin de minimizar la acumulación de cambios genéticos en las líneas continuas, evitar la senescencia y la transformación en las líneas finitas, y evitar la pérdida accidental de una línea por muerte o contaminación.

En la actualidad el mejor método de almacenamiento es la congelación en nitrógeno líquido. Las células crecidas hasta un 70-80% de confluencia (fase logarítmica del cultivo) se resuspenden. La suspensión celular, idealmente de alta concentración celular, debe ser congelada lentamente (descenso de aproximadamente $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) en presencia de un agente preservante como el glicerol o el dimetilsulfóxido (DMSO). Esto se consigue introduciendo los tubos con las células en un recipiente especial con propanol, e introduciéndolo primero en el congelador de -80°C . Posteriormente las células son transferidas rápidamente a nitrógeno líquido (-196°C) cuando alcanzan una temperatura inferior a -50°C . Hasta llegar cerca de -80°C , la temperatura debe bajar lentamente para evitar la formación de cristales intracelulares que puedan dañar a las células.

La membrana celular es la estructura que sufre mayor daño en la congelación, esto es debido a la pérdida de fluidez de los componentes lipídicos, dando un alto grado de fragilidad celular. La lesión celular crioinducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y del estrés osmótico al que se ven inducidas durante la congelación.

Existen muchas soluciones de congelación de células. Se recomienda el uso de 10% DMSO en suero bovino fetal (FBS), aunque algunas líneas continuas se congelan con la misma eficacia en 10% DMSO en medio completo (usualmente DMEM 10% FCS).

En nitrógeno líquido se almacenan durante largos periodos de tiempo (años) sin deterioro celular apreciable. El almacenamiento a temperaturas tan bajas como -80°C también es posible aunque se detecta deterioro de las células a las pocas semanas y/o meses.

El objetivo de la criopreservación es mantener la viabilidad y funcionalidad celular. Este se

consigue porque el frío enlentece las reacciones enzimáticas que se producen dentro de las células.

Protocolo de congelación:

Tripsinización de los Flask para levantar todas las células.

- Quitamos el medio de cultivo del Flask y lavamos tres veces con PBS, este debe estar a temperatura a 37°C.
- Añadimos tripsina al 1 X, y la dejamos actuar durante 5 minutos a 37°C, esto dependerá del tipo de células con las que trabajemos.
- Pasado este tiempo añadimos medio de cultivo con suero para inactivar la tripsina (tres veces más de medio que de tripsina). Ya que la tripsina es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos o proteínas de menor tamaño.
- Pipeteamos bien la mezcla, procurando levantar algunas células si no se han despegado del todo.
- Tomamos la mezcla con una pipeta y la introducimos en un tubo Falcon para centrifugarla, la centrifugación se hará a 450 g durante 5 minutos. Con esto conseguimos eliminar la tripsina y poder añadir a las células medio nuevo.

Recuento de las células con azul tripán.

- Para ello resuspendemos las células que antes hemos centrifugado en medio de cultivo, la resuspendemos bien, y tomamos 20 μl , a los cuales los vamos a añadir otros 20 μl de azul tripán, los resuspendemos bien y procedemos a introducirlo en la cámara de Neubauer.

Cálculo de la cantidad de células que tenemos.

- Dividimos el nº de células contadas entre el nº de cuadrantes en los que las hemos contado, esto es para hacer un cálculo medio de las células que hay por cuadrante.
- El nº que nos ha salido lo multiplicamos por 2, que es el factor de dilución que hemos hecho al añadir el azul tripán. El resultado obtenido lo multiplicamos por 10000. El número que nos dé, será la cantidad de células que tenemos por ml, y calculamos, también la cantidad total de células que tenemos.

Preparación del medio de congelación.

- está compuesto por 90% de Suero Fetal Bovino y 10% de DMSO.

Añadimos a cada criotubo $2 \cdot 10^6$ células por mililitro de medio de congelación.

Introducimos los criotubos en un recipiente especial, que contienen propanol, y lo llevamos al congelador de -80°C .

- Pasadas 4 horas, o al día siguiente, podemos introducir los criotubos en el tanque de nitrógeno líquido.
- La función del propanol, es conseguir que la temperatura descienda de forma constante, a $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, hasta alcanzar los -80°C .

Descongelación de células.

Los periodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del congelación y el periodo de retorno a las condiciones fisiológicas normales, por ello la descongelación de los stocks se ha de realizar rápidamente, diluyendo la suspensión y eliminando el agente preservante con la máxima rapidez. Podemos clasificar los distintos métodos, de acuerdo a la velocidad de congelación y descongelación en protocolos de congelación lenta-descongelación lenta, congelación lenta-descongelación rápida (esta es la mas usada).

La descongelación de las células debe de ser muy rápida, puesto que esto previene la formación de cristales en el momento en que la temperatura baja de -50°C a 0°C , si el proceso se lleva a cabo lentamente causa daño celular y pérdida de viabilidad.

- Según saquemos las células del nitrógeno líquido, lo que debemos hacer es introducir las en el baño a 37°C , para que se descongelen lo antes posible.
- Una vez descongeladas las resuspendemos en un tubo de centrifuga con medio de cultivo suficiente para conseguir que el DMSO quede reducido a una concentración de un 1%, esto se realiza para lavarlas bien, y eliminar en el primer lavado la mayor cantidad posible de DMSO, ya que este daña las células.
- Las centrifugamos durante 10 minutos a 450g.
- Se quita el sobrenadante y se resuspende el [pellet](#), luego se siembran todas en un soporte de tamaño adecuado.

- Cambiarlas el medio al día siguiente para quitar los posibles restos de DMSO que puedan quedar.

2.10.- Contaminación en los cultivos celulares.

Como has visto anteriormente todos los medios de cultivo llevan como suplemento soluciones de antibióticos y antifúngicos que tratan de evitar el crecimiento de microorganismos en ellos. Estos compuestos deben ser añadidos al medio a una concentración baja, para no entorpecer el crecimiento celular, por lo que el riesgo de contaminación de los cultivos suele ser alto. El empleo de la técnica aséptica es fundamental para poder mantener la esterilidad y viabilidad del cultivo.

¿Qué microorganismos nos podemos encontrar contaminando nuestros cultivos?

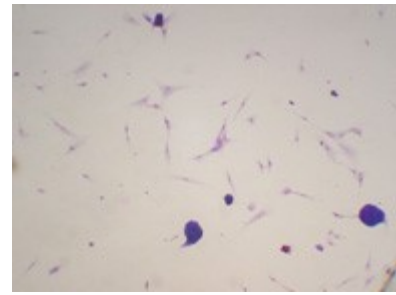
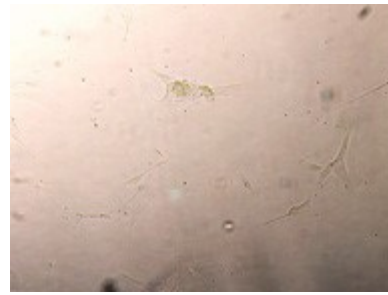
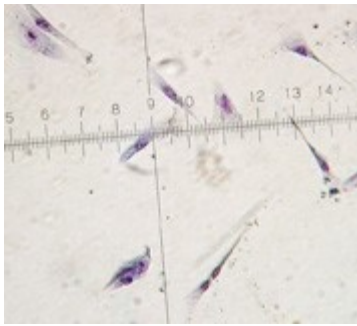
Fundamentalmente tres tipos: Bacterias hongos y virus.

- Bacterias que formen parte de la flora de la piel del operador o de su nariz o garganta: [Estafilococos](#), [estreptococos](#), *E. coli*, [micoplasmas](#), pueden contaminar nuestros cultivos si hay algún fallo en el procedimiento de técnica aséptica.
- [Hongos](#): Algunos tipos de [levaduras](#) que pueden estar en nuestra piel ([Candida](#)) y los hongos presentes en el aire o en el agua de los reactivos pueden causar contaminación de nuestros cultivos.
- Virus: Los virus son parásitos intracelulares que pueden estar ya presentes en la muestra cuando llega al laboratorio.

¿Qué signos nos indican que un cultivo puede estar infectado?

- Cambio de color del medio: como ya hemos indicado anteriormente, el viraje del color del medio a amarillo y la aparición de turbidez son signos de una posible contaminación bacteriana.
- Observación de bacterias, [hifas](#) de mohos y levaduras en el cultivo.
- Alteraciones en el crecimiento de las células.
- Cambios en la morfología celular.
- Alteración de la viabilidad celular.

Las imágenes corresponden a cultivos celulares de dos semanas de duración en los que las células muestran poco desarrollo. Se pueden observar estructuras sin identificar entre las células del cultivo y algunas de las células presentan unas formas esféricas adheridas a su



superficie. La morfología celular también ha cambiado. Las estructuras de forma esférica se tiñen de azul con el colorante empleado (Giemsa). Presumiblemente estos cultivos están infectados por hongos.

De todos los tipos de contaminación, la causada por virus y micoplasmas es la que es más difícil de detectar. Muchas veces no existe turbidez en el medio y su color tampoco varía. Las células suelen parecer enfermas y pueden verse en el cultivo morfologías diferentes a las habituales.

Los micoplasmas son un tipo de bacterias de tamaño muy pequeño ($0,2 \mu\text{m}$) que pueden atravesar los filtros utilizados para la esterilización de las soluciones que forman parte de los medios de cultivo. Representan un auténtico problema en el cultivo celular puesto que al no tener pared celular son resistentes a los antibióticos utilizados en el cultivo. Se estima que el 35% de los cultivos celulares que se hacen están contaminados con micoplasma. Es conveniente comprobar periódicamente si nuestro cultivo se ha contaminado con esta bacteria. Para ello se suele utilizar la aplicación de un colorante fluorescente Hoechst que tiñe el ADN y permite su visualización. En el ensayo se utiliza un control positivo de células infectadas con este microorganismo.

