

# **CULTIVO DE CÉLULAS: PROS Y CONTRAS DE LAS SOLUCIONES TÉCNICAS EN LAS INCUBADORAS DE CO<sub>2</sub>**

---

**¿QUÉ PARÁMETROS DEBEN  
TENERSE EN CUENTA?**



## Introducción

El objetivo del cultivo de células es conseguir y preservar un buen crecimiento celular así como obtener una diferenciación correspondiente en función de la tarea. Para ello deben tenerse en cuenta gran variedad de parámetros y requisitos y aplicarse desde el punto de vista técnico.

Un elemento decisivo en el cultivo de células es la incubadora de CO<sub>2</sub> o la incubadora de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. La temperatura, la humedad, la concentración de CO<sub>2</sub> o de O<sub>2</sub> y el diseño del interior se consiguen por medio de diversas soluciones técnicas. Este libro blanco compara distintas soluciones disponibles en el mercado en cuanto a cuatro parámetros y el concepto de interior. Asegúrese de comparar los mismos parámetros.

Dado que los cultivos celulares y de tejidos no disponen de sistema inmunológico, la contaminación es un problema muy frecuente. En nuestro **libro blanco "Cultivo de células sin contaminación"** se muestran distintas soluciones y se abordan en detalle normas y conceptos de anticontaminación internacionales.

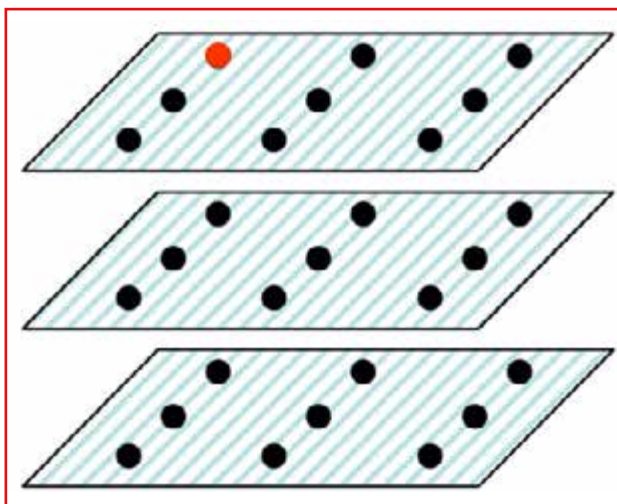
# Índice

1.	<b>Introducción</b> .....	2
2.	<b>Temperatura</b> .....	4-6
3.	<b>Humedad del aire y punto de rocío</b> .....	7-9
4.	<b>Concentración de CO<sub>2</sub></b> .....	10-12
5.	<b>Interior</b> .....	13
6.	<b>Esterilización:</b> la esterilidad necesaria para cada laboratorio .....	14-15
7.	<b>Calificación y validación:</b> con el apoyo de los fabricantes de incubadoras .....	16

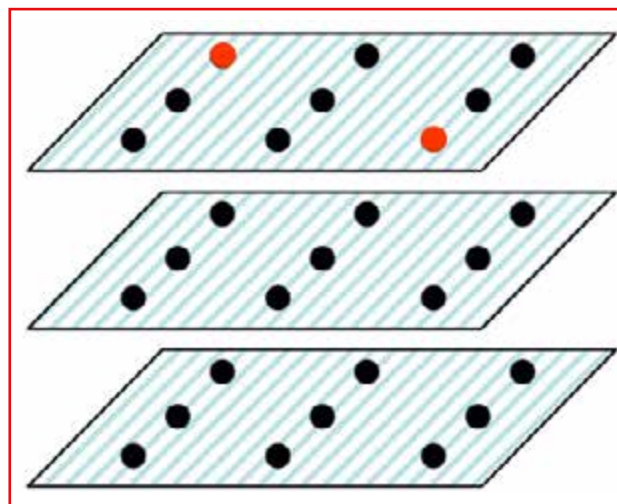
## Temperatura

La desviación de temperatura a nivel espacial y temporal, el tiempo de recuperación, la velocidad de enfriamiento en caso de fallo eléctrico y los tiempos de calentamiento durante la puesta en marcha son las especificaciones más importantes relativas a la temperatura. Algunas definiciones al respecto:

Desviación de temperatura a nivel espacial y temporal según la norma DIN 12880:2007-05  
El nombre de 27 puntos de medición se deriva de nueve puntos de medición en tres niveles de medición. Las desviaciones de temperatura se indican con  $\pm K$ .



