

Laura Giselle
Flores Montoya

Cultivo y mantenimiento de líneas celulares HT-29 Y
SW480 para investigación biomédica



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Cultivo y mantenimiento de líneas celulares HT-29 Y
SW480 para investigación biomédica

Tesis
como parte de los requisitos para obtener el grado
Licenciada en nutrición

Presenta

Laura Giselle Flores Montoya

Dirigido por
Dr. Jorge Luis Chavez Servin

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Nutrición

"Cultivo y mantenimiento de líneas celulares HT-29 y SW480 para investigación biomédica"

TESIS

COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN NUTRICIÓN

Presenta:

Laura Giselle Flores Montoya

Dirigido por:

Dr. Jorge Luis Chávez Servín

SINODALES

Dr. Jorge Luis Chávez Servín
Presidente

Dr. Aarón Kuri García
Vice-presidente

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Secretario

Maestro: Josué López Martínez
Vocal

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Mayo de 2026 México

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Luis Chávez Servín, director de esta tesis, por su orientación académica, su disposición permanente y su compromiso con cada etapa del proceso. Su guía marcó el rumbo de este trabajo desde el principio.

A Aarón Kuri García, por introducirme al trabajo en cultivo celular con paciencia genuina y con una generosidad poco común. Cada corrección que me hizo en el laboratorio mejoró no solo este trabajo, sino mi forma de entender la ciencia experimental.

A Josué López Martínez, por su presencia constante en los días de trabajo en el laboratorio y por hacer que las tareas más rutinarias tuvieran sentido. Su disposición para enseñar fue un apoyo real durante todo el servicio social.

Al Dr. Roberto Augusto Ferriz y al Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez, por su respaldo académico y por acompañar este proceso con seriedad. Su participación le dio solidez a un trabajo que se desarrolló en condiciones de recursos limitados.

Al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ y al Laboratorio de Cultivo Celular de la Facultad de Medicina de la UAQ, por facilitar el material biológico y el equipo sin los cuales este estudio no hubiera sido posible.

A mis padres, por todo lo que no cabe en esta página. Por el apoyo sin condiciones y por mantenerse firmes en cada momento difícil de esta carrera.

A César, por la paciencia y por estar presente en los momentos en que más se necesitaba.

A Paulina, Eduardo, Esmeralda, Liliana y Mario, compañeros de carrera y de vida, por los años compartidos y por hacer de esta etapa una que no se olvida fácilmente.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción

1.1 Importancia del cultivo celular en investigación biomédica

1.2 Justificación

1.3 Objetivo general

1.4 Objetivos específicos

1.5 Alcances del estudio

1.6 Limitaciones del estudio

2. Marco teórico

2.1 Antecedentes históricos del cultivo celular

2.2 Fundamentos del cultivo celular

2.3 El cultivo celular bidimensional como modelo experimental

2.4 Las líneas celulares HT-29 y SW480

2.4.1 Origen y características de HT-29

2.4.2 Origen y características de SW480

2.4.3 Comparación funcional entre HT-29 y SW480

2.4.4 Aplicaciones en investigación biomédica y nutricional

3. Metodología

3.1 Tipo y diseño del estudio

3.2 Material biológico

3.3 Condiciones generales de cultivo

3.4 Procedimientos de cultivo y mantenimiento

3.5 Control de calidad

4. Resultados
5. Discusión
6. Conclusiones
7. Referencias bibliográficas

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación entre las líneas celulares HT-29 y SW480

Tabla 2. Resumen operativo del cultivo de HT-29 y SW480 bajo condiciones de laboratorio básico

Índice de figuras

Figura 1. Línea celular HT-29 inmediatamente post-siembra (baja densidad inicial, 40×)

Figura 2. Línea celular HT-29 a las 48 horas post-siembra (confluencia ~70 %, 40×)

Figura 3. Episodio de contaminación fúngica en cultivo de HT-29 (tercera siembra)

Figura 4. Línea celular SW480 a las 48 horas post-siembra (morfología irregular, 40×)

Figura 5. Contaminación bacteriana en el cultivo de SW480

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo celular ocupa un lugar central en la investigación biomédica porque permite estudiar procesos fisiológicos y patológicos bajo condiciones controladas, sin recurrir a modelos animales ni exponer seres humanos a sustancias de efecto incierto (Freshney, 2010). A diferencia de los sistemas in vivo, los modelos celulares permiten aislar variables específicas y repetir las condiciones experimentales con precisión, lo que los hace útiles tanto en investigación básica como aplicada.

En el campo de la nutrición, esta aproximación tiene un alcance particular. El epitelio gastrointestinal constituye la interfaz primaria entre los compuestos dietéticos y el organismo: es el sitio donde ocurren la absorción de nutrientes, la biotransformación de metabolitos y la activación de respuestas celulares ante sustancias bioactivas (Collins, 2004). Estudiar estos procesos directamente en tejido humano es técnicamente complejo y éticamente restrictivo, por lo que las líneas celulares derivadas del epitelio intestinal funcionan como modelos de referencia en estudios de biodisponibilidad, inflamación y respuesta a compuestos funcionales (Zweibaum et al., 1991).

Entre las líneas más utilizadas con este propósito se encuentran HT-29 y SW480, ambas derivadas de adenocarcinoma colorrectal humano. Compartiendo ese origen, presentan perfiles biológicos muy distintos: HT-29 conserva cierta capacidad de diferenciación hacia un fenotipo epitelial intestinal, mientras que SW480 representa un estadio tumoral más indiferenciado y agresivo (Xu et al., 2020). Esta divergencia determina cómo se comportan en cultivo y qué tipo de preguntas experimentales puede responder válidamente cada una.

La literatura disponible aborda estas diferencias principalmente desde una perspectiva molecular y funcional, con escasa atención a las condiciones operativas bajo las que ambas líneas se establecen y mantienen en laboratorios con recursos limitados. Conocer el comportamiento real de estas células durante el cultivo es información práctica que incide directamente en la reproducibilidad experimental y en la toma de decisiones al momento de seleccionar un modelo celular (Pan et al., 2015).

Lo que aquí se documenta no es una caracterización molecular de estas células, sino un registro sistemático de su comportamiento bajo condiciones reales de laboratorio básico universitario. Las diferencias operativas observadas entre ambas líneas se contrastan con lo reportado en la literatura, para que pueda servir de referencia a otros laboratorios en condiciones similares.

1.1 Importancia del cultivo celular en investigación biomédica

El cultivo celular surgió como una necesidad metodológica antes de convertirse en una práctica estandarizada. Desde finales del siglo XIX, la posibilidad de mantener células vivas fuera del organismo abrió un camino que la investigación biomédica no ha dejado de recorrer: estudiar procesos biológicos complejos sin depender de organismos completos, con un nivel de control experimental que ningún modelo in vivo puede ofrecer de la misma manera (Capes-Davis, 2018).

En la actualidad, el cultivo celular sostiene áreas tan diversas como la oncología, la farmacología, la toxicología y la nutrición. Su contribución más directa es la posibilidad de aislar una variable un nutriente, un fármaco, una señal molecular y observar su efecto sobre un tipo celular específico, en condiciones reproducibles y sin las interferencias sistémicas propias de un organismo completo (Candela et al., 2008). Esta precisión tiene un costo conocido: las células cultivadas en monocapa sobre plástico se alejan de su entorno fisiológico original, y esa distancia condiciona la interpretación de cualquier resultado obtenido en cultivo.

En el área de la nutrición, el epitelio intestinal representa el sistema de mayor interés. Es el sitio donde los compuestos dietéticos establecen contacto directo con el organismo tras la digestión: aquí se absorben nutrientes, se biotransforman metabolitos y se activan respuestas inmunológicas ante la presencia de sustancias bioactivas (Collins, 2004). Disponer de líneas celulares que modelen ese epitelio aunque sea de forma parcial e imperfecta es una herramienta que ha permitido estudiar procesos difícilmente accesibles por otras vías.

1.2 Justificación

La elección de una línea celular como modelo experimental tiene consecuencias directas sobre los resultados. Cada línea posee propiedades biológicas específicas que condicionan la validez y la interpretabilidad de los resultados: el grado de diferenciación celular, la estabilidad genética, el comportamiento proliferativo y la respuesta ante condiciones de cultivo no ideales son factores que influyen sobre cualquier experimento (Collins, 2004).

En el caso de HT-29 y SW480, la literatura documenta diferencias sustanciales en fenotipo, perfil mutacional y comportamiento metabólico. Buena parte de esa información proviene, sin embargo, de laboratorios con infraestructura avanzada, donde las líneas se obtienen de bancos certificados, se autentican mediante perfiles STR y se mantienen bajo condiciones estrictamente controladas. En laboratorios universitarios con recursos básicos, las condiciones reales de trabajo se alejan considerablemente de ese escenario ideal, y la literatura ofrece poca orientación específica para ese contexto (Candela et al., 2008).

Este trabajo se realizó durante el servicio social en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, durante el primer semestre de 2024. Ambas líneas se establecieron a partir de material criopreservado donado, sin certificación de autenticidad ni número de pasaje conocido. Documentar ese proceso con detalle incluyendo las limitaciones, los incidentes y las diferencias observadas entre líneas aporta información práctica sobre el manejo de estas células en laboratorios con recursos básicos, contexto habitual en universidades públicas del país.

