

Manual de iniciación a los cultivos celulares II: criopreservación y toxicidad de DMSO (BCA)

Recurso docente para prácticas de laboratorio - Biología Celular Avanzada (Universidad de Málaga)

Autoría	Dra. Elena González Muñoz (Profesora Titular de Universidad, Área de Biología Celular, Universidad de Málaga)
Asignatura	Biología Celular Avanzada (Grado en Biología, UMA)
Tipo de recurso	Manual docente / guía de prácticas (cultivo celular)
Versión	v1.0 2021-02-16
Uso	Recurso de apoyo a las prácticas de laboratorio. No sustituye los protocolos oficiales del laboratorio ni la formación en bioseguridad.
Licencia	Creative Commons CC BY-NC-SA 4.0
Cómo citar	González Muñoz, E. (2026). Manual de iniciación a los cultivos celulares II: criopreservación y toxicidad de DMSO (BCA). Universidad de Málaga. Recurso docente depositado en RIUMA.

Resumen

Este manual compila fundamentos, procedimientos y actividades de análisis de datos para la práctica correspondiente de cultivos celulares en la asignatura Biología Celular Avanzada. El documento está alineado con los contenidos y protocolos usados en el laboratorio docente.

Palabras clave: cultivo celular; asepsia; subcultivo; recuento; viabilidad; criopreservación; DMSO; cámara de Neubauer.

Historial de uso docente (declaración de la autora)

Este manual se corresponde con los materiales y procedimientos empleados como recurso de apoyo en el Campus Virtual (EVA UMA) de la asignatura Biología Celular Avanzada (BCA, Grado en Biología) en el periodo 2020/21–2025/26. El depósito en RIUMA se realiza con finalidad de acreditación institucional y preservación del recurso.

Índice

1. Objetivos y resultados de aprendizaje
2. Contexto y seguridad (bioseguridad y buenas prácticas)
3. Fundamentos teóricos
4. Materiales y reactivos (visión general)
5. Procedimiento de laboratorio (resumen operativo)
6. Registro de datos y cálculos
7. Resultados esperables y control de calidad
8. Problemas tipo y actividades de razonamiento
9. Preguntas de autoevaluación
10. Referencias (formato APA)

1. Objetivos y resultados de aprendizaje

- Comprender los fundamentos de la criopreservación y el papel de los crioprotectores permeables (p. ej., DMSO).
- Preparar suspensiones celulares para congelación y justificar parámetros críticos: concentración celular, % de suero y velocidad de enfriamiento.
- Describir un flujo de descongelación rápida, dilución/eliminación de DMSO y recuperación en cultivo.
- Diseñar cálculos de dilución y siembra para obtener una densidad celular controlada en placas.
- Analizar datos de viabilidad celular y estimar una métrica de toxicidad del DMSO (p. ej., LT50 en condiciones del ensayo docente).

2. Contexto y seguridad (bioseguridad y buenas prácticas)

La criopreservación implica manipulación de criotubos y, potencialmente, nitrógeno líquido. Se requiere protección adecuada (guantes criogénicos/pantalla facial según norma del laboratorio), y procedimientos seguros para evitar quemaduras por frío y exposición accidental. La técnica aséptica sigue siendo esencial.

3. Fundamentos teóricos

3.1. Daño por congelación y rol del DMSO

Durante la congelación, el agua intracelular puede formar cristales de hielo que dañan membranas y orgánulos. Los crioprotectores permeables como el DMSO reducen la formación de cristales y facilitan una deshidratación controlada. Sin embargo, el DMSO es citotóxico y su tiempo de exposición a temperatura ambiente debe minimizarse.

3.2. Parámetros críticos del proceso

- Enfriamiento controlado aproximado de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -80°C (p. ej., contenedor de congelación) y posterior almacenamiento en nitrógeno líquido (aprox. -196°C).
- Descongelación rápida a 37°C para reducir recristalización.
- Eliminación/dilución temprana del DMSO tras descongelación (cambio de medio y/o centrifugación según protocolo docente).