La desviación de la temperatura y la humedad **a nivel temporal** es la diferencia de valores de medición en un punto en momentos distintos, p. ej.  $\pm 0,1 K$  a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $75\text{ \% h. r.}$



La desviación de la temperatura y la humedad **a nivel espacial** es la diferencia de valores de medición entre dos puntos en el mismo momento, p. ej.  $\pm 0,2 K$  a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $75\text{ \% h.r.}$

La desviación a nivel espacial es siempre mayor que a nivel temporal.

## Tiempo de recuperación según la norma DIN 12880:2007-05

Una vez alcanzado el valor de consigna en una incubadora de CO<sub>2</sub> sin carga y pasada una hora, la puerta de cristal se abrirá durante 30 segundos y a continuación se cerrará rápidamente. El tiempo para alcanzar el valor de inicio, normalmente  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en incubadoras de CO<sub>2</sub>, es el tiempo de recuperación. Debe contarse con diferencias en función de la temperatura en el laboratorio, la carga y el volumen del medio de cultivo en los recipientes de cultivo.

## Comparación de tres tipos distintos de regulación de temperatura en incubadoras de CO<sub>2</sub>: agua, aire, envoltura de silicona

Tipo de regulación de temperatura	Manto de agua	Envoltura de aire BINDER	Envoltura de silicona BINDER
Descripción	Un recipiente relleno de agua en el interior	Un recipiente relleno de aire en el interior	Un recipiente relleno de semifluido en el interior
Peso operativo	El más pesado	El más ligero	
Movilidad en estado operativo	El más pesado	El más sencillo	
Tiempo de calentamiento desde la temperatura ambiente hasta 37 °C	El más largo dado que se calienta una gran cantidad de agua	El más corto dado que sólo se calienta aire	
Riesgo de contaminación por el mantenimiento	El más elevado dado que durante el llenado regular se escapa aire contaminado procedente del manto de agua.	El más reducido dado que no se requiere mantenimiento.	El más reducido dado que no se requiere mantenimiento.
Rutina de descontaminación	No es posible.	180 °C posibles.	100 °C posibles.
Variación de temperaturas en caso de fallo eléctrico sólo unos minutos	Escasa caída de la temperatura	Escasa caída de la temperatura	Escasa caída de la temperatura

 **Las consideraciones de los equipos individuales pueden desviarse de esta visión general. Estaremos encantados de ayudarle.**

Una incubadora de CO<sub>2</sub> de manto de agua con 160 litros de volumen interior necesita más de 75 l de agua para llenar el manto de agua. Para mover modelos con manto de agua, debe vaciarse el manto de agua, algo que requiere mucho tiempo, y volver a llenarlo, p. ej., en trabajos de servicio. Un modelo con una envoltura de aire de tamaño comparable es en torno a 75 kg más ligero y se mueve cómodamente y sin pérdida de tiempo.

El llenado regular del manto de agua con 3 o 4 l de agua constituye un elevado riesgo de contaminación. Por las boquillas de llenado abiertas se escapa aire procedente del maloliente manto de agua, lo que constituye una fuente de contaminación. El llenado es una actividad tediosa y engorrosa (que a nadie gusta), especialmente en las incubadoras de CO<sub>2</sub> con manto de agua apilado.

Cuanto mayor es la cantidad de llenado del manto de agua o de la envoltura de silicona, más prolongado será el tiempo de calentamiento, p. ej., desde la temperatura ambiente a unos 37 °C estables. En algunos modelos con manto de agua, esto puede llevar hasta 24 horas.

Las incubadoras de CO<sub>2</sub> con manto de agua no cuentan con una rutina de descontaminación térmica. A partir de 100 °C se genera vapor de agua. Esto conlleva un aumento de la presión. En los calentadores de agua con válvula de reducción de presión se oye un pitido. Dado que el manto de agua no dispone de pitido, estallaría.