1.3 Objetivo general

Documentar el proceso de establecimiento y mantenimiento de la línea celular HT-29 bajo condiciones de laboratorio básico universitario, y registrar los intentos de cultivo de SW480 con análisis crítico de los factores que impidieron su evaluación, para identificar las condiciones operativas necesarias para su manejo en ese entorno.

1.4 Objetivos específicos

1. Describir los fundamentos teóricos del cultivo celular bidimensional y las características biológicas relevantes de las líneas HT-29 y SW480 con base en la evidencia científica disponible.
2. Documentar el proceso de descongelación, conteo celular inicial, siembra y mantenimiento de ambas líneas siguiendo un protocolo estandarizado en un laboratorio universitario de recursos básicos.
3. Registrar la densidad celular post-descongelación de HT-29 y SW480 mediante conteo con cámara de Neubauer previo a la siembra inicial, y reportar la densidad de HT-29 al momento del subcultivo (70 % de confluencia) en las siembras exitosas.
4. Describir los episodios de contaminación presentados en ambas líneas durante el periodo de cultivo y analizar sus posibles causas mediante el esquema de placas control y las condiciones del laboratorio.
5. Contrastar las diferencias operativas y morfológicas observadas en HT-29 con sus propiedades descritas en la literatura, y discutir las implicaciones del medio de cultivo utilizado para SW480.
6. Discutir el valor operativo de los hallazgos para laboratorios universitarios con recursos comparables.

1.5 Alcances del estudio

Las observaciones registradas fueron de tres tipos: densidad celular medida con cámara de Neubauer en dilución 1:2 inmediatamente después de la descongelación (antes de la siembra inicial) y al momento del subcultivo en las siembras exitosas de HT-29; morfología evaluada al microscopio invertido de campo claro cada 48 horas, e incidentes de contaminación analizados mediante el esquema de placas control. La revisión bibliográfica sirve como marco de referencia para ubicar esas observaciones, no como sustituto de datos propios.

El estudio no incluye caracterización molecular, ensayos de respuesta a compuestos bioactivos ni análisis estadísticos comparativos. Las conclusiones se circunscriben al comportamiento observado bajo las condiciones específicas del laboratorio donde se realizó el trabajo y no deben generalizarse sin considerar ese contexto.

1.6 Limitaciones del estudio

Las limitaciones del estudio derivan directamente de las condiciones del laboratorio en que se realizó. Las líneas celulares se obtuvieron por donación sin certificación de autenticidad (perfil STR) ni registro del número de pasaje previo, lo que introduce incertidumbre sobre la estabilidad genética del material de partida. La evaluación de viabilidad celular post-descongelación se realizó por criterios morfológicos y de adherencia observados al microscopio, y no se incluyó tinción de exclusión con azul de tripano de forma sistemática por ausencia del reactivo en el periodo de trabajo, aunque el conteo con cámara de Neubauer sí se realizó en todos los momentos de siembra. Los episodios de contaminación no pudieron identificarse con precisión por ausencia de recursos para pruebas microbiológicas específicas.

Una limitación particularmente relevante para la línea SW480 es que fue cultivada en DMEM con 5 % de CO₂, condición que difiere del medio Leibovitz L-15 sin CO₂ adicional recomendado para esta línea. Esta diferencia afecta el equilibrio ácido-base del medio y puede alterar el comportamiento celular independientemente de otros factores. Esta restricción impide hacer afirmaciones sobre el comportamiento biológico de SW480 a partir de las observaciones registradas en este trabajo.

Estas condiciones, frecuentes en laboratorios universitarios con infraestructura básica, limitan la extrapolación directa de los resultados. Los hallazgos deben interpretarse como observaciones descriptivas producidas bajo condiciones específicas de laboratorio, no como sustitutos de estudios con mayor control técnico y trazabilidad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes históricos del cultivo celular

El cultivo celular como práctica sistemática tiene sus raíces en las últimas décadas del siglo XIX. Sus primeras manifestaciones no surgieron de la oncología ni de la biomedicina clínica, sino de la embriología y la bacteriología, disciplinas que necesitaban observar células y tejidos en condiciones controladas para responder preguntas que los modelos animales completos no podían resolver con la precisión requerida.

Uno de los avances técnicos de ese periodo fue el perfeccionamiento de los medios de cultivo microbiológico. Sus efectos se extendieron más allá de la bacteriología: Robert Koch, trabajando en la identificación de agentes patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* y *Vibrio cholerae*, consolidó el uso del agar como soporte sólido para el aislamiento de microorganismos y estableció criterios de esterilización sistemática que más tarde se transferirían al cultivo de células animales. Richard Petri, colaborador de Koch en Berlín, desarrolló en ese mismo contexto la placa de cultivo que lleva su nombre (Khodavirdipour et al., 2021).

El paso hacia el cultivo de tejidos animales propiamente dicho ocurrió en 1906, cuando Ross Granville Harrison, en el Instituto Johns Hopkins, mantuvo tejido nervioso de rana en un medio compuesto por solución salina y coágulos sanguíneos, demostrando que era posible sostener la viabilidad celular fuera del organismo por periodos observables (Fonseca et al., 2021). Este experimento es considerado el punto de partida técnico del cultivo celular moderno, no porque la metodología fuera refinada sino porque demostró que la viabilidad extraorganísmica era posible, lo que orientó décadas de trabajo posterior.

Alexis Carrel, quien recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1912, amplió esos experimentos al demostrar que las células no solo podían mantenerse vivas fuera del organismo, sino que proliferaban y podían transferirse a nuevos recipientes de cultivo (Bourgine et al., 2012). Sus observaciones sobre la necrosis en el centro de los cultivos —atribuida al acceso limitado de nutrientes y a la acumulación de desechos metabólicos— anticiparon principios que hoy son centrales en el diseño de sistemas de

cultivo tridimensional. El desarrollo de los matraces que llevan su nombre, junto con la introducción del vidrio Pyrex esterilizable en autoclave, permitió prolongar los cultivos y reducir la contaminación (Collins, 2004).

Durante la década de 1940 se consolidaron varias prácticas que acercaron el cultivo celular a sus formas actuales: el aislamiento de líneas estables, la formación de colonias clonales y la comprensión de que la proliferación celular sostenida requiere condiciones fisicoquímicas precisas y un suministro continuo de nutrientes (Collins, 2004; Davies y Enns, 2004). El hito que sintetiza ese periodo es el establecimiento de la línea HeLa en 1951 por George Otto Gey y su colaboradora Mary Kubicek, a partir de una biopsia de adenocarcinoma cervical de Henrietta Lacks (Davies y Enns, 2004). Las células demostraron una capacidad proliferativa extraordinaria y se convirtieron en la primera línea celular humana de uso extendido en investigación biomédica (Belo et al., 2011).

En las décadas siguientes, la introducción de medios químicamente definidos, el desarrollo de técnicas de criopreservación y la producción de anticuerpos monoclonales lograda por Georges Köhler y César Milstein en los años setenta, trabajo reconocido con el Premio Nobel en 1984 convirtieron el cultivo celular en una plataforma con aplicaciones a escala industrial (Belo et al., 2011). Para los años noventa, su aplicación se había extendido a la producción de biomedicamentos, la ingeniería de tejidos y el cribado farmacológico a gran escala (Davies y Enns, 2004).

2.2 Fundamentos del cultivo celular

El cultivo celular comprende el conjunto de técnicas mediante las cuales células aisladas de un tejido de origen animal o humano se mantienen y proliferan fuera del organismo en condiciones artificiales controladas (Belo et al., 2011). El principio central es reproducir las condiciones fisicoquímicas del microambiente celular: temperatura, pH, osmolaridad, disponibilidad de nutrientes y eliminación de desechos metabólicos.

Los cultivos pueden clasificarse según su origen y comportamiento proliferativo. Los cultivos primarios se obtienen directamente del tejido y tienen una capacidad de división limitada; con el tiempo tienden a entrar en senescencia a menos que sufran una transformación que les confiera capacidad de proliferación indefinida (D'Alessio et al.,

2013). Esta transformación, denominada inmortalización, puede ocurrir de manera espontánea en células con alteraciones oncogénicas previas, o inducirse experimentalmente. Las células que la adquieren se denominan líneas celulares continuas o inmortalizadas, y son las más utilizadas en investigación biomédica por su disponibilidad continua y su comportamiento reproducible (Ataee et al., 2010).

Una característica inherente al mantenimiento prolongado de líneas celulares es la acumulación progresiva de variaciones genéticas y epigenéticas. Con cada división celular existe la posibilidad de que se introduzcan mutaciones o alteraciones en la metilación del ADN que modifiquen el fenotipo de la línea (Shan et al., 2018). Una misma línea puede comportarse de manera diferente según el número de pasajes acumulados, el laboratorio de origen o las condiciones específicas de cultivo. El Comité Internacional de Autenticación de Líneas Celulares (ICLAC) estima que más de 1,000 líneas en uso activo presentan problemas de identidad contaminación cruzada, errores de etiquetado o sustitución inadvertida documentados en distintos laboratorios del mundo (Kleiveland y Lea, 2015).

2.3 El cultivo celular bidimensional como modelo experimental

El modelo de cultivo bidimensional (2D) consiste en el crecimiento de células sobre una superficie plana generalmente poliestireno tratado en presencia de un medio nutritivo líquido. Las células se adhieren a la superficie, se extienden y proliferan formando una monocapa observable directamente al microscopio (Kleiveland y Lea, 2015). La accesibilidad técnica, la reproducibilidad y el bajo costo de este sistema explican que el cultivo 2D siga siendo el estándar en la mayoría de los laboratorios biomédicos, pese a sus limitaciones conocidas.