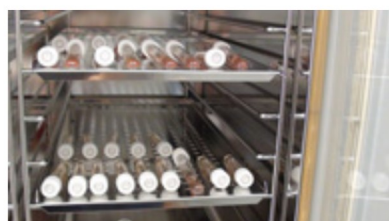
Para saber más

En este vídeo se muestra otro ejemplo de contaminación de cultivos celulares, en este caso por bacterias.

[Resumen textual alternativo](#)

3.- Procesamiento de cultivos de sangre periférica.

Caso práctico



Susana que puso a cultivar su sangre hace tres días, espera impaciente a que llegue el momento de realizar el sacrificio celular.

Carlos, que no se atrevió en su momento a que le extrajeran sangre, también tiene cierta curiosidad por ver qué pasa con los cromosomas de Susana. Juntos tratan de hacerse una idea de lo que estará pasando en la estufa durante el período de cultivo.

La fitohemaglutinina (PHA) añadida al medio de cultivo, habrá activado a los linfocitos T induciendo su proliferación. Para conseguir que todos los linfocitos de la muestra comiencen a dividirse a la vez es necesario sincronizar el cultivo.

La sincronización se realiza añadiendo unas sustancias al cultivo durante su incubación a las 48 y 72 horas respectivamente. Con ello se consigue aumentar el número de células que entran en metafase en el cultivo al mismo tiempo.

—¿Cómo hacemos para que los linfocitos T detengan su proceso de división en metafase? —pregunta Marta.

Carlos y Susana reflexionan, pero no consiguen recordar el nombre del compuesto...

¿Cómo obtenemos células en metafase?

Una vez que el período de cultivo ha finalizado, se añade a los tubos una sustancia llamada colchicina o colcemida a una concentración final de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ y se continúa con su incubación

durante una o dos horas.

La colchicina actúa rompiendo los filamentos del [huso acromático](#), por lo que la división celular se detendrá en metafase dejando a los cromosomas en el plano ecuatorial de la célula.



En un ciclo celular normal después de finalizada la metafase, los filamentos del huso acromático se retraen y los cromosomas se mueven hacia los polos de la célula continuando con el período de anafase. La colchicina, rompe estos filamentos e impide que el ciclo celular progrese, por lo que durante el tiempo de incubación con esta sustancia todas las células que comiencen su división quedarán detenidas en metafase.

Es importante determinar bien el tiempo de actuación de la colchicina, porque no todo son ventajas. Cuanto más tiempo estén las células en contacto con la colchicina, mayor número de metafases habrá en el cultivo pero también el grado de condensación de los cromosomas será mayor, lo que dificultará el análisis posterior de los mismos.

El procesamiento de los cultivos es un proceso relativamente largo, se realiza durante dos días consecutivos e incluye las siguientes fases:

1. Sacrificio de las células en metafase.
2. Fijación de los cromosomas.
3. Preparación de las extensiones cromosómicas.

Autoevaluación

¿Cuántas células por ml habrá en un cultivo al finalizar el proceso de tripsinización si el recuento realizado en el hematocitómetro muestra una media de 15 células?

- ☐ $15 \cdot 10^3$ células por mililitro.
- ☐ $15 \cdot 10^4$ células por mililitro.

- ☐ $3,7 \cdot 10^4$ células por mililitro.
- ☐ $30 \cdot 10^4$ células por mililitro.

Incorrecto, el factor de conversión es 10^4 .

Efectivamente es correcto, la media de células del recuento se debe multiplicar por factor de corrección para dar el recuento en 1 ml.

Incorrecto, el dato suministrado es el valor medio de los cuatro cuadrados. No hace falta que dividas por cuatro.

Incorrecto. En este caso no se ha realizado ninguna dilución de la muestra antes de colocarla en la cámara de recuento, por lo que no se debería considerar ningún factor de dilución.

Solución

1. Incorrecto
2. Opción correcta
3. Incorrecto
4. Incorrecto

3.1.- Sacrificio celular y fijación.



Tras el "arresto" de los cromosomas en metafase, Carlos y Susana se disponen a realizar los pasos del procedimiento de sacrificio celular.

Realizarán sobre la muestra de sangre de Susana lo mismo que vean hacer a Marta con el resto de las muestras que tienen para el sacrificio. El procedimiento es largo y consta de dos partes: Choque [hipotónico](#) y fijación.

El primer paso es la preparación e identificación tanto del material (tubos y pipetas Pasteur) que se va a utilizar, como de los reactivos necesarios para llevarlo a cabo:

- La solución de choque hipotónico: KCl a una concentración 0,075 M.
- Los fijadores: Soluciones de metanol y acético a concentraciones diferentes.

El protocolo de sacrificio celular incluye entre sus pasos tres operaciones fundamentales:

- Centrifugaciones para recoger las células. Realizadas a 3000 rpm durante 10 minutos. En estas condiciones las células sedimentan sin sufrir daños.
- Choque hipotónico: Utilizando la solución de KCl 0,075 M.
- Fijación de los cromosomas de la metafase.



El choque hipotónico es una operación crítica. Tiene como objetivo eliminar los eritrocitos de la muestra. La solución de cloruro de potasio utilizada, tiene una concentración de sales

menor que la que hay en el citoplasma de las células, por lo que el agua de la solución se moverá por [ósmosis](#) hacia el interior de las mismas. Los eritrocitos, que tienen una membrana más débil, se romperán y los leucocitos quedarán con un aspecto semejante a "bolsas" que llevan en su interior los cromosomas metafásicos (recordemos que la membrana nuclear desaparece al comienzo de la mitosis).

La fijación tiene como objetivos conservar la morfología de los cromosomas durante el proceso y facilitar el extendido cromosómico. Se lleva a cabo con metanol y ácido acético. El ácido acético provocará la lisis de los eritrocitos que no se hayan lisado con el choque, dando lugar a la aparición de un color marrón en el medio, consecuencia de la reducción de la hemoglobina. Uno de los fijadores más usados, es el reactivo de Carnoy, una mezcla de metanol y ácido acético en proporción 3:1.

Debes repetir el proceso de fijación seguido de centrifugación y descarte del sobrenadante varias veces (entre 4 y 5) hasta conseguir un sedimento de color blanco, donde prácticamente todo sean leucocitos.

Cuando la fijación no ha sido correcta, los cromosomas muestran en las extensiones lo que se conoce con el nombre de "halo", un material amorfo a su alrededor que da al conjunto un aspecto como de "huevo frito". Este material se tiñe en los pasos siguientes y dificulta el proceso de bandeo de los cromosomas.

Una vez realizada la fijación y el lavado de las preparaciones, se pueden guardar las células en nevera a 4°C en fijador de Carnoy durante varios días antes de realizar las extensiones.

Debes conocer

A continuación te detallamos, en una presentación, todos los pasos y condiciones de los que consta el procedimiento de sacrificio celular.

[Resumen textual alternativo](#)

3.2.- Preparación de extensiones cromosómicas.

Una vez realizado el sacrificio, Susana prepara los materiales para extender. Al igual que en el día de ayer una parte muy importante del trabajo es la rotulación de tubos y pipetas Pasteur de vidrio con las que se realizarán las mezclas y resuspensiones de los cultivos. Estos materiales se identifican con el número correspondiente a cada caso.

Susana prepara los portaobjetos donde se realizará la extensión de cada uno de los casos rotulándolos con un lápiz graso. Los cultivos trabajados ayer presentan un buen aspecto. En todos ellos se puede observar un botón blanco, que indica que el proceso de sacrificio celular se ha llevado correctamente.

Antes de extender, se centrifuga de nuevo el cultivo en las mismas condiciones que el día anterior, es decir a 3000 rpm durante 10 minutos. Al finalizar la centrifugación, se [decanta](#) la mayor parte del fijador que ha estado actuando sobre las metafases durante toda la noche, dejando un volumen entre 0,5 ml y 2 ml según el tamaño del botón o sedimento celular.



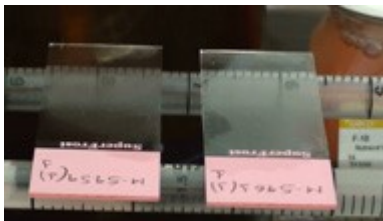
La extensión comienza inundando el portaobjetos con ácido acético al 45 % (dejando caer una serie de gotas que lo cubran por completo).

Tras esta operación se dejan caer unas 8 gotas de la suspensión celular fijada sobre el portaobjetos, colocado de la forma que se indica en la imagen (con cierta inclinación). Las gotas se dejan caer sobre el portaobjetos colocando la pipeta a cierta altura, al caer chocarán primero sobre el extremo elevado del portaobjetos y resbalarán por su superficie hasta el otro extremo. Como consecuencia del impacto la membrana plasmática de los linfocitos (que hasta

ahora había permanecido intacta) se romperá, liberando los cromosomas contenidos en su interior que quedarán depositados sobre el portaobjetos, separados una cierta distancia unos de otros.



De cada uno de los casos debes extender varios portaobjetos. Una vez realizada la extensión estos se colocan en una rejilla de tinción sobre el baño a 37 °C donde permanecerán unos minutos hasta que tanto el metanol como el ácido acético se hayan evaporado y las metafases se hayan fijado al su superficie. Tal y como puedes ver en la imagen.



Para saber más

En esta vídeo puedes repasar los pasos de la realización de un cariotipo

Making chromosome spreads for karyotyping



[Contenido textual alternativo](#)

4.- Técnicas de tinción y bandeado cromosómico.

Caso práctico



Una vez realizadas las extensiones cromosómicas Carlos y Susana preparan los materiales para su tinción.

La tinción es un paso importante, el estudio de los cromosomas se hace sobre las imágenes obtenidas de estos al microscopio.

Si la calidad de la tinción no es buena todo el análisis se resiente.

Como verás más adelante los cromosomas deben ser fotografiados con cámaras digitales acopladas a los microscopios.