En el caso de fallo eléctrico de unos minutos, la variación de temperatura de los tres casos presentados se comporta de forma comparable. En el caso de un fallo eléctrico prolongado, el manto de agua y la envoltura de silicona tienen una ventaja.

Debido a las distintas formas en que se indican los tiempos de recuperación, sería necesario observar cada equipo individual para poder establecer una comparación. Esto queda fuera del ámbito de este libro blanco. La norma DIN 12880:2007-05 describe cómo se mide el tiempo de recuperación.

Las puertas de cristal con divisiones que reducen considerablemente el corte transversal del acceso pueden afectar de forma positiva el tiempo de recuperación de la temperatura. **La nueva CB 170** ofrece por primera vez un novedoso acceso rápido a las muestras.

¿Tiene preguntas sobre el tema del tiempo de recuperación?

**Estaremos encantados de ayudarle.**

## Humedad del aire y punto de rocío

Ni las condiciones hipotónicas ni las hipertónicas fomentan un buen crecimiento celular. La concentración osmótica fijada (osmolaridad) debe mantenerse siempre para garantizar un buen crecimiento celular. Los valores de humedad elevados reducen el índice de evaporación de los recipientes de cultivo a un mínimo, evitando así una concentración (se produce un aumento de la presión osmótica) de sales, aminoácidos y otros aditivos en los medios de cultivo. Los valores recomendados son de  $\geq 95$  % h. r.

Las puertas de cristal con divisiones que reducen considerablemente el corte transversal del acceso pueden afectar de forma positiva el tiempo de recuperación de la humedad. **La nueva CB 170** ofrece por primera vez incluso un novedoso acceso rápido a las muestras.

La temperatura y la humedad dependen del llamado punto de rocío o de la temperatura de punto de rocío. Si con una presión constante, se alcanza o supera una temperatura determinada, la temperatura de punto de rocío, en un lugar concreto de la incubadora de CO<sub>2</sub>, aparecerá una condensación indeseada en dicho lugar. La condensación aumenta el riesgo de contaminación.

El tipo de conducción del aire en una incubadora de CO<sub>2</sub> no influye en el índice de evaporación, sino en el riesgo de contaminación. Vea a este respecto el punto 7.0.

## Comparación de tres tipos distintos de humidificación en incubadoras de CO<sub>2</sub>: evaporación, vaporización, pulverización

Tipo de humidificación	Bandeja de suelo	Bandeja de agua		Activo		
	Evaporación			Vapor		Ultrasonido
Descripción	Depósito de suelo sin calentamiento de agua.	Extraíble.	Fijo.	Recipiente de agua externo extraíble.	Recipiente de agua externo fijo.	Producción externa de pulverización con recipiente de agua fijo.
Capacidad de limpieza Peligro de contaminación	El más fácilmente accesible. Desinfección mediante frotado, no esterilizable en autoclave, descontaminación térmica. Depósito visible. Riesgo de contaminación apreciable.	El más fácilmente accesible, desinfección mediante frotado, esterilizable en autoclave, descontaminación térmica. Depósito visible. Riesgo de contaminación apreciable.	Costosa desinfección mediante frotado o descontaminación térmica. Elevado riesgo de contaminación dado que el recipiente no es visible.	Fácilmente accesible, recipiente intercambiable con tubos. Riesgo de contaminación reducido.	Difícil o imposible de limpiar. Piezas de difícil acceso, como recipientes, válvulas y tubos. Riesgo de contaminación elevado.	Difícil o imposible de limpiar. Piezas de difícil acceso, como recipientes, válvulas y tubos. Riesgo de contaminación elevado.
Llenado y vaciado	Llenado sencillo. Costoso vaciado con bomba	El más sencillo.	Llenado sencillo. Costoso vaciado por medio de cable.	Llenado y vaciado sencillos.	Costoso llenado, vaciado problemático.	Costoso llenado, vaciado problemático.
Tiempo de calentamiento desde la temperatura ambiente hasta 37 °C	El más largo dado que se calienta una gran cantidad de agua		El más corto dado que sólo se calienta aire			
Riesgo de contaminación por el mantenimiento	El más elevado dado que durante el llenado regular se escapa aire contaminado procedente del manto de agua.		El más reducido dado que no se requiere mantenimiento.			
Rutina de descontaminación	No es posible.		18o °C posibles.			
Facilidad de servicio y mantenimiento	Sin problemas.	Sin problemas.	Costoso.	Costoso.	Extremadamente costoso.	Extremadamente costoso.
Variación de temperaturas en caso de fallo eléctrico sólo unos minutos	Escasa caída de la temperatura		Escasa caída de la temperatura			