La principal limitación del modelo bidimensional es la ausencia de arquitectura tridimensional. En el tejido vivo, las células se organizan en estructuras espaciales complejas que condicionan su polaridad, su acceso a nutrientes y oxígeno, y su respuesta a señales mecánicas y bioquímicas del entorno (Khodavirdipour et al., 2021). En una monocapa sobre plástico, esa organización desaparece: todas las células tienen acceso uniforme al medio, no existe gradiente de oxígeno ni de nutrientes, y las interacciones con la matriz extracelular son mínimas. Estas diferencias pueden modificar

rutas de señalización intracelular y alterar la respuesta celular respecto a lo que ocurriría en un tejido organizado.

Para los fines de este trabajo registro del comportamiento de dos líneas celulares durante su establecimiento el modelo 2D es el apropiado. Permite observar la morfología celular al microscopio, estimar la confluencia, realizar conteos con cámara de Neubauer y detectar incidentes de contaminación sin equipamiento especializado.

Los principios éticos que respaldan el uso de cultivos celulares como alternativa a modelos animales fueron formalizados por William Russell y Rex Burch en 1959, quienes propusieron el marco de las tres R: reducción, refinamiento y reemplazo (Freshney, 2010). Aunque el cultivo 2D no elimina por completo la dependencia de modelos animales el suero fetal bovino utilizado en la mayoría de los medios proviene de fuentes animales, sí representa una reducción sustancial en el número de animales requeridos para la investigación preclínica.

2.4 Las líneas celulares HT-29 y SW480

2.4.1 Origen y características de HT-29

La línea celular HT-29 fue aislada en 1964 a partir de un adenocarcinoma de colon de una paciente caucásica de 44 años y caracterizada posteriormente por Fogh y colaboradores en 1975 (Kleiveland y Lea, 2015). Desde entonces se consolidó como uno de los modelos más usados de epitelio colorrectal en investigación oncológica y nutricional, por su capacidad de adquirir, bajo condiciones específicas, características de células epiteliales intestinales diferenciadas.

En estado proliferativo activo, las células HT-29 crecen formando una monocapa de morfología poligonal relativamente indiferenciada, con baja expresión de enzimas digestivas (Bourgine et al., 2012). Cuando se exponen a agentes inductores de diferenciación como el butirato de sodio o cuando se reduce la concentración de glucosa en el medio pueden adquirir características más cercanas a las de un enterocito maduro: formación de uniones estrechas, desarrollo de microvellosidades con expresión de villina, y actividad de hidrolasas intestinales como sacarasa-isomaltasa, aminopeptidasa N y

fosfatasa alcalina (Pan et al., 2015). La expresión de lactasa es limitada o ausente en esta línea.

Otra característica distintiva de HT-29 es su capacidad de producir mucinas, particularmente cuando se expone a metotrexato, lo que induce un fenotipo secretor de moco (Pan et al., 2015). Esta propiedad ha llevado al desarrollo de la sublínea HT29-MTX, ampliamente utilizada en estudios de barrera intestinal y transporte de compuestos.

Desde el punto de vista genético, HT-29 presenta una mutación en el gen APC (truncamiento en el exón 15) y es KRAS wild-type, lo que la distingue de otras líneas de adenocarcinoma colorrectal (Gagnon et al., 2013). Las condiciones estándar de cultivo incluyen medio DMEM con alta concentración de glucosa (25 mM), suplementado con 10 % de suero fetal bovino, a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ (Del Mar Contreras et al., 2012). El subcultivo se realiza habitualmente al alcanzar entre 70 y 80 % de confluencia, utilizando tripsina/EDTA al 0.05 % para el desprendimiento celular.

2.4.2 Origen y características de SW480

La línea SW480 se obtuvo en 1976 a partir de un adenocarcinoma colorrectal primario de un paciente masculino caucásico de 50 años (Kleiveland y Lea, 2015; Shan et al., 2018). Forma parte de un par isogénico con la línea SW620, establecida aproximadamente un año después a partir de una metástasis ganglionar del mismo paciente. Esta relación hace del par SW480/SW620 un modelo clásico para el estudio de la progresión tumoral en cáncer colorrectal: SW480 representa el tumor primario y SW620 un estadio metastásico más avanzado (Shan et al., 2018).

A diferencia de HT-29, SW480 presenta un fenotipo marcadamente menos diferenciado. No forma una monocapa polarizada estable ni desarrolla estructuras similares al borde en cepillo del epitelio intestinal, lo que limita su utilidad como modelo de absorción (Gagnon et al., 2013). Su morfología es más irregular, con menor organización espacial y mayor tendencia a crecer en múltiples capas cuando alcanza la confluencia.

En términos moleculares, SW480 presenta mutación activante en KRAS (G12V) y pérdida de función de TP53, además de inestabilidad cromosómica con microsatélites estables (MSS) (Kleiveland y Lea, 2015). Este perfil la convierte en un modelo relevante

para el estudio de vías oncogénicas como la señalización RAS/MAPK y para la evaluación de la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Kleiveland y Lea, 2015). La combinación de mutaciones en KRAS y TP53 representa uno de los perfiles más frecuentes en el cáncer colorrectal clínico.

El medio de cultivo recomendado para SW480 es Leibovitz L-15, suplementado con 10 % de suero fetal bovino, a 37 °C en atmósfera de aire al 100 % sin CO₂ adicional (Xu et al., 2020). El medio L-15 fue diseñado para mantener el equilibrio ácido-base mediante sales tamponantes sin depender del sistema bicarbonato/CO₂. Cuando el CO₂ exógeno al 5 % se disuelve en el medio DMEM, reacciona con el agua formando ácido carbónico, que se disocia y reduce el pH. En el caso del L-15, esta fuente de acidificación no existe porque el tamponamiento se basa en sales fosfato y galactosa. Utilizar SW480 en DMEM bajo atmósfera de CO₂ introduce, por tanto, una variable de estrés ácido que no corresponde a las condiciones para las que esta línea está caracterizada.

2.4.3 Comparación funcional entre HT-29 y SW480

Las diferencias entre ambas líneas no son únicamente de grado, sino de naturaleza. HT-29 conserva cierta plasticidad fenotípica que le permite aproximarse, bajo condiciones específicas, a un epitelio intestinal funcional. SW480 representa un estado de dediferenciación tumoral más avanzado, con características mesenquimales que la alejan del epitelio intestinal fisiológico pero la hacen útil para estudiar procesos de progresión oncogénica (Bourgine et al., 2012).

Esta diferencia condiciona qué tipo de preguntas experimentales puede responder válidamente cada línea. HT-29 es más adecuada para preguntas relacionadas con absorción de nutrientes, expresión de transportadores intestinales y respuesta de células epiteliales a compuestos bioactivos. SW480 es más apropiada para estudios de migración e invasión celular, señalización oncogénica y respuesta a tratamientos en un contexto de tumor avanzado (Belo et al., 2011).

Desde el punto de vista operativo, ambas líneas son adherentes, requieren tripsinización para el subcultivo y se criopreservan con DMSO como crioprotector. Difieren, sin embargo, en su tasa proliferativa: la literatura reporta tiempos de duplicación de

aproximadamente 26 horas para HT-29 y de 20 horas para SW480 bajo condiciones estándar (D'Alessio et al., 2013). En la práctica, SW480 alcanza la confluencia antes, lo que significa que los intervalos entre cambios de medio y el momento del subcultivo no pueden manejarse igual para ambas líneas.

Tabla 1. Comparación entre las líneas celulares HT-29 y SW480.

Característica	HT-29	SW480
Año de establecimiento	1964	1976
Origen	Adenocarcinoma de colon, mujer, 44 años	Adenocarcinoma de colon, hombre, 50 años
Mutación KRAS	Wild-type	G12V (activante)
Mutación TP53	Mutado	Mutado
Mutación APC	Truncamiento en exón 15	Mutado (deleción)
Grado de diferenciación	Moderado, inducible	Bajo
Morfología en cultivo	Poligonal, monocapa organizada	Irregular, menor organización
Producción de mucinas	Sí, inducible con metotrexato	No documentada
Medio de cultivo recomendado	DMEM + 5 % CO ₂	Leibovitz L-15, sin CO ₂ adicional
Aplicación principal en investigación	Modelo de epitelio intestinal, estudios de absorción	Progresión tumoral, transición epitelio-mesenquimal

2.4.4 Aplicaciones en investigación biomédica y nutricional

En investigación nutricional, HT-29 se ha empleado extensamente en estudios de absorción y biodisponibilidad de nutrimentos. Su capacidad de formar monocapas con uniones estrechas cuando se induce diferenciación permite medir el transporte transepitelial de minerales como hierro y zinc, así como la absorción de péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias (Del Mar Contreras et al., 2012; Davies y Enns, 2004). También se ha utilizado para evaluar el efecto de polifenoles dietéticos sobre la integridad de la barrera intestinal, midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y la expresión de proteínas de uniones estrechas como claudina y ocludina (Pan et al., 2015). En estudios de inflamación intestinal, la sublínea HT29-MTX ha sido empleada para examinar cómo flavonoides como la quercetina modulan la respuesta epitelial ante estímulos proinflamatorios como el TNF- α (Bourgine et al., 2012). SW480, por su perfil mutacional agresivo, resulta útil en la vertiente oncológica de la investigación dietética: extractos fenólicos de cereales como arroz pigmentado y sorgo redujeron la viabilidad de células SW480 mediante activación de caspasas 3 y 7 (Cheok et al., 2019), y quercetinas con ácidos clorogénicos a concentraciones fisiológicamente relevantes indujeron arresto del ciclo celular en esta línea (Ramírez-Garza et al., 2023). Esta doble utilidad HT-29 para epitelio intestinal funcional y absorción, SW480 para compuestos con potencial quimiopreventivo en tumores avanzados justifica el establecimiento de ambas líneas como paso previo a cualquier experimento de nutrición oncológica en el laboratorio. En este trabajo, lo que se documentó fue precisamente ese paso: el comportamiento de cada línea durante su establecimiento y mantenimiento, antes de emplearlas en estudios de respuesta celular.

3. METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño del estudio

El diseño del trabajo es un reporte técnico-operativo de carácter descriptivo. Se registraron las condiciones de cultivo, los eventos observados y las diferencias operativas entre HT-29 y SW480 bajo las mismas condiciones de laboratorio, sin manipular variables independientes ni establecer relaciones causales entre ellas. Este enfoque corresponde a la naturaleza del trabajo: un registro sistemático del proceso de establecimiento de líneas celulares en las condiciones concretas del laboratorio.

El trabajo se desarrolló durante el primer semestre de 2024, como parte del servicio social en investigación para el área de nutrición a cargo del Dr. Jorge Luis Chávez Servín.

3.2 Material biológico

Aunque el historial previo es desconocido, este esquema documenta la historia del material desde su llegada al laboratorio práctica básica que al menos fija un punto de partida trazable en ausencia de certificación STR (Kleiveland y Lea, 2015).

3.2.1 Línea celular HT-29

HT-29 es una línea de adenocarcinoma colorrectal humano con capacidad de diferenciación fenotípica bajo condiciones específicas de cultivo. Se incluyó en este trabajo por su amplia documentación en la literatura y por su comportamiento estable en DMEM con alta glucosa, condiciones disponibles en el laboratorio. La ausencia de datos sobre el número de pasaje del material recibido representa una limitación que se reconoce en la interpretación de los resultados (Xu et al., 2020).

3.2.2 Línea celular SW480

SW480 es una línea de adenocarcinoma colorrectal con fenotipo menos diferenciado y perfil mutacional distinto al de HT-29. Fue incluida en el trabajo con el propósito de documentar su comportamiento bajo las mismas condiciones de cultivo empleadas para HT-29. Al igual que esta última, se recibió sin información sobre pasajes previos ni autenticación del material. Adicionalmente, su medio de cultivo óptimo Leibovitz L-15 sin CO₂ adicional difiere del DMEM empleado en este laboratorio, lo que constituye una

limitación metodológica de primer orden que se discute en la sección correspondiente (Ataee et al., 2010).

3.3 Condiciones generales de cultivo

3.3.1 Medios de cultivo

Ambas líneas se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con alta concentración de glucosa (25 mM), suplementado con 10 % de suero fetal bovino sometido a filtración estéril mediante membrana de 0.22 μm , penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$). El medio completo fue igualmente filtrado a través de membrana estéril de 0.22 μm antes de su uso.

El suero fetal bovino no fue sometido a inactivación por calor procedimiento que consiste en exponer el suero a 56 °C durante 30 minutos para inactivar el sistema del complemento. Esta omisión respondió a las condiciones disponibles en el laboratorio; se ha reportado que HT-29 y SW480 toleran cultivo sin inactivación del complemento sin efectos adversos sobre la viabilidad celular (Shan et al., 2018).

Como se señala en la sección de limitaciones, el medio óptimo recomendado para SW480 es Leibovitz L-15 en atmósfera sin CO₂ adicional (Xu et al., 2020). La decisión de utilizar DMEM para ambas líneas respondió a que el laboratorio contaba con una sola incubadora con atmósfera de CO₂. Esta estandarización facilitó la operación pero introduce una diferencia respecto a las condiciones óptimas descritas para SW480, con el efecto potencial de acidificación del medio descrito en la sección 2.4.2.

3.3.2 Condiciones de incubación

Los cultivos se mantuvieron en incubadora humidificada a 37 °C con atmósfera de 5 % de CO₂. El medio se renovó cada 48 horas en función de la densidad celular observada y del cambio de color del indicador de pH presente en el medio (rojo fenol): el viraje hacia amarillo indicaba acidificación por actividad metabólica elevada o contaminación, mientras que el viraje hacia fucsia indicaba alcalinización por exceso de tampón respecto a la actividad celular.

3.3.3 Material y equipo

Todos los procedimientos se realizaron en cabina de bioseguridad Clase II A2, desinfectada con etanol al 70 % y sometida a irradiación ultravioleta durante 15 minutos previos a cada sesión de trabajo. El material reutilizable se esterilizó en autoclave antes de su uso. El equipamiento empleado fue el siguiente:

- Microscopio invertido de campo claro
- Centrífuga para tubos Falcon de 50 mL
- Baño María digital a 37 °C
- Cabina de bioseguridad Clase II A2
- Cámara de Neubauer con cubreobjetos apropiado
- Tubos Falcon estériles de 15 y 50 mL
- Pipetas automáticas y puntas estériles
- Placas de cultivo de poliestireno de 60 mm × 15 mm
- Frascos de laboratorio KIMAX de 250 mL, esterilizados en autoclave
- Material plástico estéril desechable

Durante todas las sesiones se utilizaron guantes de nitrilo y se desinfectaron superficies y materiales con etanol al 70 %.

3.4 Procedimientos de cultivo y mantenimiento

3.4.1 Descongelación y siembra inicial

Los viales criopreservados se retiraron del nitrógeno líquido y se descongelaron en baño María a 37 °C hasta la fusión completa del contenido. El material se transfirió de inmediato a un tubo Falcon de 50 mL bajo condiciones estériles y se adicionó DMEM y PBS 1× atemperados a 37 °C de forma lenta y gradual para minimizar el choque osmótico producido por la dilución del crioprotector.

La suspensión se centrifugó a 1,200 rpm durante 5 minutos (aproximadamente 200–300 × g). Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS 1× para eliminar los residuos de DMSO. El sedimento celular se resuspendió en 1 mL de DMEM fresco y se procedió al conteo celular.

El conteo se realizó con cámara de Neubauer en dilución 1:2 (10 µL de suspensión celular + 10 µL de DMEM), contando los cuatro cuadrantes externos de la cámara y aplicando la fórmula estándar:

$$\text{Células/mL} = \text{promedio de células por cuadrante} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

donde el factor de dilución fue 2 en todos los casos. Este conteo representa la densidad celular post-descongelación, antes de la siembra, y es el único dato numérico válido para SW480, dado que esta línea no produjo cultivos evaluables posteriormente. Para HT-29, se realizó un segundo conteo al momento del subcultivo, cuando los cultivos alcanzaron aproximadamente 70 % de confluencia, para documentar la densidad en ese punto.

Las células se sembraron en placas de cultivo de 60 mm × 15 mm con 5 mL de medio suplementado y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 48 horas para favorecer la adhesión inicial.

3.4.2 Esquema de control por siembra

En cada siembra de ambas líneas se incluyeron, junto a las tres placas de cultivo celular, tres placas adicionales con medio de cultivo sin inóculo celular. Estas placas control sirvieron como referencia para distinguir entre contaminación de origen procedimental — vinculada al manejo de las células durante la siembra o los cambios de medio— y contaminación de origen ambiental, presente en el entorno del laboratorio con independencia de la manipulación celular. El estado de estas placas se registró en cada observación de 48 horas, junto con el de las placas con células.

3.4.3 Subcultivo

El subcultivo se realizó cuando los cultivos de HT-29 alcanzaron aproximadamente 70 % de confluencia, determinada por observación directa al microscopio invertido. Se retiró el medio con pipeta aspirante, se realizó un lavado con 2 mL de PBS 1× y se adicionaron

2 mL de tripsina/EDTA al 0.05 %. Las placas se incubaron a 37 °C durante 3 a 5 minutos, con verificación microscópica del desprendimiento celular al término del tiempo estimado. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 3 mL de DMEM con suero fetal bovino. La suspensión resultante se transfirió a un tubo Falcon, se centrifugó, se resuspendió en medio fresco y se sembró en nuevas placas a una densidad de aproximadamente 2×10^5 células/mL. Se realizaron en total uno o dos pasajes de HT-29 durante el periodo de trabajo. SW480 no fue sometida a subcultivo, dado que no se obtuvieron cultivos evaluables en ninguno de los tres ensayos.

3.4.4 Monitoreo del cultivo

El seguimiento de los cultivos se realizó mediante observación al microscopio invertido de campo claro cada 48 horas, coincidiendo con los cambios de medio programados. Esta frecuencia se estableció para minimizar el riesgo de contaminación asociado a la manipulación frecuente en las condiciones del laboratorio. En cada observación se registraron la morfología celular, el grado de confluencia estimado visualmente y cualquier alteración en la apariencia del medio o de las células. Las fotografías se tomaron con dispositivo móvil a través del ocular del microscopio invertido; esta técnica introduce limitaciones de resolución que se describen en la sección de resultados.