De los portaobjetos extendidos para cada caso:

- Uno se tiñe con tinción sólida.
- Los demás se guardan en la estufa para poder ser utilizados en las técnicas de bandeado. Estas técnicas exigen un "envejecimiento" previo de los cromosomas que se puede realizar dejándolos de 7 a 10 días a Tª ambiente, 4 o 5 días a 37°C o uno o dos días a 56 °C en la estufa. El envejecimiento consiste en someter a la muestra a una

determinada T^a , por un tiempo determinado, para facilitar la eliminación de los restos de fijador así como que han perdido la humedad residual, que podrían dificultar la técnica posterior de bandeado. Cuanto mayor sea la T^a de envejecimiento, menor será el tiempo empleado para esta acción.

Existen varios métodos para teñir cromosomas utilizados en el estudio de las preparaciones cromosómicas. Los más empleados en rutina son el método de tinción convencional o tinción sólida que da lugar a unos cromosomas de apariencia uniforme y los métodos que dan como resultado la formación de bandas o áreas claras y oscuras en los cromosomas que se conocen con el nombre de métodos de bandeo.

En la tinción cromosómica se emplean colorantes de tipo Giemsa. Son colorantes que llevan una serie de compuestos que en solución están cargados positivamente por lo que se unirán al ADN que tiene una carga negativa neta. El tampón utilizado en estas técnicas de tinción es un tampón fosfato de pH 6,8.

También se puede utilizar Leishman, una mezcla de [eosina](#) y [azul de metileno](#) disueltos en metanol.

Autoevaluación

Señala cuáles de estas afirmaciones con respecto al procedimiento de sacrificio celular son correctas.

- ☐ El sacrificio celular comienza añadiendo a las células del cultivo una solución fijadora de las metafases.
- ☐ En el choque osmótico se emplea una solución hipotónica de cloruro de potasio para romper la membrana de los eritrocitos.
- ☐ El ácido acético favorece la lisis de los eritrocitos dejando intacta la membrana de los leucocitos.
- ☐ El fijador utilizado en los últimos pasos del proceso de fijación es metanol: acético en proporción 1:3.
- ☐ La centrifugación de los tubos durante el sacrificio celular se realiza a 13.000 rpm.

Mostrar retroalimentación

Solución

1. Incorrecto
2. Correcto
3. Correcto
4. Incorrecto
5. Incorrecto

4.1.- Tinción sólida.

El estudio de los cromosomas teñidos de forma homogénea se emplea en el estudio inicial de los casos. Se utiliza como [screening](#). Mediante la tinción convencional, los cromosomas se tiñen de manera uniforme, lo que nos permite controlar la calidad de las metafases antes de proceder con las técnicas de bandeo. Este estudio inicial consiste en el recuento del número de cromosomas de cada metafase y en el análisis de su morfología. En los estudios de rutina se estudian de esta manera entre 5 y 10 metafases. En el caso de que se encuentre alguna posible alteración se estudiarán hasta 25 metafases por este procedimiento.

Pasos del procedimiento de tinción.

Fíjate en las siguientes imágenes, en ellas te mostramos los pasos del procedimiento de tinción.

1. Se cubren las preparaciones con el colorante durante 8 minutos.
2. Al finalizar el período de incubación, se lavan los portaobjetos con agua destilada. Se dejan secar y están listas para que se observen al microscopio óptico.



Debes conocer

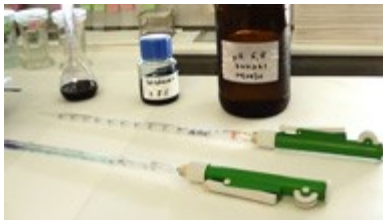
¿Qué es lo que ve el técnico cuando mira al microscopio una extensión cromosómica teñida mediante este procedimiento como la de esta imagen?



[Resumen textual alternativo](#)

El estudio de los casos comienza recorriendo el portaobjetos con el objetivo de 10x para hacerse una idea de la cantidad de metafases que hay para el estudio. Las metafases seleccionadas con este objetivo se enfocan con el objetivo de 100x. A este aumento se realiza el análisis cromosómico.

4.2.- Técnica de bandeado G.



Una vez realizado el estudio del número y la morfología cromosómica mediante tinción sólida, es necesario realizar la identificación de cada uno de los cromosomas. Las técnicas de bandeado o de bandeo, tienen como objetivo identificar a los cromosomas o partes de su estructura.

El bandeo G (o GTG por Tripsina y Giemsa) es la técnica de bandeo utilizada de forma rutinaria en la identificación cromosómica.

Existen otras técnicas de bandeado cromosómico, como la tinción de bandas R o las bandas Q que al igual que la técnica de bandeo G, dan lugar a una serie de bandas distribuidas a lo largo de toda la longitud del cromosoma. Otras técnicas de bandeo como la tinción de bandas C y las bandas NOR, se utilizan para demostrar la presencia de determinadas regiones o estructuras en el cromosoma, así por ejemplo las bandas C se utilizan para estudiar las regiones situadas al lado del centrómero y las bandas NOR ponen de manifiesto las regiones terminales de los cromosomas [acrocentricos](#).

Bandeo G:

El bandeo G se realiza tratando preparaciones envejecidas mediante calor (incubándolas por ejemplo dos días en la estufa a 56 °C), con una concentración baja de tripsina (que digiere parcialmente las proteínas que forman parte de los cromosomas) y . Todo ello genera en los cromosomas una serie de regiones claras y oscuras que reciben el nombre de patrón de bandas. Cada cromosoma posee un patrón de bandas característico que se utiliza en su identificación.

Con este método, cada cromosoma se tiñe con un patrón característico de bandas oscuras (G+) y claras (G-) que se corresponden con regiones ricas en AT y GC respectivamente.

Si los cromosomas aparecen huecos o deshilachados se deberá disminuir el tiempo; si muestran una morfología cromosómica estándar o poco bandeada se aumentará dicho tiempo. Se necesitan de cuatro a seis preparaciones para dar con el tiempo correcto de bandeo.

¿Cómo se obtienen las bandas?

En la tabla se muestran los pasos principales del procedimiento de bandeo cromosómico. Tras el tratamiento de la extensión con tripsina precalentada a 37°C durante un tiempo variable (alrededor de 8 segundos) se neutraliza su acción sumergiendo el portaobjetos en agua destilada y se tiñe con solución de Giemsa o Leishman en metanol a pH 6,8 durante 5 minutos. Se lava, se deja secar y se observa al microscopio.

Pasos del procedimiento de bandeo G

Tratamiento con tripsina

Tinción

Lavado



La imagen muestra una fotografía en blanco y negro de lo que ve el técnico al microscopio con el objetivo de 100x. Cada cromosoma muestra un patrón de bandas semejante a un "código de barras" que permite su identificación. Los cromosomas que han sido detenidos en la mitad del período de metafase muestran una resolución de alrededor de 400 bandas. Se pueden hacer cariotipos con cromosomas menos condensados, detenidos en prometáfase, que muestren un mayor número de bandas, se llaman cariotipos de alta resolución y contienen entre 550 y 850 bandas.

Bandeo R:

También llamado bandeo *reverse* o inverso. El principio básico de esta técnica es el tratamiento de las preparaciones en soluciones tamponadas a altas temperaturas seguidas de una tinción, que en nuestro caso es Giemsa. Las bandas obtenidas tras este proceso son las inversas respecto de las G.

El procedimiento consiste en usar preparaciones envejecidas a temperatura ambiente de una a tres semanas, se incuban en tampón Sorensen (pH 6,8) a 85° C, unos ocho minutos, aunque este tiempo deberá ajustarse en cada caso, lavar en tampón Sorensen a temperatura ambiente, teñir con Giemsa de seis a diez minutos, lavar en agua destilada y secar al aire.

Bandeo C:

La técnica del bandeo C produce una tinción selectiva de la heterocromatina constitutiva. Las bandas que aparecen se localizan preferentemente en el centrómero y en ocasiones en otros puntos. La técnica consiste en un tratamiento con una base fuerte y una incubación posterior en una solución salina.

Para la obtención de las bandas, las preparaciones se tratan secuencialmente con ácido clorhídrico, se lavan en agua destilada y secar al aire, se tratan posteriormente con un álcali (hidróxido de bario) y calor (en tampón 2x SSC a 60-65°C). Finalmente se tiñen con Giemsa.

Bandeo NOR:

Esta técnica localiza aquellas regiones del cromosoma que organizan y mantienen el nucleolo en la interfase. La técnica consiste en poner de cuatro a seis gotas de AgNO_3 (nitrato de plata), al 5% sobre las preparaciones y taparlas con un cubre, incubar a 37° C en cámara húmeda de 18 a 24 horas, retirar el cubre, lavar en agua destilada y secar al aire.

Bandeo Q:

Requiere un microscopio de fluorescencia para su observación. Es una técnica de bandeo fluorescente que utiliza quinacrina para teñir los cromosomas. Las bandas Q brillantes coinciden con las bandas G oscuras (G+).

5.- Análisis e interpretación de preparaciones cromosómicas humanas.

Caso práctico

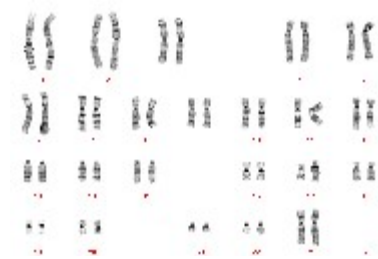


Susana y Carlos ya tienen preparadas 4 extensiones de cada muestra de sangre. En una de ellas han realizado la tinción sólida para su estudio al microscopio óptico y han dejado las otras 3 en la estufa envejeciendo para poder hacerles las bandas más adelante.

Carlos tendrá que ayudar hoy a Marta en el análisis de las metafases al microscopio. Está un poco nervioso, recuerda haberlo hecho alguna vez en el instituto pero no es lo mismo, aquí la responsabilidad es mucho mayor. ¿Y si se le escapa algún detalle importante?

Marta entiende perfectamente el nerviosismo de Carlos y antes de empezar con el análisis al microscopio repasan algunos casos estudiados la semana anterior, ya informados, resaltando los rasgos de los cromosomas que más fácilmente permiten su identificación.

5.1.- El cariotipo humano.



¿Qué es un cariotipo?