**Las consideraciones de los equipos individuales pueden desviarse de esta visión general. Estaremos encantados de ayudarle.**



En superficies de agua abiertas, como depósitos de suelo y bandejas de agua, el tamaño de la superficie y la potencia calorífica principalmente determinan la capacidad de humidificación.

Las bandejas de agua de BINDER cuentan con el principio de punto de rocío único Permady™. La incubadora de CO<sub>2</sub> está construida de tal forma que, idealmente, la condensación sólo se da en la bandeja de agua y no en lugares de difícil acceso, como la pared trasera.

El mantenimiento y el servicio de las incubadoras de CO<sub>2</sub> con recipientes de agua externos fijos son costosos. El agua contaminada puede determinarse únicamente a través de la pequeña ventana de visión del indicador de nivel de agua, aunque suele ser demasiado tarde. Por el contrario, las bandejas de agua son siempre bien visibles.

La nueva CB 170 ofrece por primera vez como novedad un recipiente de agua externo intercambiable y de fácil acceso. La posible contaminación puede eliminarse de forma sencilla y eficaz, al contrario que en los recipientes fijos inaccesibles.

## Concentración de CO<sub>2</sub>

Las oscilaciones en la concentración de CO<sub>2</sub> de la atmósfera resultan en modificaciones indeseadas del valor de pH en el cultivo de células. Por ello, en las incubadoras de CO<sub>2</sub>, en función del cultivo de células, debe mantenerse constante una concentración de dióxido de carbono de entre un 5 y un 7 % vol.

La concentración de CO<sub>2</sub> en las incubadoras se mide con sensores IR (sensores de infrarrojos) o con detectores de conductividad térmica.

### Principios de medición

El principio de medición de un detector de conductividad térmica se basa en la medición de la conductividad eléctrica en función de la diferencia de conductividad térmica entre la concentración de CO<sub>2</sub> en la incubadora y un gas de referencia, por lo general, la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire del laboratorio.

El principio de medición de un sensor IR se basa en que el dióxido de carbono absorbe una longitud de onda electromagnética de 4,3 µm. La radiación IR se libera a través del gas y se encuentra en un detector IR. Las concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> absorben más radiación IR que las concentraciones bajas de CO<sub>2</sub>. Las cantidades correspondientes se encuentran entonces en el detector IR.

## Comparación de dos tipos distintos de sensores de CO<sub>2</sub> en incubadoras de CO<sub>2</sub>: luz, conductividad

Tipo de sensor de CO <sub>2</sub>	Detectores de conductividad térmica	IR
Descripción	Se mide la conductividad térmica entre gases.	Se mide la absorción de la radiación IR por parte de un gas.
Respuesta en caso de apertura constante de la puerta	Lento. Se estabiliza lentamente en el valor de salida.	Muy rápido. El regulador PID alcanza más rápido el valor de salida estable.
Controlabilidad	En función de las modificaciones de la humedad y la concentración de dióxido de carbono del aire del laboratorio (emisiones de gases residuales).	Independiente de las modificaciones.
Precisión	Impreciso.	Preciso.
Reajuste	Más habitual.	Menos habitual.
Posibilidad de esterilización por calor	180 °C	180 °C

 **Las consideraciones de los equipos individuales pueden desviarse de esta visión general. Estaremos encantados de ayudarle.**

## Buen crecimiento celular mediante un suministro de CO<sub>2</sub> óptimo

Para reducir el consumo de CO<sub>2</sub> resulta útil abrir y cerrar la puerta de cristal de forma cuidadosa pero rápida. Las puertas de cristal con divisiones que reducen considerablemente el corte transversal del acceso pueden afectar de forma positiva al consumo de CO<sub>2</sub>.