3.5 Control de calidad

3.5.1 Evaluación de viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante criterios morfológicos observados al microscopio: adhesión a la superficie de cultivo entre las primeras 24–48 horas post-siembra, morfología característica de cada línea según lo descrito en la literatura, ausencia de vacuolización excesiva o de restos celulares flotantes, y progresión hacia la confluencia entre cambios de medio sucesivos. La tinción de exclusión con azul de tripano no se realizó de forma sistemática por ausencia del reactivo en el periodo de trabajo; el conteo con cámara de Neubauer sí se efectuó en todos los momentos de siembra, pero sin diferenciación de viabilidad por coloración. Un cultivo se consideró viable cuando mostró adhesión progresiva tras la siembra, morfología consistente con la descrita en la literatura para cada línea y crecimiento sostenido hacia la confluencia. Para trabajos futuros con estas líneas en el mismo laboratorio, vale la pena añadir

herramientas de caracterización que den más peso a los datos obtenidos. La tinción de exclusión con azul de tripano, combinada con el conteo en cámara de Neubauer, permitiría cuantificar el porcentaje de células vivas al momento de la siembra y al subcultivo, dato que en este trabajo se infirió únicamente por criterios morfológicos (Freshney, 2010). La construcción de curvas de crecimiento midiendo densidad celular cada 24 horas durante al menos 96 horas tras la siembra permitiría calcular el tiempo de duplicación real de HT-29 bajo las condiciones específicas del laboratorio, que la literatura reporta en aproximadamente 26 horas bajo condiciones estándar (D'Alessio et al., 2013), aunque puede variar según el número de pasaje y las condiciones de cultivo. Junto con una cuantificación sistemática de viabilidad en cada subcultivo, estos datos constituirían una caracterización operativa mínima que respaldaría cualquier experimento posterior con estas células.

3.5.2 Detección y manejo de contaminación

La contaminación se detectó mediante dos indicadores observacionales: turbidez del medio y viraje del indicador de pH (rojo fenol) hacia amarillo intenso, compatible con acidificación acelerada por actividad metabólica microbiana. La confirmación se realizó por observación directa al microscopio invertido, donde la presencia de estructuras no celulares (esféricas, filamentosas o granulares) permitió orientar el tipo de microorganismo sin llegar a una identificación específica, dado que no se contó con recursos para pruebas microbiológicas. Ante la detección de contaminación, los cultivos afectados fueron descartados e inactivados con hipoclorito de sodio al 5 % como medida de bioseguridad. El estado de las placas control incluidas en cada siembra se registró en paralelo para determinar el origen probable de cada episodio de contaminación.

4. RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados operativos del cultivo de ambas líneas. Los datos numéricos reportados corresponden a conteos realizados con cámara de Neubauer en dilución 1:2, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.4.1. Las observaciones morfológicas se basan en microscopía de campo claro a 40× con registro fotográfico por dispositivo móvil a través del ocular del microscopio; esta técnica tiene limitaciones de resolución que deben considerarse al interpretar las imágenes.

4.1 Establecimiento y mantenimiento de la línea celular HT-29

Se realizaron tres siembras independientes de HT-29. En cada una se incluyeron tres placas con células y tres placas control con medio sin inóculo, siguiendo el esquema descrito en la sección 3.4.2.

El conteo post-descongelación previo a la primera siembra arrojó una densidad de 7×10^5 células/mL. Las dos primeras siembras transcurrieron sin incidentes. Las células se adhirieron a la superficie de cultivo dentro de las primeras 48 horas y mostraron, en esa fase temprana, baja densidad con células dispersas en proceso de adhesión inicial, tal como se observa en la Figura 1. A las 48 horas, la morfología fue poligonal con tendencia a organizarse en monocapa (Figura 2), como se describe en la literatura para HT-29 bajo condiciones de cultivo en DMEM con alta glucosa (Khodavirdipour et al., 2021). Al alcanzar aproximadamente 70 % de confluencia, el conteo mediante cámara de Neubauer en dilución 1:2 arrojó una densidad de 7×10^5 células/mL en ambas siembras, calculado mediante la fórmula estándar ya descrita. La coincidencia entre ambos conteos al momento del subcultivo indica que el comportamiento proliferativo de HT-29 fue consistente entre las dos siembras exitosas.

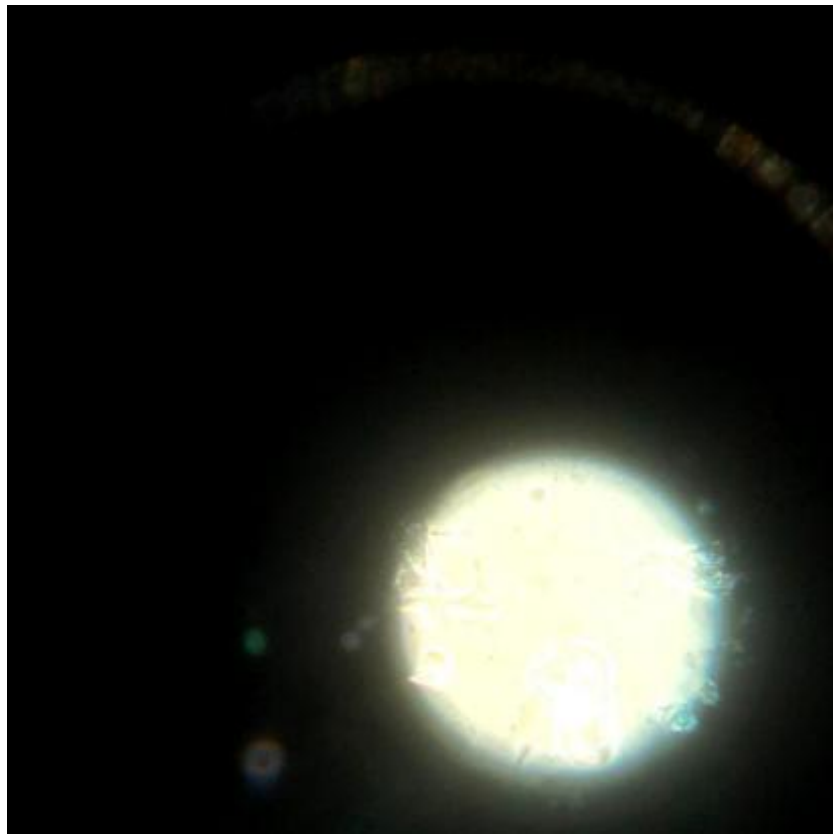


Figura 1. Línea celular HT-29 inmediatamente post-siembra (primera siembra). Microscopía de campo claro, 40×. Se observa baja densidad celular con células dispersas en proceso de adhesión inicial a la superficie de cultivo. La morfología es menos definida que en etapas posteriores, coherente con una fase temprana de establecimiento. Fotografía tomada con dispositivo móvil a través del ocular del microscopio invertido.

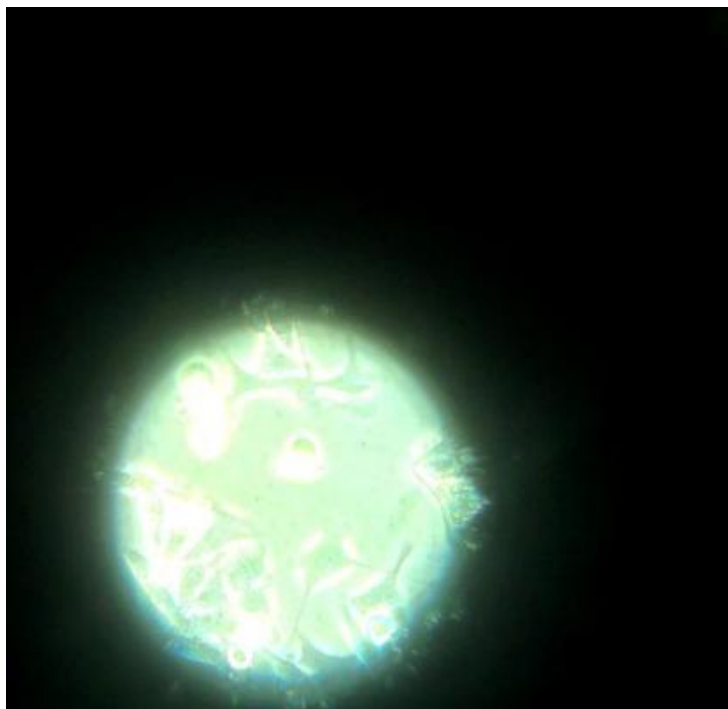


Figura 2. Línea celular HT-29 a las 48 horas post-siembra (segunda siembra). Microscopía de campo claro, 40×. Se observa morfología poligonal característica con organización en monocapa; confluencia estimada visualmente en aproximadamente 70 %. Las células muestran adherencia uniforme y bordes relativamente definidos. Fotografía tomada con dispositivo móvil a través del ocular del microscopio invertido. Nota: las imágenes de este trabajo carecen de barra de escala calibrada, dado que el sistema de captura no permitió su incorporación directa; el aumento indicado (40×) es el del objetivo del microscopio. En trabajos futuros se recomienda incorporar barras de escala mediante software de análisis de imagen (ImageJ u equivalente) y anotar el porcentaje de confluencia sobre la imagen para facilitar la comparación entre observaciones.