Se llama cariotipo a la ordenación de los cromosomas de una especie en función de su tamaño y la posición del centrómero. En el momento de ordenarlos, los cromosomas se colocan en una determinada posición, establecida por normas internacionales: El brazo corto (p) se coloca siempre hacia arriba y el largo (q) hacia abajo.

La imagen muestra un cariotipo humano. Consta de 46 cromosomas, divididos en 23 pares de [cromosomas homólogos](#). De ellos, 22 parejas son autosomas (cromosomas no sexuales) que se ordenan en 7 grupos designados por letras, que van desde la A a la G. Hay además un par de cromosomas sexuales.

Dentro de cada grupo los cromosomas también están ordenados por tamaños, de mayor a menor. Cada par cromosómico se designa por un número. Así sabemos por ejemplo, que los cromosomas del par 8 tendrán un tamaño mayor que los del par 12, y serán más pequeños que los cromosomas del par 6.

Debes conocer

En la siguiente presentación conocerás las principales características de los cromosomas dentro de cada grupo.



[Resumen textual alternativo](#)

Autoevaluación

Indica cuál de las siguientes afirmaciones en relación a los cromosomas que forman parte del cariotipo es correcta.

- ☐ Los cromosomas que forman parte del grupo G son 4.
- ☐ Los cromosomas que forman parte del grupo F son 6.
- ☐ Todos los cromosomas del grupo B son submetacéntricos.
- ☐ El grupo C está formado solo por cromosomas submetacéntricos.
- ☐ El grupo C está formado solo por cromosomas submetacéntricos.

Mostrar retroalimentación

Solución

1. Incorrecto
2. Incorrecto
3. Correcto
4. Correcto
5. Incorrecto

5.2.- Análisis cromosómico de metafases teñidas con tinción sólida.

Caso práctico



Susana coloca la extensión teñida con Giemsa al microscopio para su análisis. El hecho de que la muestra que va a analizar sea su propia sangre le hace estar más inquieta de lo habitual. Ya se imagina que el resultado del estudio va ser normal pero le cuesta enfocar el microscopio y decidir cuál de las metafases que ve quiere estudiar.

Por fin se decide por una en la que los cromosomas son cortos, tienen la cromatina más condensada y una morfología bien definida, le parece que será más fácil contarlos y asignarles un grupo. Nada más lejos de la realidad, contar los cromosomas en fotografías como ha hecho en el instituto no tiene nada que ver con contarlos directamente al microscopio y se pierde varias veces.

Carlos por su parte está examinando otro de los casos pendientes de estudio, se trata de un líquido amniótico perteneciente a una mujer embarazada de 20 semanas. Él, que está más tranquilo ya ha conseguido saber que el feto se trata de un niño y por ahora es normal. Solo ha examinado una metafase así que deberá continuar su estudio para poder realizar esa afirmación.

Marta, pendiente en todo momento del trabajo de Carlos y Susana, pasa por la zona de los microscopios para ver que tal van. Susana le cuenta sus problemas y Marta les explica el proceso que deben seguir para analizar las metafases al microscopio.



El estudio citogenético implica el análisis de unas 20 células para llegar a un resultado concluyente. Si en estas 20 células se detecta alguna alteración que no está presente en todas las células estudiadas se continúa el estudio hasta analizar 50 o a veces 100 metafases, para descartar la posibilidad de mosaicismo (presencia de dos o más líneas celulares con distintos cariotipos en el espécimen). El mosaicismo es una característica muy común de los tejidos neoplásicos y representa un problema importante en el análisis del líquido amniótico.

Este análisis cromosómico es un proceso [sistemático](#). Para realizarlo sigue los pasos que se indican a continuación.

1. Localiza la metafase que vas a estudiar con el objetivo de 10x.
2. Enfoca la metafase con el objetivo de 100x, colócala en el centro del campo de observación del microscopio y anota la referencia de su posición en la hoja de trabajo.
3. Comienza el análisis realizando el recuento de los cromosomas. Al principio te costará un poco. Para ayudarte en el análisis subdivide mentalmente la metafase en dos o tres partes. Realiza el recuento por lo menos dos veces. Si el resultado no coincide, cuéntalos una vez más.
4. Una vez que ya sabes el número de cromosomas de tu metafase continúa el análisis de la siguiente manera:
 - a. Localiza los cromosomas del grupo A: Es fácil, son los 6 de mayor tamaño. Emparéjalos mentalmente de dos en dos.
 - b. Localiza los cromosomas del grupo B: Son cuatro cromosomas submetacéntricos grandes. Recuerda comparar el tamaño de los brazos corto y largo.
 - c. Una vez localizados los cromosomas más grandes de la metafase cambia ahora a los más pequeños. Localiza los cromosomas del grupo G.

Recuerda que un varón tendrá 5 cromosomas del grupo G, una mujer tendrá 4.

- d. Sigue con los siguientes más pequeños, metacéntricos, tienen el aspecto de pequeñas cruces, son los cromosomas del grupo F.
- e. Busca ahora los cromosomas del grupo D, acrocéntricos grandes. Cuidado, estos cromosomas a veces pueden llevar satélites que pueden confundirse con un brazo p, observa la intensidad de la tinción, suele ser diferente.
- f. Los cromosomas del grupo E serán aquellos 6 cromosomas que sean más grandes que los F pero más pequeños que los D.
- g. Por último, todos los cromosomas restantes pertenecerán al grupo C.

Recuerda que si la metafase pertenece a una mujer, tendrá 16 cromosomas del grupo C. Por el contrario si la metafase pertenece a un varón, el número de cromosomas del grupo C será de 15.

5.2.1.- Análisis cromosómico de casos normales.

A continuación vamos a realizar el análisis cromosómico de las metafases de las imágenes paso a paso.

Metafases teñidas con Giemsa para análisis cromosómico

Caso 1



Caso 2



Recomendación

Aunque la labor del técnico es realizar el análisis mirando la preparación al microscopio, es recomendable, al principio, que cojas un papel y un lápiz, copies la metafase en el papel y realices el análisis en él. De esta manera irás familiarizándote con la morfología de los cromosomas, su tamaño y la posición del centrómero.

Debes conocer

- En esta presentación se describe la manera de realizar el análisis de la metafase del caso nº 1 al microscopio. Se analiza la morfología de cada uno de los cromosomas y se les asigna un grupo. Sigue los pasos del análisis. Al principio puede resultarte difícil pero ya verás cómo poco a poco consigues reconocer a qué

grupo pertenecen todos los cromosomas.

[Resumen textual alternativo](#)

- En esta presentación se describe la manera de realizar el análisis de la metafase del caso nº 2 al microscopio. Se analiza la morfología de cada uno de los cromosomas y se les asigna un grupo.

[Resumen textual alternativo](#)

5.3.- Análisis cromosómico de metafases con bandas G.

Caso práctico

Una vez que Carlos y Susana han aprendido a realizar los estudios cromosómicos en tinción sólida, el siguiente paso es estudiar las metafases con bandas. Susana ya ha tratado con tripsina sus extensiones y ha obtenido unas bandas estupendas. Marta le felicita.

—La primera vez lo normal es pasarse con la tripsina y "quemar" los cromosomas, pero tú has ajustado el tiempo perfectamente —comenta Marta.

Marta les explica ahora cómo conseguir identificar los cromosomas de una metafase.

Uno de las labores más difíciles de los estudios citogenéticos es el análisis de los patrones cromosómicos de las bandas que adquieren los cromosomas cuando se ponen en contacto con tripsina diluida. La identificación de los cromosomas es una tarea que requiere experiencia, y mucha paciencia. Al principio todos los cromosomas parecen iguales. Existen unos esquemas de cada cromosoma con el patrón de bandas característico de cada par que nos pueden ayudar en la identificación. Se les conoce con el nombre de Idiogramas.

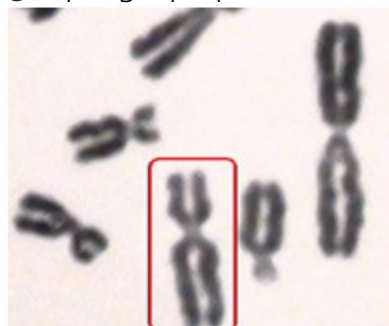


Un idiograma es un mapa cromosómico. La representación esquemática del tamaño, forma y patrón de bandas de cada uno de los cromosomas que forman parte todo el cariotipo. Los cromosomas se sitúan alineados por el centrómero, y con el brazo largo siempre hacia abajo.

El número de bandas que se forman en el cromosoma tras el tratamiento con la tripsina depende de varios factores. Uno de los más importantes es la condensación de la cromatina. Si los cromosomas están muy condensados (son cortos) el número de bandas que se podrán distinguir en ellos será bajo. Si por el contrario los cromosomas son alargados presentarán un mayor número de bandas. Al principio la presencia de muchas bandas en los cromosomas hace que su identificación sea más difícil, pero es fundamental para poder delimitar las regiones implicadas en una [alteración estructural](#). Más adelante aprenderás a identificarlas.

Autoevaluación

¿A qué grupo pertenece el cromosoma señalado en esta imagen?



- ☐ A.
- ☐ B.
- ☐ C.
- ☐ D.

No es correcto. Los cromosomas del grupo A son los más grandes. El cromosoma situado externamente, a su derecha es del grupo A.

No es correcto. El brazo largo de los cromosomas del grupo B tiene 3 veces la longitud del brazo corto. Esta regla no se cumple para este cromosoma.

Efectivamente es correcto. Este cromosoma pertenece al grupo C.

No es correcto, los cromosomas del grupo D son acrocéntricos, tienen un brazo corto muy pequeño. El cromosoma situado a su derecha pertenece al grupo D.

Solución

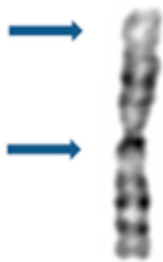
1. Incorrecto
2. Incorrecto
3. Opción correcta
4. Incorrecto

5.3.1.- Identificación de cromosomas del grupo A.

A continuación vamos a dar una serie de "pistas" para poder reconocer cada uno de los cromosomas del cariotipo. Presta mucha atención a las regiones señaladas por las flechas, te ayudarán mucho en la identificación.