4. Materiales y reactivos (visión general)

- Medio de cultivo completo (DMEM + P/S 1X + 10% FBS).
- Medio crioprotector (según protocolo docente): medio con alto suero y DMSO para obtener 10% final en la suspensión congelada.
- Cámara de Neubauer y azul tripán (viabilidad).
- Centrifuga y tubos (cuando el protocolo incluye centrifugación para retirar DMSO).
- Contenedor de congelación de descenso controlado (p. ej., cámara de propanol) y acceso a almacenamiento en LN2 (según el laboratorio).

5. Procedimiento de laboratorio (resumen operativo)

El guion de la práctica 2 integra: (i) levantamiento de células y preparación de suspensión, (ii) subcultivo/dilución y siembra controlada, (iii) preparación de medio de congelación y exposición a DMSO (condición experimental) frente a control, y (iv) recuento/viabilidad en distintos tiempos para estimar la citotoxicidad. El detalle operativo se sigue en los protocolos oficiales entregados al alumnado.

5.1. Nota docente sobre el % de DMSO

En muchos protocolos docentes se prepara un “medio de congelación 2X” (p. ej., con 20% DMSO) para mezclarlo 1:1 con la suspensión celular y alcanzar 10% DMSO final. Esta lógica permite preparar condiciones reproducibles y minimizar el tiempo de exposición.

6. Registro de datos y cálculos

6.1. Diluciones para siembra controlada

Objetivo: sembrar un número definido de células por pocillo. Registrar concentración inicial (células/mL), volumen disponible y calcular el volumen necesario $V = N \text{ objetivo} / \text{concentración}$. Ajustar con medio hasta el volumen final de siembra por pocillo.

6.2. % viabilidad y curvas tiempo-respuesta

Registrar para cada condición (Control vs DMSO) y tiempo ($t=0$, $t=15$, $t=30$ min u otros según grupo): células vivas, muertas y % viabilidad. Representar viabilidad vs tiempo para estimar el tiempo de letalidad del 50% (LT50) en las condiciones del ensayo docente.

7. Resultados esperables y control de calidad

- Disminución de viabilidad con el tiempo de exposición a DMSO a temperatura ambiente (dependiente de línea celular).
- Mejor recuperación cuando la descongelación es rápida y se elimina/diluye el DMSO tempranamente.
- Recuentos consistentes entre duplicados; discrepancias sugieren grumos, mala carga de cámara o variabilidad por pipeteo.

8. Problema tipo y actividad de razonamiento: toxicidad de un compuesto (DMSO)

Ejemplo (planteamiento): En condición DMSO, la viabilidad cae de 90% ($t=0$) a 60% ($t=15$) y 35% ($t=30$). Estimar por interpolación lineal el LT50 (tiempo al 50% de viabilidad) y comparar con la condición control.

Solución orientativa: Identificar el intervalo donde cruza 50% (entre 15 y 30 min) e interpolar. Interpretar: mayor pendiente indica mayor citotoxicidad y exige minimizar exposición durante congelación/descongelación.

9. Preguntas de autoevaluación

- ¿Por qué se recomienda enfriamiento controlado y descongelación rápida?
- ¿Qué medidas reducen el tiempo de exposición a DMSO y por qué son críticas?
- ¿Cómo afecta la concentración celular por criotubo a la recuperación post-descongelación?
- ¿Qué limitaciones tiene estimar LT50 con pocos puntos temporales? ¿Cómo mejorarías el diseño experimental en docencia?

Referencias

American Type Culture Collection (ATCC). (s. f.). Animal Cell Culture Guide. ATCC. <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>

Thermo Fisher Scientific. (s. f.). Gibco Cell Culture Basics Handbook. Thermo Fisher Scientific.

World Health Organization. (2020). Laboratory biosafety manual (4th ed.). WHO.

OECD. (2009). Test No. 455: Performance-based test guideline for stably transfected transactivation in vitro assays (mycoplasma-free cells recommendation). OECD Publishing.

Flahaut, M., et al. (2024). Reassessing long-term cryopreservation strategies... Journal of Investigative Dermatology.