En la tercera siembra, tras el primer cambio de medio a las 48 horas, se detectaron alteraciones en el cultivo: el indicador de pH viró hacia amarillo y la densidad celular descendió respecto a lo esperado para ese punto del cultivo. La observación microscópica confirmó la presencia de estructuras esféricas con halo refringente, compatibles morfológicamente con microorganismos fúngicos (Figura 3), aunque no fue posible realizar identificación específica por falta de recursos microbiológicos. Las placas

control de esa misma siembra con únicamente medio de cultivo permanecieron sin alteración visible. Este contraste entre las placas con células contaminadas y los controles sin alteración permite atribuir el episodio a un evento ocurrido durante la manipulación en esa sesión de cambio de medio, y no a una falla del ambiente general del laboratorio.



Figura 3. Episodio de contaminación fungica en el cultivo de HT-29 (tercera siembra). Microscopía de campo claro. Se observan estructuras esféricas con halo refringente, morfología orientadora de microorganismos fúngicos (posiblemente levaduras). No se realizó identificación microbiológica específica. La contaminación se detectó también por turbidez del medio y viraje del indicador de pH hacia amarillo. Fotografía tomada con dispositivo móvil a través del ocular del microscopio invertido; la resolución de la imagen limita la precisión de la descripción morfológica.

El cultivo afectado fue descartado en su totalidad e inactivado con hipoclorito de sodio al 5 %. No se realizó una nueva siembra de esta línea dentro del periodo de trabajo.

4.2 Establecimiento y mantenimiento de la línea celular SW480

Para SW480 se siguió el mismo esquema de tres siembras empleado con HT-29: tres placas de cultivo con células y tres placas control con medio sin inóculo por ensayo. El

conteo post-descongelación, realizado con cámara de Neubauer en dilución 1:2 antes de la primera siembra, registró una densidad de 3×10^5 células/mL. Este es el único dato cuantitativo válido para SW480 en este trabajo, ya que corresponde al momento previo a la siembra y es independiente de las condiciones del cultivo posterior.

Desde la primera observación, SW480 mostró un comportamiento morfológico diferente al de HT-29: las células presentaron contornos más irregulares, menor homogeneidad en la distribución sobre la superficie de cultivo y menor capacidad de adhesión evidente (Figura 4). Ese patrón corresponde al fenotipo menos diferenciado descrito para esta línea (Bourgine et al., 2012). Sin embargo, dado que el medio empleado no era el óptimo para SW480, no es posible determinar si las diferencias morfológicas observadas reflejan propiedades biológicas de la línea, el efecto del medio inadecuado, o una combinación de ambos.

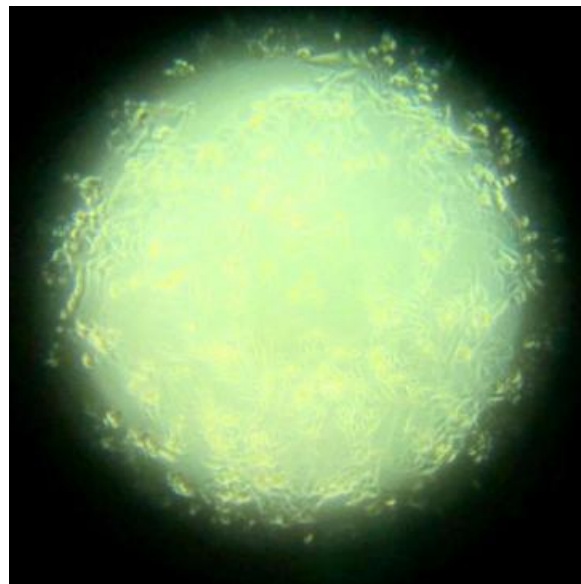


Figura 4. Línea celular SW480 a las 48 horas post-siembra. Microscopía de campo claro, 40×. Se observa morfología celular irregular con menor organización en monocapa respecto a HT-29 a igual aumento (Figura 2). Las células muestran contornos menos definidos y distribución heterogénea sobre la superficie de cultivo. Fotografía tomada con dispositivo móvil a través del ocular del microscopio invertido.

En los tres ensayos de SW480, tanto las placas de cultivo celular como las placas control con solo medio presentaron contaminación microbiológica. La contaminación fue uniforme en todos los recipientes con células o sin ellas: turbidez del medio y viraje del indicador de pH. La observación microscópica directa reveló estructuras filamentosas morfológicamente compatibles con bacterias (Figura 5), de naturaleza distinta a la contaminación observada en HT-29. Que los recipientes con únicamente medio de cultivo sin células, sin tripsinización ni manipulación adicional tras colocarlos en la incubadora también resultaran contaminados de manera consistente en los tres ensayos indica que la fuente no puede atribuirse al procedimiento de siembra ni al material celular. El origen fue ambiental, relacionado con las condiciones del laboratorio durante ese periodo, y estuvo fuera del control del experimentador.

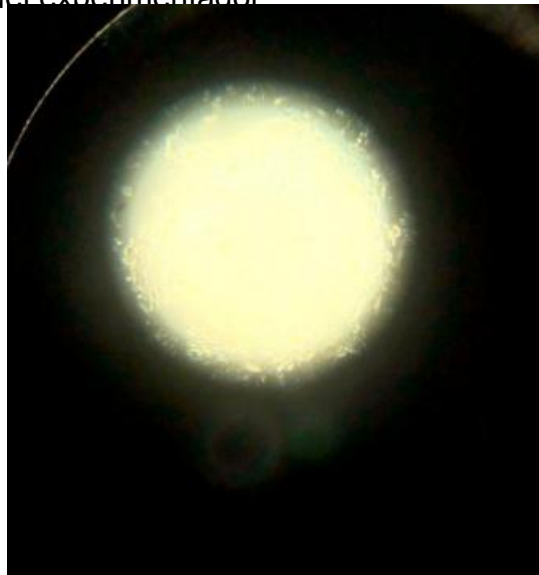


Figura 5. Contaminación bacteriana en el cultivo de SW480. Microscopía de campo claro, 40×. Se observan estructuras filamentosas de morfología orientadora de bacterias, que ocupan densamente el campo de visión. La naturaleza filamentososa de esta contaminación difiere de la morfología esférica observada en HT-29 (Figura 3), lo que indica la presencia de distintos agentes microbianos en ambos episodios. No se realizó identificación microbiológica específica. Fotografía tomada con dispositivo móvil a través del ocular del microscopio invertido.

Todos los cultivos fueron descartados e inactivados con hipoclorito de sodio al 5 %, siguiendo el mismo protocolo de bioseguridad aplicado para HT-29.

4.3 Comparación operativa entre HT-29 y SW480

La Tabla 2 resume los resultados operativos de ambas líneas bajo las condiciones del laboratorio. HT-29 produjo datos válidos en dos de tres siembras, mientras que SW480 no generó cultivos evaluables en ninguno de los tres ensayos. Esa diferencia no refleja ninguna propiedad biológica de las líneas: se explica por las condiciones ambientales del laboratorio durante el periodo de trabajo con SW480, no por las características internas de la línea. La comparación funcional entre ambas líneas en términos de propiedades celulares, moleculares y de diferenciación descansa en la revisión bibliográfica del marco teórico, no en observaciones experimentales directas de este trabajo. Esta distinción define qué puede afirmarse con base en los datos propios y qué proviene exclusivamente de la bibliografía.

Tabla 2. Resumen operativo del cultivo de HT-29 y SW480 bajo condiciones de laboratorio básico.

Parámetro	HT-29	SW480
Siembras realizadas	3	3
Siembras con datos válidos	2	0
Densidad post-descongelación (células/mL)	7×10^5 (siembras 1 y 2)	3×10^5 (dato pre-siembra, no concluyente para el cultivo)
Morfología observada	Poligonal, monocapa organizada	Irregular, adhesión heterogénea
Episodios de contaminación	1 (tercera siembra)	3 (en todas las siembras)
Placas control afectadas	No	Sí, en los tres ensayos

Parámetro	HT-29	SW480
Fuente probable de contaminación	Manipulación durante cambio de medio	Ambiental
Manejo de cultivos contaminados	Descarte e inactivación con NaOCl al 5 %	Descarte e inactivación con NaOCl al 5 %

5. DISCUSIÓN

5.1 Comportamiento de HT-29 bajo condiciones de laboratorio básico

El comportamiento de HT-29 fue coherente con lo descrito en la literatura para esta línea bajo condiciones de cultivo en DMEM con alta glucosa. La densidad de 7×10^5 células/mL al 70 % de confluencia en dos siembras independientes se encuentra dentro del rango reportado en estudios con condiciones similares, y la morfología poligonal organizada en monocapa corresponde al fenotipo propio de HT-29 en estado proliferativo activo, antes de cualquier inducción de diferenciación (Ataee et al., 2010). Que los dos conteos coincidieran tiene utilidad práctica, aunque debe leerse con reserva. Dos puntos de medición no bastan para establecer reproducibilidad estadística, y no puede descartarse un sesgo sistemático en la lectura de la cámara de Neubauer. Lo que sí puede decirse es que el protocolo fue suficientemente estable para producir resultados consistentes dentro de las condiciones del laboratorio un punto de partida documentado para el uso futuro de HT-29 en ese mismo espacio.

El episodio de contaminación en la tercera siembra, ocurrido tras el primer cambio de medio, no afecta la interpretación de los datos previos. El esquema de placas control fue útil para interpretar ese incidente: los controles de esa misma siembra no mostraron alteración, lo que descarta un origen ambiental y apunta hacia la manipulación durante esa sesión como fuente probable. Errores de este tipo ruptura de la técnica aséptica durante la manipulación son frecuentes en laboratorios con condiciones básicas y son

una de las causas más comunes de pérdida de cultivos en etapas tempranas de establecimiento (Capes-Davis, 2018). La ausencia de una cuarta siembra dentro del periodo de trabajo limitó las posibilidades de confirmación, aunque los datos de las dos siembras exitosas son interpretables en sí mismos.