Los cromosomas del par 1: Se caracterizan por ser los cromosomas más grandes. Son metacéntricos, y tienen el extremo del brazo p terminado en una zona clara. Poseen también un centrómero muy marcado (igual que los pares 16, 19 y 21).

Cromosoma 1



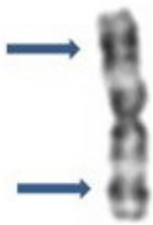
Cromosomas del par 2: Son grandes, submetacéntricos y los extremos de ambos brazos terminan en una banda oscura. El centrómero no está marcado y a ambos lados del mismo hay una región más clara.

Cromosoma 2



Cromosomas del grupo 3: cromosomas metacéntricos, más pequeños que el par 1. Tienen un patrón de bandeado fácil de reconocer, con regiones oscuras a ambos lados del centrómero.

Cromosoma 3



Debes conocer

Con los datos de que dispones hasta el momento intenta emparejar los cromosomas sueltos con los de la tabla, intentando que las bandas coincidan.



[Resumen textual alternativo](#)

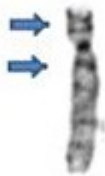
5.3.2.- Identificación de cromosomas de los grupos B y G.

Cromosomas del grupo B:

Cromosoma 4: En el brazo corto "p" la mayor parte de las veces se puede distinguir 2 bandas. En la región más cercana al centrómero del brazo "q", una banda oscura.

Cromosoma 5: En el brazo corto "p", una banda claramente diferenciada. El brazo largo del cromosoma tiene una banda ancha oscura en posición central.

Cromosoma 4



Cromosoma 5



Cromosomas del grupo G:

Cromosoma 21: Se le reconoce por la presencia de una banda oscura justo debajo del centrómero.

Cromosoma 22: No tiene esa banda oscura debajo del centrómero y presenta una banda en mitad del brazo q.

Cromosoma Y: Este cromosoma suele ser un poco más grande que los otros del grupo y acaba en una banda ancha oscura.

Cromosoma 21



Cromosoma Y



Cromosoma 22



Debes conocer

Analiza las bandas de cada uno de los cromosomas sueltos y emparejalos con sus homólogos en el lugar que les corresponde en la tabla.



[Resumen textual alternativo](#)

Analiza las bandas de cada uno de los cromosomas sueltos y emparejalos con sus homólogos en el lugar que les corresponde en la tabla.



[Resumen textual alternativo](#)

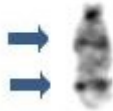
5.3.3.- Identificación de cromosomas de los grupos D, F y E.

Cromosomas del grupo D.

Cromosoma 15



Cromosoma 14



Cromosoma 13



Cromosoma 13: Es el de mayor tamaño del grupo, presenta varias bandas oscuras en su parte distal.

Cromosoma 14: Presenta dos bandas oscuras separadas entre sí por una zona más clara. Acaba en una zona clara.

Cromosoma 15: Presenta una banda oscura hacia la mitad del brazo largo (quedaría en medio de las dos bandas del cromosoma 14). La mitad proximal del brazo (la zona que está más cerca del centrómero) aparece más teñida que la mitad distal (la zona más alejada del centrómero). Es el más pequeño de los cromosomas D.

Cromosomas del grupo F: Pares 19 y 20.

Cromosoma 19



Cromosoma 20



Cromosoma 19: No presenta ninguna banda en ninguno de los brazos a esta resolución. Posee un centrómero marcado.

Cromosoma 20: Presenta una banda en el brazo corto.

Cromosomas del grupo E: Tamaño intermedio entre los D y los F.

Cromosoma 16



Cromosoma 17



Cromosoma 18



Cromosoma 16: Submetacéntrico, el más grande de los seis. Presenta un centrómero muy marcado.

Cromosoma 17: Presenta una banda oscura en la porción distal del brazo largo.

Cromosoma 18: Tiene el brazo corto mucho más pequeño que los otros y después del centrómero una zona más oscura.

Debes conocer

Analiza las bandas de cada uno de los cromosomas sueltos y emparéjalos con sus homólogos en el lugar que les corresponde en la tabla.



[Resumen textual alternativo](#)

5.3.4.- Identificación de cromosomas del grupo C.

Cromosoma 6: Es grande y submetacéntrico. Presenta una banda clara similar a un "agujero" en el brazo corto.

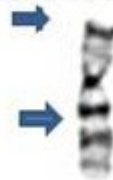
Cromosoma 7: Grande. Tiene boina y camiseta de rayas.

Cromosoma X: Tiene un tamaño similar a los anteriores, presenta dos bandas muy marcadas [equidistantes](#) del centrómero.

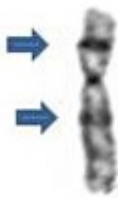
Cromosoma 6



Cromosoma 7



Cromosoma X



Cromosoma 8



Cromosoma 9

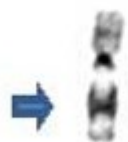


Cromosomas 8 y 9. Son los más difíciles de distinguir. El cromosoma 8 es un poco más grande, presenta una banda oscura marcada en la porción distal del brazo largo. El cromosoma 9, en el brazo corto una banda muy marcada en la zona central, y dos bandas muy nítidas en el brazo largo.

Cromosoma 10



Cromosoma 11



Cromosoma 12



Cromosoma 10: Presenta tres bandas marcadas en el brazo largo.

Cromosoma 11: Tiene más brazo corto que el 12. La banda del brazo largo es más marcada. Hay una mayor distancia desde el centrómero al comienzo de esta banda en el brazo largo.

Cromosoma 12: Es más alargado. Recuerda a un cromosoma 5 en pequeño.

Debes conocer

Analiza las bandas de cada uno de los cromosomas sueltos y emparéjalos con sus homólogos en el lugar que les corresponde en la tabla.



[Resumen textual alternativo](#)

5.3.5.- Análisis completo de una metafase con bandas G.

Ejercicio resuelto

Analiza los cromosomas de la parte inferior de la imagen y empareja los con sus homólogos en el cariotipo superior.

Mostrar retroalimentación

[Resumen textual alternativo](#)

Para saber más

En este enlace podrás realizar un cariotipo de una metafase en la que los cromosomas presentan un número de bandas mayor. Recuerda las referencias aprendidas e intenta completarla.

[Actividad de cariotipado. Resumen textual alternativo.](#)

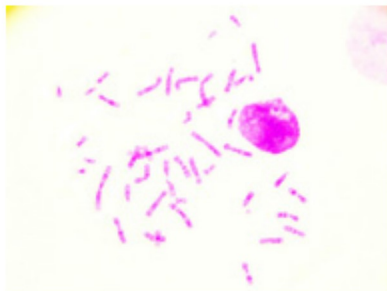
5.3.6.- Análisis directo en el microscopio.

Si has realizado todas las actividades, propuestas hasta ahora, con éxito, es el momento de analizar una metafase al microscopio como harás rutinariamente en el laboratorio. En este caso para hacerlo más sencillo solo deberás identificar la posición de algunos de los cromosomas.

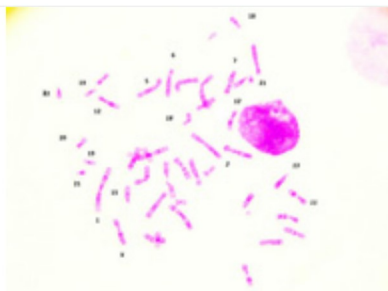
Ejercicio resuelto

Esta metafase pertenece a una mujer. Localiza en la metafase la posición de los siguientes cromosomas.

- 1, 2 y 3;
- 21 y 22.
- 6, 7, X 11 y 12.
- 13, 14 y 15.



Mostrar retroalimentación



¿Cuál es el último paso del análisis?

Una vez analizada la metafase se indica la fórmula cromosómica, una anotación en la que se hace constar el número de cromosomas y los cromosomas sexuales de la célula estudiada, separando ambos datos dos mediante una coma.

Así una metafase cuya fórmula sea 46, XX corresponderá a una mujer normal. Una metafase cuya fórmula sea 46, XY corresponderá a un hombre que no presenta ninguna alteración en sus cromosomas.

En el caso de que la metafase estudiada presentara alguna alteración habría que indicarla. Conocerás las reglas para hacerlo correctamente un poco más adelante, cuando tratemos el tema de las alteraciones cromosómicas.

Autoevaluación

Identifica el cromosoma que aparece en la imagen y rellena el hueco que falta al final de la frase (Indica el número del cromosoma).

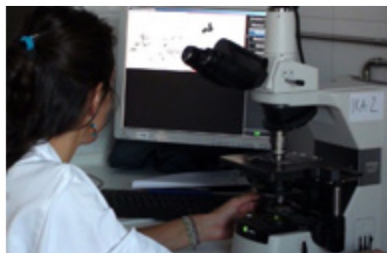


Este cromosoma pertenece al par número

Enviar

5.4.- Cariotipado automático.

Caso práctico



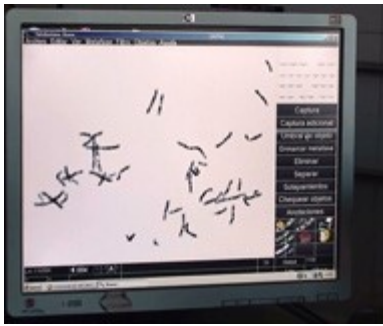
Carlos y Susana llevan una semana examinando preparaciones al microscopio y Marta considera que ya ha llegado el momento de mostrarles cómo se utilizan los cariotipadores. Coloca una preparación en el microscopio y les habla de las ventajas que suponen este tipo de aplicaciones informáticas.

—Así que todo lo que hemos aprendido sobre la identificación de los cromosomas en realidad no hacía falta. ¡Con todo el trabajo que nos ha costado! —exclama Carlos.

Susana se ríe, no dice nada aunque en realidad piensa lo mismo.

—Bueno, en realidad no es exactamente así. El cariotipador ayuda mucho pero no se puede utilizar sin saber cómo identificar los cromosomas. Debe de ser manejado con personal con experiencia que supervise y corrija cuando haga falta el trabajo realizado por el aparato —explica Marta.