La nueva CB 170 ofrece por primera vez incluso un novedoso acceso rápido a las muestras.

Para garantizar un suministro de CO<sub>2</sub> durante un tiempo prolongado, p. ej., durante un fin de semana largo, recomendamos la conexión de dos botellas de gas a un cambiador de botellas de gas. Si la botella de CO<sub>2</sub> está vacía, se cambia automáticamente a la llena, garantizando así un suministro continuado de CO<sub>2</sub>.

Al manejar gases, observe las indicaciones de seguridad del fabricante.

En función del tipo de células, tejido o aplicación, p. ej. fertilización in vitro, son necesarias las concentraciones de oxígeno normóxico (21 % vol.), hipóxico (< 21 % vol.) o hiperóxico (> 21 % vol.). Las incubadora de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> ofrecen dos rangos, p. ej., 0,2 a 20 % vol. de O<sub>2</sub> o 10 a 95 % vol. de O<sub>2</sub>.

Para alcanzar condiciones hipóxicas, es imprescindible un suministro de gas nitrógeno. El gas nitrógeno inerte desplaza el exceso de oxígeno. Por ello, en los países anglosajones las incubadoras de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> se denominan también "Tri-gas incubators". La concentración de oxígeno se mide con un sensor de óxido de circonio. Este también deberá poder esterilizarse con aire caliente.

En comparación con las incubadoras de CO<sub>2</sub>, las incubadoras de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> son más complejas técnicamente, sus costes operativos son más elevados y su precio es más caro.

Para reducir el consumo de O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> resulta útil abrir y cerrar la puerta de cristal de forma cuidadosa pero rápida. Las puertas de cristal con divisiones que reducen considerablemente el corte transversal del acceso pueden afectar de forma positiva al consumo de O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>.

Al manejar gases, observe las indicaciones de seguridad del fabricante.

## Interior

Características constructivas del interior	Variante A	Variante B1	Variante B2	Variante B3
		Cobre masivo	Acero recubierto de cobre	Aleación de cobre y acero
Material del interior	Acero monocromático. Detección precoz de fuentes de contaminación. Muy buena capacidad de limpieza. (Por ello, los biorreactores y los tanques de fermentación son de acero inoxidable.)	Efecto bactericida resistente a los arañazos. Decoloraciones e incrustaciones extremadamente fuertes. Los goteos y las fuentes de contaminación permanecen ocultos. Difícil de limpiar.	Capa no resistente a los arañazos. Se pierde el efecto bactericida. La limpieza contribuye a la destrucción del recubrimiento o el efecto bactericida.	Efecto bactericida insuficiente. Buena capacidad de limpieza.
Diseño del interior	De una pieza. Sin soldaduras. Grandes esquinas redondeadas. Muy fácil de limpiar.	Ensamblado a partir de varias piezas. En las cavidades de las soldaduras existe riesgo de contaminación. Pequeñas esquinas redondeadas. Limpieza insuficiente.	Ensamblado a partir de varias piezas. En las cavidades de las soldaduras existe riesgo de contaminación. Pequeñas esquinas redondeadas. Limpieza insuficiente.	Ensamblado a partir de varias piezas. En las cavidades de las soldaduras existe riesgo de contaminación. Pequeñas esquinas redondeadas. Limpieza insuficiente.
Sistema de estantes	Tirada con estantes de una pieza, de lo contrario nada (principio Less is more).	Sistema de estantes autónomo con numerosos elementos de fijación. El desmontaje, montaje y limpieza requieren mucho tiempo.	Sistema de estantes autónomo con numerosos elementos de fijación. El desmontaje, montaje y limpieza requieren mucho tiempo.	Sistema de estantes autónomo con numerosos elementos de fijación. El desmontaje, montaje y limpieza requieren mucho tiempo.
Conducción de aire	Regulación de la temperatura homogénea en todos los lados, de lo contrario nada (principio Less is more). Distribución natural de la temperatura. Muy fácil de limpiar.	Los ventiladores y un sistema de bandejas de conducción de aire garantizan una corriente de aire. El aire forzado puede aumentar los índices de evaporación del medio de cultivo y el riesgo de contaminación. El desmontaje, montaje y limpieza requieren mucho tiempo.	Los ventiladores y un sistema de bandejas de conducción de aire garantizan una corriente de aire. El aire forzado puede aumentar los índices de evaporación del medio de cultivo y el riesgo de contaminación. El desmontaje, montaje y limpieza requieren mucho tiempo.	Los ventiladores y un sistema de bandejas de conducción de aire garantizan una corriente de aire. El aire forzado puede aumentar los índices de evaporación del medio de cultivo y el riesgo de contaminación. El desmontaje, montaje y limpieza requieren mucho tiempo.