5.2 El uso de DMEM para SW480 y sus implicaciones

Cultivar SW480 en DMEM con 5 % de CO₂, en lugar del Leibovitz L-15 recomendado, afectó las condiciones de cultivo de manera que no puede ignorarse al interpretar los resultados. Como se describe en la sección 2.4.2, el sistema de tamponamiento del DMEM depende de la presencia de CO₂ exógeno para mantener el equilibrio ácido-base mediante el par bicarbonato/ácido carbónico. Cuando el CO₂ disuelto en el medio se combina con el agua, forma ácido carbónico, que se disocia y reduce el pH. En condiciones normales de cultivo con DMEM, este efecto está compensado por el bicarbonato presente en el medio. Para SW480, cuya caracterización se ha realizado en L-15 un medio tamponado sin dependencia de CO₂, esta dinámica de pH no corresponde a sus condiciones estándar y puede generar estrés ácido que afecta la adherencia, la morfología y la proliferación celular.

Para dar una referencia concreta: el DMEM suplementado con bicarbonato de sodio (3.7 g/L) en atmósfera de 5 % CO₂ mantiene el pH entre 7.2 y 7.4 en condiciones de cultivo estándar (Freshney, 2010). El medio Leibovitz L-15, en cambio, no depende del CO₂ y mantiene su pH entre 7.0 y 7.6 mediante tampones de sales fosfato, galactosa y L-glutamina (Leibovitz, 1963). Aunque los rangos se solapan parcialmente, la dinámica de acidificación es distinta: en DMEM con CO₂, el pH puede descender de forma más pronunciada conforme aumenta la actividad metabólica celular o disminuye la renovación del medio. Para SW480, una línea caracterizada en condiciones de pH estable sin CO₂, esta variabilidad representa un factor de estrés no controlado que puede afectar la adherencia, la organización del citoesqueleto y la tasa proliferativa (Freshney, 2010). Contar con una incubadora sin CO₂ es, por tanto, un requisito previo antes de intentar nuevamente el cultivo de esta línea. La menor densidad post-descongelación registrada para SW480 3×10^5 células/mL frente a los 7×10^5 de HT-29 tampoco puede atribuirse directamente a una diferencia intrínseca entre las líneas, ya que el protocolo de

criopreservación recibido difería y el efecto del medio inadecuado no puede descartarse. La decisión de usar DMEM respondió a una restricción concreta del equipamiento disponible, no a una elección de diseño.

5.3 La contaminación ambiental en SW480 como hallazgo metodológico

El hallazgo que más informa desde el punto de vista metodológico no es la diferencia de densidad entre líneas, sino la contaminación sistemática de las placas control en los tres ensayos de SW480. Que las placas con solo medio sin células, sin tripsinización ni manipulación adicional tras colocarlas en la incubadora también resultaran contaminadas en los tres ensayos es concluyente: la fuente no puede atribuirse al procedimiento de siembra ni al material celular, sino al ambiente del laboratorio durante ese periodo. En cultivo celular, los controles negativos recipientes con medio sin inóculo tienen exactamente esta función: distinguir entre contaminación introducida por el operador o el material biológico, y contaminación presente en el ambiente del laboratorio independientemente de la manipulación (Gagnon et al., 2013). Cuando los controles negativos resultan positivos, la conclusión es que la fuente es ambiental. El patrón registrado en los tres ensayos de SW480 todos los recipientes contaminados, con células o sin ellas apoya con claridad esa interpretación.

Las fuentes más frecuentes de contaminación ambiental en laboratorios de cultivo celular incluyen corrientes de aire no filtradas, superficies contaminadas fuera de la cabina de bioseguridad, materiales porosos en el entorno de trabajo y tráfico elevado de personas en el área (Capes-Davis, 2018). Sin pruebas microbiológicas específicas no es posible identificar el agente ni la fuente exacta, lo cual es una limitación declarada del estudio.

Este hallazgo tiene una implicación práctica directa para el laboratorio: antes de intentar nuevamente el establecimiento de SW480, habría que revisar las condiciones ambientales del espacio: eficiencia del filtro HEPA de la cabina, frecuencia de descontaminación de superficies y control del acceso al área durante la incubación.

5.4 La ausencia de autenticación y sus implicaciones sobre los datos

Trabajar con líneas sin certificación de autenticidad (perfil STR) ni historial de pasajes es una condición común en laboratorios universitarios con material donado, pero afecta la interpretabilidad de los datos en aspectos que vale detallar. El ICLAC estima que más de 1,000 líneas celulares en uso activo presentan problemas de identidad, incluyendo contaminación cruzada con líneas de mayor capacidad proliferativa (Xu et al., 2020). El caso más documentado es la contaminación generalizada con células HeLa, detectada retrospectivamente en colecciones de todo el mundo (Capes-Davis, 2018). Para HT-29 y SW480 específicamente, ambas líneas tienen perfiles STR publicados y disponibles en bases de datos de acceso libre como la del ATCC, lo que hace técnicamente posible una verificación comparativa incluso sin autenticación formal, siempre que el laboratorio disponga de acceso a electroforesis capilar. Sin esa verificación, no es posible afirmar con certeza que el material recibido correspondía a HT-29 y SW480 en sus fenotipos estándar.

Las observaciones registradas para HT-29 son coherentes con la literatura, pero sin autenticación STR no es posible hacer afirmaciones sobre propiedades moleculares o metabólicas específicas a partir de los datos obtenidos. Para reducir esta incertidumbre en trabajos futuros, el registro sistemático del número de pasajes desde la recepción es una medida mínima que no requiere equipamiento especializado y que al menos fija un punto de partida documental (Kleiveland y Lea, 2015). La autenticación por perfil STR, aunque tiene un costo, es el único método que garantiza la identidad del material; los perfiles de referencia de HT-29 y SW480 están disponibles en la base de datos pública del ATCC, lo que hace posible la verificación comparativa cuando se dispone de electroforesis capilar (ATCC, 2022). Las Buenas Prácticas de Cultivo Celular (GCCP) establecen criterios mínimos para garantizar la reproducibilidad: obtención de material de fuentes verificadas, registro de cada manipulación, stocks a bajo número de pasaje y verificación periódica de contaminación por micoplasma (Hartung et al., 2002; Masters y Stacey, 2007). Esta última merece atención especial porque, a diferencia de la contaminación bacteriana o fúngica, no genera turbidez visible ni viraje del pH; puede permanecer sin detectarse durante semanas mientras altera la expresión génica y los resultados experimentales (Capes-Davis, 2018). En este trabajo no se realizaron pruebas

de micoplasma, limitación que debería subsanarse en cualquier réplica futura mediante tinción con Hoechst 33258 o PCR específica.

5.5 Alcance y valor de los resultados obtenidos

La información generada sobre HT-29 densidad celular post-descongelación y al 70 % de confluencia, morfología consistente con la literatura, comportamiento durante el subcultivo y caracterización de un episodio de contaminación puntual queda como referencia concreta para el uso de esta línea en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ. La literatura científica reporta habitualmente resultados de experimentos con líneas ya establecidas; rara vez documenta el proceso de establecimiento inicial en laboratorios universitarios con recursos básicos. La experiencia con SW480, aunque no produjo datos válidos sobre el comportamiento de la línea, documentó un problema ambiental del laboratorio que de otra forma habría pasado desapercibido. Identificar que las condiciones del espacio no son adecuadas para el establecimiento de nuevos cultivos es información necesaria para cualquier mejora futura, y su registro mediante el esquema de placas control tiene valor diagnóstico concreto.

Para repetir este trabajo con resultados más completos hacen falta al menos tres cambios: una segunda incubadora sin CO₂ para cultivar SW480 en L-15; verificación de la autenticidad de las líneas mediante perfil STR o comparación con perfiles publicados en la base de datos del ATCC; y evaluación microbiológica del ambiente de trabajo incluida la cabina de bioseguridad antes de iniciar nuevos cultivos. Los dos últimos no requieren equipamiento especializado y están al alcance de laboratorios universitarios con recursos comparables a los de este trabajo. Trabajos que documenten el proceso de establecimiento en lugar de los resultados del experimento son poco frecuentes en la literatura regional; este tipo de reporte cubre un hueco práctico real para grupos que inician trabajo con líneas celulares sin infraestructura avanzada. Con esas condiciones resueltas, las líneas de investigación más directas desde la perspectiva de la nutrición serían: evaluación del efecto antiproliferativo de compuestos nutraceuticos presentes en alimentos de consumo habitual en México, como extractos de chile, cacao o aguacate,

mediante ensayos de viabilidad (MTT o resazurina); estudios de citotoxicidad diferencial entre células tumorales (HT-29 o SW480) y células no tumorales, para establecer índices de selectividad de ingredientes alimentarios funcionales; y análisis de la modulación de marcadores inflamatorios IL-6, IL-8, TNF- α en respuesta a componentes dietéticos, usando HT-29 como modelo de epitelio intestinal bajo condiciones de estrés. SW480, una vez establecida en condiciones adecuadas con L-15 sin CO₂, sería el modelo de elección para evaluar el efecto de compuestos dietéticos sobre vías de progresión tumoral como la transición epitelio-mesenquimal, dada su mutación activante en KRAS y su respuesta documentada a TGF- β 1 (Kleiveland y Lea, 2015).