Inmediatamente después, Marta les demuestra cómo se utiliza un aparato de estas características.



Actualmente existen aplicaciones informáticas que realizan el cariotipo automáticamente.

En lugar de una cámara fotográfica acoplada al microscopio se utiliza una cámara de vídeo. Esta aplicación ordena los cromosomas de una metafase atendiendo a criterios similares a los que has utilizado tú para decidir que cromosoma era cada uno de los analizados: Su tamaño y el patrón de bandas.

Estos sistemas ahorran mucho tiempo en el análisis pero aun así necesitan del trabajo de personal experimentado que supervise la colocación de los cromosomas que ha realizado el aparato y corrija los errores que se hayan producido.

Debes conocer

Las aplicaciones informáticas representan una gran ayuda a la hora de realizar un cariotipo. En la siguiente presentación podrás ver la secuencia de pasos que se realizan al cariotipar utilizando la [aplicación informática](#) de Metasystem –Ikaros.

[Resumen textual alternativo](#)

En este vídeo podrás ver la secuencia la utilización de la aplicación informática Metasystem –Izaros mientras se realiza un cariotipo.



[Resumen textual alternativo](#)

Para saber más

En este enlace puedes ver una presentación que explica las operaciones que puedes realizar con un cariotipador automático cuando la metafase que estás analizando presenta los cromosomas unidos, cruzados o el patrón de bandas obtenido no es el óptimo.

[Resumen textual alternativo](#)

6.- Aplicaciones de los estudios citogenéticos.

Caso práctico



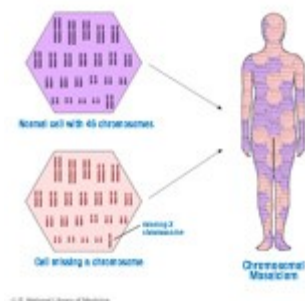
Ángela la médico que lleva la consulta de genética clínica visita el laboratorio para consultar el resultado de un cariotipo y ve a Susana y a Carlos analizando juntos una metafase con ayuda del cariotipador. Los saluda y estos le comentan que creen que la metafase que están estudiando no es normal, aunque tiene 46 cromosomas y en el análisis de tinción sólida no observaron ningún signo de alteración, el patrón de bandas correspondiente al cromosoma 16 no es igual en los dos cromosomas.

Ángela les pregunta si han comparado los patrones de bandas con el idiograma y ellos le responden que sí y que esa es la razón por la creen que uno de los cromosomas 16 podría estar alterado. Hay una zona que no es igual en los dos cromosomas homólogos.

Ángela se da cuenta del gran interés que ambos tienen en todo lo relacionado con la citogenética y aprovecha la ocasión para invitarles a unas sesiones que organiza esta semana con otros departamentos del hospital en las que se va a hablar de la importancia de la citogenética en el diagnóstico prenatal y en el diagnóstico del cáncer.

Un ginecólogo y una patóloga pasarán por el Servicio para hablar estos temas. Ellos aceptan encantados, aunque tienen miedo de no entender nada.

—No creo que vaya a suceder eso, tenéis una buena base, suficiente para poder seguir las charlas sin problema, además podéis preguntar todas las dudas que os vayan surgiendo, estáis aquí para aprender —comenta Ángela y aprovecha la ocasión para hablarles sobre los tipos de anomalías cromosómicas observadas con mayor frecuencia en los análisis citogenéticos.



El estudio de la morfología de los cromosomas, teñidos fundamentalmente con bandas G (Tripsina-Giemsa), permite detectar en un único experimento, tanto alteraciones en el número de cromosomas de una metafase numéricas, como en su estructura.

¿Cuáles son las principales alteraciones que podemos encontrarnos al analizar las muestras que llegan a un laboratorio de citogenética? ¿Cómo se reconocen? ¿Cómo se informan? De todos estos aspectos vamos a hablar en esta parte final de la unidad de trabajo.

El análisis cromosómico en muestras de sangre periférica puede realizarse por diversas indicaciones:

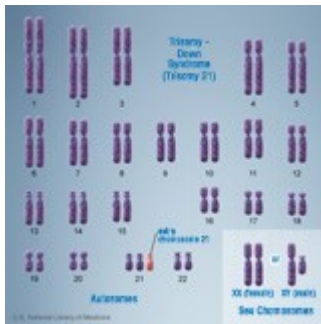
- Anomalías congénitas múltiples en un paciente.
- Parejas sin hijos o con muchos abortos espontáneos.
- Personas con genitales ambiguos, infértiles o con amenorrea.
- Pacientes con historia familiar de cromosomopatía.
- Pacientes con retraso mental o del desarrollo.

Las anomalías cromosómicas detectables mediante cariotipo pueden ser dos tipos:

- Alteraciones numéricas: Cambios en el número de cromosomas de un individuo.
- Alteraciones estructurales: Cambios en la ordenación de los genes dentro de un cromosoma, se añaden, eliminan o reordenan partes sustanciales de uno o más cromosomas.

Es importante excluir en las muestras la posibilidad de mosaicismo, la presencia de dos dotaciones cromosómicas diferentes en un mismo individuo.

6.1.- Determinación de anomalías cromosómicas numéricas.



¿Qué tipos de alteraciones relacionadas con el número de cromosomas son las más frecuentes?

La mayoría de las alteraciones numéricas que se producen en las células son incompatibles con la vida y acaban de manera espontánea. Algunas de ellas solo las podremos observar en tumores y restos abortivos. Este es el caso de las Poliploidías, alteraciones caracterizadas por un número total de cromosomas que es múltiplo exacto del [número haploide](#) (n). Para describirlas se utilizan términos como triploide ($3n = 69$ cromosomas), tetraploide ($4n = 92$ cromosomas) etc.

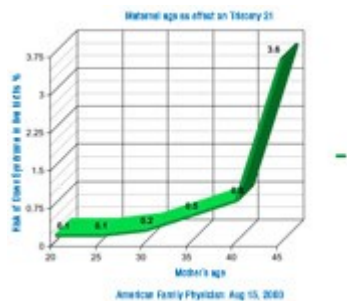
Otro tipo de alteraciones numéricas de los cromosomas son las Aneuploidías. Se producen cuando un par de cromosomas no se separa adecuadamente durante la mitosis o la [meiosis](#) y se forman células hijas que tienen un cromosoma de más o de menos.

Las aneuploidías más frecuentes son las Trisomías y entre ellas las más frecuentes en nacidos vivos son las asociadas a los autosomas 13, 18, y 21 y las de los cromosomas sexuales 47XXX (denominado como triple X) y 47XYY.

A continuación se describen algunas características de las alteraciones autosómicas más frecuentes:

- Síndrome de Down: Caracterizado a nivel genético por la trisomía del cromosoma 21. Es la trisomía más frecuente. Se produce en 1 por cada 700 nacimientos. Los individuos Down tienen una apariencia facial característica, retraso mental,

enfermedad cardíaca congénita y un riesgo alto de infecciones recurrentes y de padecer leucemia aguda. El 95 % de los casos son debidos a la no [disyunción](#) del cromosoma 21 durante la meiosis en la formación de los óvulos o espermatozoides. Esta no disyunción aumenta con la edad de la madre. Como se puede observar en la imagen en mujeres mayores de 35 años el riesgo de tener un hijo con síndrome de Down aumenta considerablemente.



- Trisomía del par 18: Síndrome de Edwards. Ocurre aproximadamente en el 1 por 1000 de los nacidos vivos. La mayor parte de los casos son debidos a la no disyunción de los cromosomas y la [incidencia](#) de forma paralela a la edad materna. En general los afectados mueren a las pocas semanas o meses de nacer pero ocasionalmente pueden vivir varios años. Existen una gran cantidad de defectos o malformaciones asociados a este síndrome, como una apariencia facial característica (con [microcefalia](#), [labio leporino](#) y orejas de implantación baja) y malformaciones en las manos ([polidactilia](#)), pies, sistema gastrointestinal y renal.
- Trisomía del cromosoma 13. Síndrome de Patau. Incidencia 0,07 por 1000 nacidos vivos. Causado al igual que los anteriores por la no disyunción meiótica de los cromosomas. Los individuos afectos mueren a las pocas horas o semanas del nacimiento. Rasgos distintivos: Retraso mental severo, anomalías estructurales del cerebro, microcefalia, [holoprosencefalia](#), labio leporino, paladar hendido, polidactilia, malformaciones cardíacas, renales y [oftálmicas](#).



En cuanto a las alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales, son bastante comunes y causan defectos menos severos que las autosómicas. Se detectan a menudo accidentalmente en una amniocentesis o durante un estudio por infertilidad. Las más

frecuentes son:

- Síndrome de Turner 45, X0: Incidencia 1 de cada 2500 niñas. Es la única monosomía que llega a la vida. Este trastorno inhibe el desarrollo sexual y causa infertilidad, Algunos rasgos característicos son: talla baja, implantación baja del pelo, cuello engrosado, desarrollo ósea anormal etc.
- Síndrome de Klinefelter: 47, XXY. Incidencia 1 por 500 o 1 por 1000. Afecta a los hombres y causa [hipogonadismo](#). Son altos con forma femenina del cuerpo y ginecomastia. La mayoría son estériles. Pueden presentar cierto grado de retraso mental.

Para saber más

En esta presentación puedes repasar los pasos de la realización de un cariotipo así como los cariotipos característicos de los síndromes de Down, Turner y Klinefelter.



[Resumen textual alternativo](#)

6.2.- Determinación de anomalías cromosómicas estructurales. (I).

¿Conoces algún tipo de alteración estructural en los cromosomas?

Términos como deleción, inversión, translocación, son comunes en un laboratorio de citogenética y se utilizan para designar los diferentes tipos de alteraciones en la organización o estructura del cromosoma.