**Las consideraciones de los equipos individuales pueden desviarse de esta visión general. Estaremos encantados de ayudarle.**

## Esterilización:

La esterilidad necesaria para cada laboratorio

Como se mencionó anteriormente, el objetivo del cultivo de células es conseguir y preservar un buen crecimiento celular así como obtener una diferenciación correspondiente en función de la tarea. Los elementos esenciales para ello no son sólo los parámetros ya mencionados, sino también el recurrente tema de la contaminación y descontaminación de los laboratorios de cultivos celulares y de tejidos. A este respecto, se han diseñado distintas soluciones para incubadoras de CO<sub>2</sub>.

### Explicación de términos

Descontaminación es un término general que describe la eliminación de contaminantes peligrosos. Esto abarca la contaminación biológica, química y radioactiva, pero no permite extraer conclusiones sobre su efectividad.

Se habla de desinfección cuando en un procedimiento de pruebas se alcanza una reducción de los gérmenes de cinco potencias de diez (log 5).

Por esterilización (SIP, Sterilization in Place) se entiende la eliminación completa de los microorganismos viables.

Nuestro libro blanco "Cultivo de células sin contaminación" aborda en detalle este tema desde el punto de vista de las incubadoras de CO<sub>2</sub>.

Descontaminación según necesidad	Protección continuada contra la contaminación
Calor seco a 160 – 180 °C	Superficie minimizada sin juntas
Calor seco a 120 – 140 °C	Límite de humedad
Calor húmedo a 90 – 95 °C	Material de superficie bactericida
Fumigación con peróxido de hidrógeno	Filtración del aire con filtro HEPA
Radiación UV-C	Radiación UV-C

Tab. 1: medidas y procedimientos para minimizar el riesgo de contaminación

La esterilización por aire caliente a 180 °C de BINDER se ha convertido en la regla de oro. Es extremadamente eficaz, de manejo sencillo y suministra siempre resultados reproducibles. Es el único de los procedimientos anteriormente mencionados que cumple las directivas sobre esterilización de equipos para aplicaciones médicas o farmacéuticas.

Las normas internacionales son, p. ej., las farmacopeas estadounidenses, europeas y japonesas.

Las soluciones técnicas de las incubadoras de CO<sub>2</sub> pierden su efecto si se emplean por sí solas sin medidas para el control de calidad. Algunos ejemplos son: protocolos, SOP (Standard Operation Procedures), **listas de control de BPL** y documentos de calificación (IQ, OQ, PQ). Nuestro **libro blanco "Validación y calificación"** ofrece información al respecto.

## Calificación y validación: con el apoyo de los fabricantes de incubadoras

Tanto los laboratorios de BPL como los GMP están obligados a la calificación de sus equipos. La calificación comprende DQ (design qualification), IQ (installation qualification), OQ (operational qualification) y PQ (performance qualification). El proceso de validación completo y la verificación de todas las funciones son costosos y requieren una documentación extensa y detallada.

Por ello, los fabricantes de incubadoras orientados al servicio ponen a disposición de sus clientes toda la documentación y las listas de control para la validación.





**¿BUSCA LA INCUBADORA DE CO<sub>2</sub> CORRECTA  
PARA SUS CULTIVOS CELULARES?**

**¡DÉJESE ACONSEJAR SOBRE NUESTROS MODELOS!**