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que siguen se derivan de las observaciones registradas durante el trabajo experimental y no van más allá de lo que esos datos permiten sostener.

HT-29 logró establecerse satisfactoriamente en dos de tres siembras bajo las condiciones de cultivo empleadas. El conteo post-descongelación y los conteos al 70 % de confluencia en ambas siembras exitosas arrojaron una densidad de 7×10^5 células/mL. La morfología poligonal organizada en monocapa observada corresponde al fenotipo descrito para HT-29 en estado proliferativo activo bajo DMEM con alta glucosa.

SW480 no pudo establecerse durante el periodo de trabajo. La contaminación sistemática de las placas control en los tres ensayos recipientes con solo medio, sin manipulación celular indica un origen ambiental del problema, independiente del procedimiento de siembra. Este hallazgo no caracteriza el comportamiento biológico de la línea: señala las condiciones del laboratorio como el factor limitante, no las propiedades de SW480. La densidad post-descongelación registrada para esta línea (3×10^5 células/mL) se reporta únicamente como dato del material de partida, no como referencia del comportamiento en cultivo.

El uso de DMEM para SW480, en lugar del medio Leibovitz L-15 recomendado, constituyó una limitación metodológica derivada del equipamiento disponible. Sus posibles efectos sobre el comportamiento de la línea no pudieron evaluarse de forma

aislada debido a los episodios de contaminación, y deben considerarse en el diseño de experimentos futuros con esta línea.

El trabajo con material sin certificación de autenticidad ni registro de pasaje introduce incertidumbre sobre la estabilidad genética del punto de partida. Los datos obtenidos para HT-29 son válidos como referencia operativa para ese laboratorio específico, pero no permiten inferir propiedades moleculares particulares sin una autenticación previa del material.

El esquema de control empleado tres placas con células y tres placas con solo medio por siembra demostró ser una herramienta útil para identificar el origen de los episodios de contaminación. Su implementación en laboratorios con recursos básicos permite distinguir entre contaminación procedimental y contaminación ambiental sin necesidad de pruebas microbiológicas especializadas.

Los resultados de este trabajo ofrecen una referencia operativa concreta para el manejo de HT-29 en condiciones de laboratorio universitario con recursos limitados, e identifican los factores que impidieron el establecimiento de SW480. Tres condiciones mínimas harían viable un nuevo intento: verificar el ambiente del laboratorio con placas control antes de iniciar, emplear el medio correcto para cada línea incluyendo una incubadora sin CO₂ para SW480 y autenticar el material mediante perfil STR o comparación con los perfiles publicados en el ATCC. Ninguna de estas tres acciones requiere infraestructura de alta complejidad.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ataee, R., Ajdary, S., Zarrindast, M., Rezayat, M., y Hayatbakhsh, M. R. (2010). Anti-mitogenic and apoptotic effects of 5-HT_{1B} receptor antagonist on HT29 colorectal cancer cell line. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136(10), 1461–1469. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0801-3>
2. Belo, A., Cheng, K., Chahdi, A., Shant, J., Xie, G., Khurana, S., y Raufman, J.-P. (2011). Muscarinic receptor agonists stimulate human colon cancer cell migration and invasion. *American Journal of Physiology — Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(5), G749–G760. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00306.2010>

3. Bourguine, J., Billaut-Laden, I., Happillon, M., Lo-Guidice, J. M., Maunoury, V., Imbenotte, M., y Broly, F. (2012). Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: Comparison between human intestinal biopsy samples and colon cell lines. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(4), 694–705. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.042465>
4. Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., Rizzello, F., Campieri, M., y Brigidi, P. (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012>
5. Capes-Davis, A. (2018). Cell line detective work. *Advances in Molecular Pathology*, 1(1), 229–238. <https://doi.org/10.1016/J.YAMP.2018.06.011>
6. Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
7. D'Alessio, P. A., Ostan, R., Bisson, J. F., Schulzke, J. D., Ursini, M. V., y Béné, M. C. (2013). Oral administration of d-Limonene controls inflammation in rat colitis and displays anti-inflammatory properties as diet supplementation in humans. *Life Sciences*, 92(24–26), 1151–1156. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.04.013>
8. Davies, P. S., y Enns, C. A. (2004). Expression of the hereditary hemochromatosis protein HFE increases ferritin levels by inhibiting iron export in HT29 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25085–25092. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400537200>
9. Del Mar Contreras, M., Sancho, A. I., Recio, I., y Mills, C. (2012). Absorption of casein antihypertensive peptides through an in vitro model of intestinal epithelium. *Food Digestion*, 3(1–3), 16–24. <https://doi.org/10.1007/s13228-012-0020-2>
10. Fonseca, H. C., de Sousa Melo, D., Ramos, C. L., Dias, D. R., y Schwan, R. F. (2021). Probiotic properties of *Lactobacilli* and their ability to inhibit the adhesion of enteropathogenic bacteria to Caco-2 and HT-29 cells. *Probiotics and*

Antimicrobial Proteins, 13(1), 102–112. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09659-2>

11. Freshney, R. I. (2010). Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications (6.a ed.). Wiley-Blackwell.
12. Gagnon, M., Zihler Berner, A., Chervet, N., Chassard, C., y Lacroix, C. (2013). Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. Journal of Microbiological Methods, 94(3), 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.027>
13. Khodavirdipour, A., Zarean, R., y Safaralizadeh, R. (2021). Evaluation of the anti-cancer effect of Syzygium cumini ethanolic extract on HT-29 colorectal cell line. Journal of Gastrointestinal Cancer, 52(2), 575–581. <https://doi.org/10.1007/s12029-020-00439-3>
14. Kleiveland, C. R., y Lea, T. (2015). HT-29. En K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka y H. Wichers (Eds.), The impact of food bioactives on health: In vitro and ex vivo models (pp. 135–140). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_13
15. Leibovitz, A. (1963). The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. American Journal of Hygiene, 78(2), 173–180. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120328> Pan, F., Han, L., Zhang, Y., Yu, Y., y Liu, J. (2015). Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 66(6), 680–685. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1077792> Shirafkan, N., Shomali, N., Kazemi, T., Shanehbandi, D., Ghasabi, M., Baghbani, E., Ganji, M., Khaze, V., Mansoori, B., y Baradaran, B. (2019). microRNA-193a-5p inhibits migration of human HT-29 colon cancer cells via suppression of metastasis pathway. Journal of Cellular Biochemistry, 120(5), 8775–8783. <https://doi.org/10.1002/jcb.28164>

16. Shan, J., Ramachandran, A., Thanki, A. M., Vukusic, F. B. I., Barylski, J., y Clokie, M. R. J. (2018). Bacteriophages are more virulent to bacteria with human cells than they are in bacterial culture: Insights from HT-29 cells. *Scientific Reports*, 8(1), 5091. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23418-y>
17. Shirafkan, N., Shomali, N., Kazemi, T., Shanehbandi, D., Ghasabi, M., Baghbani, E., Ganji, M., Khaze, V., Mansoori, B., y Baradaran, B. (2019). microRNA-193a-5p inhibits migration of human HT-29 colon cancer cells via suppression of metastasis pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(5), 8775–8783. <https://doi.org/10.1002/jcb.28164>
18. Xu, R., Karrow, N. A., Shandilya, U. K., Sun, L. H., y Kitazawa, H. (2020). In-vitro cell culture for efficient assessment of mycotoxin exposure, toxicity and risk mitigation. *Toxins*, 12(3), 146. <https://doi.org/10.3390/toxins12030146>
19. ATCC. (2022). Authentication of human cell lines: Standardization of STR profiling (ANSI/ATCC ASN-0002-2022). American Type Culture Collection. <https://www.atcc.org/resources/technical-documents/cell-line-authentication-test-recommendations>
- Cheok, C. Y., Mohd Adzahan, N., Abdul Rahman, R., Zainal Abedin, N. H., Hussain, N., Sulaiman, R., y Chong, G. H. (2019). Apoptosis induction pathway in human colorectal cancer cell line SW480 exposed to cereal phenolic extracts. *Nutrients*, 11(7), 1517. <https://doi.org/10.3390/nu11071517>
- Hartung, T., Balls, M., Bardouille, C., Blanck, O., Coecke, S., Gstraunthaler, G., y Lewis, D. (2002). Good cell culture practice (GCCP). *ALTEX — Alternatives to Animal Experimentation*, 19(3), 166–167.
- Masters, J. R., y Stacey, G. N. (2007). Changing medium and passaging cell lines. *Nature Protocols*, 2(9), 2276–2284. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.319>
- Ramírez-Garza, S. L., Laveriano-Santos, E. P., Vallverdú-Queralt, A., Almanza-Aguilera, E., Estruch, R., Ros, E., y Casas, R. (2023). Quercetins, chlorogenic acids and their colon metabolites inhibit colon cancer cell proliferation at physiologically relevant concentrations. *Antioxidants*, 12(8), 1517. <https://doi.org/10.3390/antiox12081517>
- Zweibaum, A., Laburthe, M.,

Grasset, E., y Louvard, D. (1991). Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. En M. Field y R. A. Frizzell (Eds.), Handbook of physiology: Section 6, The gastrointestinal system. Vol. IV: Intestinal absorption and secretion (pp. 223–255). American Physiological Society.