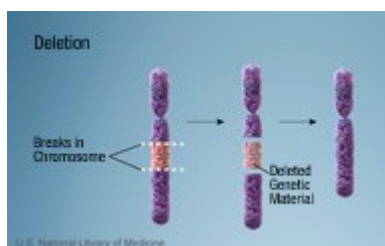
¿Qué caracteriza a una alteración estructural? Las alteraciones estructurales poseen las siguientes características:

- Implican siempre la rotura de los cromosomas y su reorganización posterior. Algunas veces la rotura es doble, en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes.
- Todas tienen consecuencias en la meiosis, por lo que podrían dar lugar a cariotipos anormales en la siguiente generación.

Las alteraciones estructurales más frecuentes son las deleciones, inversiones, duplicaciones y translocaciones.

Deleciones: Pueden producirse en cualquier cromosoma. Las deleciones de gran tamaño son generalmente incompatibles con la vida. Pueden ser de diferentes tipos:

- Terminales. También se les llama deficiencias. En ellas se pierden fragmentos de los extremos de los cromosomas.
- Intersticiales. Se pierden fragmentos intercalares de los cromosomas. Como puedes ver en la imagen, exigen la ruptura del cromosoma en dos puntos.



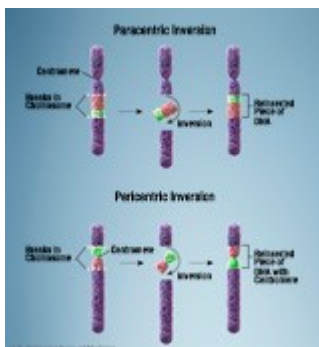
Algunas deleciones que podemos encontrarnos en nacidos vivos son: El Síndrome de

maullido de gato (Síndrome de Cri-du-chat) causado por una deleción terminal en el brazo corto del cromosoma 5 y el síndrome de Wolf-Hirschhorn causado por una deleción en el brazo corto del cromosoma 4. Ambas se producen con una frecuencia de 1 en 50.000 nacimientos. Los afectados pueden sobrevivir hasta la adolescencia o en algunos casos vida adulta.

En algunos casos las deleciones traen como consecuencia la formación de anillos. Un anillo se produce al producirse una doble rotura en el mismo cromosoma y la posterior unión de los extremos de rotura. Es una detección fácil de realizar en un cariotipo. En la imagen puedes observar el aspecto que presenta un anillo.



Inversiones: Una inversión es un cambio de sentido de un segmento dentro del cromosoma. Requiere la rotura del cromosoma en dos puntos y la rotación de 180 grados del segmento producido. Existen diferentes tipos:



- Inversión paracéntrica: Cuando el segmento afectado no implica al centrómero. No causa grandes cambios en la morfología cromosómica.
- Inversión pericéntrica: Afecta a un segmento cromosómico que comprende el centrómero.

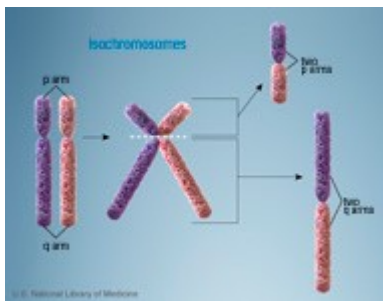
Al microscopio las inversiones se verán como dos cromosomas homólogos de diferente tamaño y con el patrón de bandas alterado. Si la inversión no ha supuesto ni pérdida ni

ganancia de material genético y no ha afectado a ningún gen, puede que el individuo que la lleve no tenga ninguna manifestación fenotípica.

Duplicaciones: Surgen por errores en la replicación del ADN, cuando un segmento cromosómico se replica más de una vez.

Un tipo especial de duplicaciones fácilmente observable en el cariotipo son los isocromosomas. Se forman cuando el cromosoma se divide de forma transversal por el centrómero, dando lugar a cromosomas que tienen un brazo deleciónado y el otro duplicado. Estos cromosomas carecen de homólogo.

En los nacidos vivos podemos encontrar isocromosomas en casos de Síndrome de Turner, en los que el isocromosoma formado incluye el brazo largo del cromosoma X. La mayoría de las veces la formación de isocromosomas da lugar a abortos espontáneos.

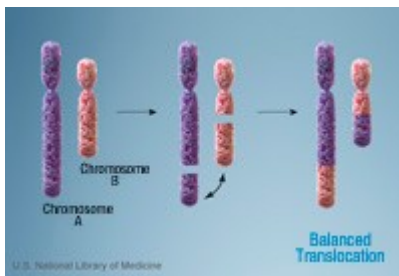


6.2.1.- Determinación de anomalías cromosómicas estructurales. (II).

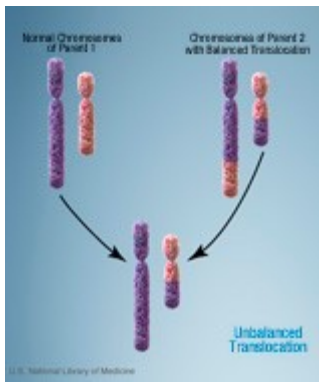
Otro tipo de anomalías estructurales que puedes encontrarte cuando estés estudiando un cariotipo son la translocaciones.

Se denomina translocación al Intercambio de material entre dos o más cromosomas. Hay distintos tipos:

- Simples: En este tipo de translocación un segmento terminal de un cromosoma se puede romper uniéndose al extremo de otro cromosoma no homólogo.
- Recíprocas. Translocación en la que hay dos cromosomas implicados que intercambian segmentos.



Pueden ser Equilibradas cuando en el intercambio no se produce ni pérdida ni ganancia de material o Desequilibradas, cuando se produce como consecuencia de este intercambio una pérdida o ganancia de material genético. Las translocaciones desequilibradas pueden ser causa de síndromes con graves malformaciones o causar abortos espontáneos. Los portadores de una translocación equilibrada tienen riesgo de tener hijos portadores de un desequilibrio en sus cromosomas. Este hecho viene explicado en la imagen.



- Robertsonianas: Se produce cuando dos cromosomas acrocéntricos se rompen por el centrómero o por un lugar muy cerca de él y se fusionan. Una de las más frecuentes es la que implica a los cromosomas 13 y 14. Es la que puedes apreciar en la imagen.



A los cromosomas resultantes de una translocación se les denomina derivados (der). En el siguiente apartado conocerás los términos utilizados para describir las alteraciones cromosómicas.

Autoevaluación

Relaciona los nombres de los Síndromes con las alteraciones cromosómicas con las que se les asocia.

Ejercicio de relacionar

Síndrome	Relación	Alteración cromosómica
Cri- du- Chat.	☐	1. Trisomía 18.
Down.	☐	2. Delección del brazo corto del cromosoma 5.
Edwards.	☐	3. Trisomía 13.
Patau.	☐	4. Trisomía 21.

[Enviar](#)

El síndrome de Cri-du-chat está asociado a una delección del brazo corto del cromosoma 5; el síndrome de Down se asocia a una trisomía 21 en el 95 % de los casos; la trisomía del cromosoma 18 es la causante del síndrome de Edwards y el Síndrome de Patau se asocia a una trisomía del cromosoma 13.

6.2.2.- Nomenclatura citogenética.

Susana aprovecha que Ángela tiene un rato libre y le pregunta sobre la manera en la que ella informa las alteraciones que se observan en los cariotipos. ¿Qué son todas esas anotaciones y signos que aparecen al lado de la imagen del cariotipo? Ángela continúa explicando:

Siempre cuando se termina un estudio cromosómico es necesario expresar su resultado y debe de hacerse de alguna manera que sea entendible por toda la comunidad internacional. Existen una serie de reglas para designar las alteraciones encontradas en los estudios citogenéticos. Todas ellas están recogidas en unos informes ISCN.

Existe una notación taquigráfica para las anomalías genéticas.

Término	Significado	Ejemplo
del	Deleción	45,X,del(1)(p)
dup	Duplicación	46,XX,dup(11)(p)
i	Isocromosoma	46,X,i(2p)
inv	Inversión	46,XY,inv(2)(p)
r	Arreglo (ring)	46,XX,r(21)
tr	Translocación	46,XX,t(14;21)(p11;p11)
ter	Terminal o extremo	46,XX,pter
/	Mosaico	46,XY/46,XX
+	Delante del número de un cromosoma indica ganancia de todo el cromosoma	47,XX,+21
-	Delante del número de un cromosoma indica ganancia o pérdida de una parte	46,XY,-18p

Vamos a comentar algunos aspectos sencillos que pueden resultarte útiles cuando leas informes relacionados con alteraciones.

Las alteraciones numéricas se informan colocando los signos más (+) o menos (-), separados por una coma y seguidos del número del cromosoma implicado, después de indicar el número de cromosomas y el sexo en la fórmula cromosómica.

En un estudio a tinción normal: Indicaríamos en la fórmula el número de cromosomas, el sexo y el grupo del cromosoma que tiene en exceso o en defecto. Por ejemplo un cariotipo perteneciente a un paciente varón con Síndrome de Down en un estudio a tinción normal se informaría: 47, XY, +G. Mediante la técnica de bandeado se comprobaría que ese G de más es un cromosoma 21. De la misma manera una mujer con síndrome de Turner se informaría en un estudio a tinción normal como: 45, XO, -C. Posteriormente se comprobaría realizando las bandas si el C que falta es el cromosoma X.

En un estudio con bandas: Un Síndrome de Down vendría descrito por la anotación 47, XX, + 21, si se trata de una mujer o 47, XY, +21 si se trata de un varón. El mismo criterio se utiliza para designar una trisomía 13 o 18. Siendo respectivamente: 47, XX,+13 o 47, XY, +18 según se trate de una mujer con trisomía 13 o un varón con trisomía 18 respectivamente.

¿Cómo se informa una alteración estructural?

En el estudio a tinción normal veríamos cromosomas desperejados y señalaríamos la presencia de una posible alteración.

En el estudio a bandas: No basta solo con indicar qué tipo de alteración estructural está presente, se debe delimitar su extensión, utilizando el patrón de bandeo y por tanto las regiones descritas en el idiograma. En estos casos además de la abreviatura de la alteración se coloca el cromosoma implicado entre paréntesis. Si hay dos cromosomas implicados, por ejemplo en una traslocación se separan mediante un punto y coma. Después tiene que venir indicada la región de cada cromosoma implicada en la alteración.

Si examinamos con detenimiento un idiograma nos damos cuenta de que cada uno de los brazos de los cromosomas está dividido en regiones, numeradas teniendo en cuenta su distancia del centrómero y las bandas que en esa región aparecen. Así la región 17 a12, estará más cerca del centrómero que la 17q13.

Ejercicio resuelto

Interpreta las siguientes fórmulas cromosómicas:

- a. 46, XX, del (14) (q23).
- b. 46, XY, 5p-.
- c. 46, XX, t (9;22) (q34;q11).

Mostrar retroalimentación

- a. Mujer con 46 cromosomas, que presenta una delección en el cromosoma 14, en el brazo largo (q) en la región 23.

- b. Hombre, con 46 cromosomas, que presenta una delección en el brazo corto del cromosoma 5.
- c. Mujer con 46 cromosomas que presenta una translocación entre los cromosomas 9 y 22. Los puntos de rotura están situados en el brazo largo (q) del cromosoma 9, región 34 y en el brazo largo (q) del cromosoma 22, en la región 11.

6.3.- Diagnóstico prenatal.

Caso práctico

Ricardo, residente de último año del Servicio de Ginecología, acude a Genética para dar una charla sobre las características del diagnóstico prenatal. Carlos y Susana que han sido invitados a la sesión escuchan atentamente.

El término diagnóstico prenatal se refiere al diagnóstico de enfermedades genéticas realizado durante el embarazo. La información proporcionada por este tipo de pruebas puede guiar a la familia a la hora de tomar decisiones relacionadas con la interrupción del embarazo o la planificación de la ayuda médica o psicológica apropiada. En este tipo de diagnóstico los tiempos (semanas de embarazo), la seguridad y la exactitud son elementos críticos.



Muestras de líquido amniótico.

Existen varios tipos de pruebas que forman parte de este diagnóstico:

- Procedimientos no invasivos como la ecografía, que identifica alrededor de 3000 malformaciones con un riesgo bajo de aborto (1 %) o el screening de la sangre materna buscando indicadores útiles como la [alfa-fetoproteína](#) (AFP), la [gonadotropina coriónica](#) (HCG), [estriol no conjugado](#) o proteínas como PAPP-A, que suelen estar alterados en casos de síndrome de Down y síndrome de Edwards entre otros. Este tipo de análisis forman parte de las pruebas de diagnóstico prenatal realizadas durante el

primer trimestre.

- Procedimientos invasivos, como la extracción de vellosidad corial o la realización de una amniocentesis, o una [cordocentesis](#). Estos procedimientos se emplean cuando el riesgo de que exista una alteración en el feto supera al riesgo de aborto debido al procedimiento. Entre las indicaciones de diagnóstico prenatal podemos destacar las siguientes:
 - Edad materna mayor de 35 al término del embarazo.
 - Hijos previos con una enfermedad de herencia cromosómica.
 - Ansiedad materna.
 - Marcadores séricos sugestivos de aneuploidia (alfa-fetoproteína, gonadotropina coriónica).
 - [Pliegue nucal](#) visto por ecografía.
 - Padres portadores de alguna alteración estructural.

Las técnicas de diagnóstico prenatal más utilizadas para estudios citogenéticos son:

- La extracción de vellosidades coriales. La vellosidad corial es un material que deriva directamente del feto. Su extracción se realiza mediante aspiración con un catéter a través del cérvix o de manera transabdominal, guiándose en ambos casos por ultrasonidos. Como las células del trofoblastos mantienen la capacidad de división, el cariotipo podría hacerse sin cultivo, pero éste mejora mucho los resultados. Tiene la ventaja de que se realiza temprano, durante el primer trimestre del embarazo, entre las 10 y 12 semanas de gestación, sin embargo las metafases obtenidas mediante este procedimiento no son de muy buena calidad. El riesgo de aborto por este procedimiento es del 2 %. Las principales indicaciones son estudios de ADN citogenéticos y moleculares.
- La amniocentesis consiste en la extracción de líquido amniótico insertando una aguja a través de la pared abdominal de la madre en la cavidad amniótica y en la extracción de entre 10 y 20 ml de líquido amniótico. Este procedimiento tiene un riesgo de aborto en torno al 0,5 %. Permite detectar anomalías cromosómicas, [defectos del tubo neural](#), enfermedades genéticas, errores metabólicos. Estudia marcadores como alfa-fetoproteína y [acetilcolinesterasa](#) en embarazos de riesgo.

Para saber más

En este vídeo podrás ver una animación sobre la forma en la que se realiza el procedimiento de amniocentesis, guiado por ultrasonidos.

[Resumen textual alternativo](#)

En este vídeo puedes ver una animación sobre el procedimiento empleado para la extracción de una vellosidad corial, guiada por ultrasonidos.

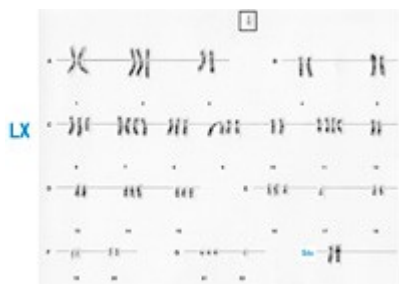
[Resumen textual alternativo](#)

6.4.- Citogenética y cáncer.

Caso práctico

Hoy es el último día de la rotación de Carlos y Susana por el laboratorio de citogenética. En las sesiones a las que Ángela les invitó hoy le toca el turno a Socorro, adjunta del Servicio de Anatomía Patológica que va a hablar sobre la utilidad de las técnicas de citogenética en el estudio del cáncer.

Hace ya mucho tiempo que se descubrió que las células cancerígenas presentan a menudo variaciones en el número y la estructura de sus cromosomas. Estas alteraciones encontradas en las células tumorales actúan como marcadores de enfermedad.



La imagen corresponde a un cariotipo de una línea tumoral. Se pueden apreciar varias alteraciones trisomías y tetrasomías de algunos cromosomas. Existe en esta célula un cromosoma cuyo patrón de bandas no se corresponde con ninguno de los cromosomas del cariotipo. A este cromosoma se le denomina cromosoma marcador.

La realización del cariotipo es útil sobre todo en el estudio de las neoplasias hematológicas, donde algunas alteraciones son específicas de diagnóstico y otras se pueden utilizar para hacer un pronóstico, seguimiento y monitorización de la enfermedad.

Un ejemplo de cromosoma marcador es el cromosoma Filadelfia. Sirve para realizar el diagnóstico de la mayor parte de los casos de leucemia mieloide crónica. Se forma como resultado de una translocación entre los cromosomas 9 y 22 puede encontrarse tanto en las células de la sangre como en las de la médula ósea. Este cromosoma está presente en el 90%

de los pacientes con LMC y su ausencia está relacionada con un peor pronóstico de la enfermedad. También puede verse en aproximadamente el 15 % de las leucemias linfocíticas crónicas. En este caso su presencia está relacionada con un mal pronóstico.

Otra neoplasia hematológica asociada a una alteración es el linfoma de Burkitt., está asociado a una translocación entre los cromosomas 8 y 14. De igual manera se han descrito alteraciones cromosómicas relacionadas con los principales tipos de leucemias agudas por lo que los estudios citogenéticos son una herramienta muy útil en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de estas patologías.

En las neoplasias no hematológicas la utilización de las técnicas de citogenética convencional es más restringida. En el caso de los tumores sólidos hay factores, que han frenado la incorporación del análisis citogenético convencional a la rutina diagnóstica. Son sobre todo obstáculos técnicos, dificultades para obtener metafases a partir de las muestras de los tumores, baja viabilidad celular debido a la necrosis de la muestra, contaminación microbiana y "contaminación" con células normales. Los estudios citogenéticos en tumores, se realizan actualmente empleando técnicas de citogenética molecular. Estas técnicas se tratarán en otra unidad de trabajo de este mismo módulo.

Anexo.- Licencias de recursos.

Licencias de recursos utilizados en la Unidad

Recurso (1)



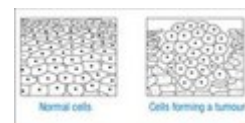
Datos del recurso (1)

Autoría: Katey Nicosia.

Licencia: CC By-nc-sa.

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/onegoodbumblebee/32919559/sizes//in/photostream>

Recurso (2)



Autoría: Mararie.

Licencia: CC-BY-sa.

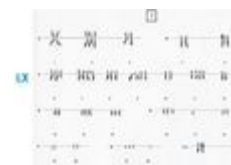
Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/mararie/3253476500/sizes/o/in/photostream/>



Autoría: Terpsichore.

Licencia: CC by-sa.

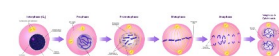
Procedencia: Montaje sobre [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:R\(20\)_-_ring_chromosome_20.PNG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:R(20)_-_ring_chromosome_20.PNG)



Autoría: Seanmichaelragan.

Licencia: CC By.

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/seanmichaelragan/5224385684/sizes>

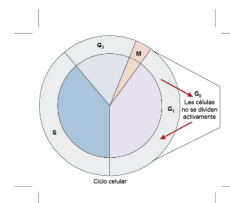
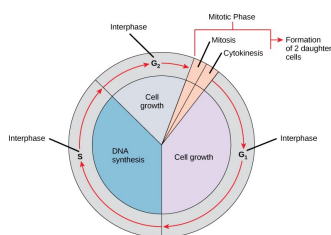


</o/in/photostream/>

Autoría: OpenStax

Licencia: Creative Commons Attribution License

Procedencia: Descarga sin costo el artículo original en <http://cnx.org/contents/185cbf87-c72e-48f5-b51e-f14f21b5eabd@9,85:52/The-Cell-Cycle>(Se abre en una ventana nueva)(Se abre en una ventana nueva).



Autoría: paurullan

Licencia: CC BY-NC-SA

Procedencia: <https://www.flickr.com/photos/paurullan/7139459643/in/photolist-bSTABM-Dwa6ZN-CAY2>