

CULTIVOS CELULARES

María E. Castaño O. y Juan C. Zapata J.

Los cultivos celulares han sido una herramienta fundamental en el estudio de los virus gracias a que han permitido el aislamiento y la amplificación, a gran escala, de partículas virales *in vitro*. Antes del desarrollo de esta tecnología, los virus sólo se podían aislar y replicar en modelos animales, con altos costos y poca aplicabilidad. Los cultivos celulares han permitido, además, el descubrimiento de nuevos virus, la producción de vacunas, la exploración de la relación virus-hospedero a nivel celular, el estudio de respuestas inmunitarias, la búsqueda de posibles principios terapéuticos, al igual que el estudio de la bioquímica y la biología molecular de los virus, y de las mismas células; de hecho podríamos decir que sin los cultivos celulares no habría sido posible la biología molecular ni la ingeniería genética de hoy.

En este capítulo revisaremos brevemente el origen de los cultivos celulares y algunos aspectos básicos relacionados con su manejo y mantenimiento, y por último se presentan ejemplos del uso de algunas líneas celulares en el diagnóstico virológico.

Definición e historia

El cultivo de tejidos se refiere al mantenimiento o crecimiento, *in vitro*, de células, tejidos u órganos de origen animal o vegetal. El procedimiento consiste básicamente en liberar las células del tejido original y llevarlas a un ambiente artificial que permita su crecimiento, multiplicación y mantenimiento del metabolismo, de una manera controlada.

La aplicación de los cultivos celulares en Virología está fundamentada en el requisito de los virus de penetrar y multiplicarse en las células, para producir alteraciones morfológicas y metabólicas características. La capacidad de las

células de permitir la multiplicación de virus, y sufrir alteraciones, depende tanto del tejido y la especie de origen como de las condiciones del cultivo y de las características propias del virus.

Dentro de los estudios más relevantes en el establecimiento de los cultivos de tejidos y su aplicación en la virología están los de Von Recklinghausen quien, en 1866, logró mantener vivos, por algo más de un mes, hematíes de anfibio (estas células son nucleadas). Posteriormente, Roux en 1885 y otros investigadores en 1898 y 1902 demostraron la factibilidad de mantener células vivas en medios artificiales. Pero fueron los experimentos de Harrison, en 1907, los que originaron el estudio sistemático de los cultivos de células, *in vitro*. Harrison, diseñó un método sencillo para cultivar células basado en la idea de estudiar el comportamiento de las células sin las variaciones sistémicas que se presentan en el animal; para éste estudio escogió la rana como modelo ya que es un animal de sangre fría y, por lo tanto, sus células no requieren incubación, además de que la regeneración tisular es más común en los vertebrados inferiores. Los avances en la ciencia médica de la época, condujeron a iniciar estudios en animales de sangre caliente debido a que su desarrollo es más parecido al humano. Fue así como, durante este mismo año, se realizaron los primeros intentos de cultivar células obtenidas a partir de tejidos del sistema nervioso con el fin de cultivar virus de polio y rabia.

Steinhardt y colaboradores (1913) fueron los primeros en demostrar que un virus (viruela) sobrevivía por varias semanas en cultivos de tejidos de córnea de conejos y cobayos. Luego, Topacio y Hyde en 1932 y Huang en 1942 observaron que muchos virus, al multiplicarse, producen cambios degenerativos en los cultivos celulares, lo cual se denomina efecto citopático (ECP). En 1949 Enders y colaboradores descubrieron que el virus de poliomielitis puede propagarse en cultivos celulares de origen diferente al tejido nervioso.

La demostración de que tumores humanos también pueden originar líneas celulares continuas como la HeLa (Gey y colaboradores, 1952) enfocó el interés en tejidos humanos, ayudados después por los estudios de Hayflick y Moorhead (1961) con células normales que sobrevivían poco tiempo.

Otro hecho importante, que permitió la generalización del uso de los cultivos de tejidos en los laboratorios, fue el descubrimiento de los antibióticos, los cuales adicionados a los medios de cultivo, resolvieron los problemas ocasionados por la contaminación con bacterias.

En los últimos 30 años los avances en las técnicas del ADN recombinante y la ingeniería genética, han promovido y facilitado, a la vez, los cultivos celulares mediante la producción de sustancias (como hormonas y otros factores de crecimiento) que mejoran las condiciones de cultivo y hacen mucho más eficientes los sistemas existentes y permiten el cultivo de nuevos tipos de células.

Adicionalmente, en la actualidad se están desarrollando líneas celulares transgénicas, las cuales expresan características diferentes a las células originales; dentro de estas características está la expresión de proteínas que potencian la multiplicación de agentes virales o la encapsidación de sus genomas con proteínas foráneas (virus recombinantes); además de conferirles la capacidad de ser infectadas por virus frente a los cuales la línea original no es susceptible. Esto disminuye el tiempo en el diagnóstico, disminuye costos porque ya no sería necesario mantener un gran número de líneas celulares en el laboratorio, abre la posibilidad de avanzar en el estudio de aspectos básicos en agentes virales que no eran cultivables *in vitro*; además, han permitido el avance en una nueva generación de vacunas (partículas virales semejantes a virus).

Clases de cultivos celulares

Después de extraer el órgano o tejido del organismo de origen se pueden obtener, eventualmente, diferentes clases de cultivos, que se caracterizan por su capacidad de replicación y por su capacidad de ser subcultivados. Un subcultivo consiste en transferir células de un cultivo crecido a un nuevo recipiente para que se genere otro cultivo; este procedimiento también se denomina "pase". Dentro de los diferentes tipos de cultivo que se pueden generar tenemos:

1. Cultivos Primarios: Son células provenientes del tejido original y recién transplantadas a condiciones artificiales. Este primer cultivo contiene una población celular variada; después de pases sucesivos la población celular capaz de proliferar más rápidamente predomina, y la que no prolifera o lo hace más lentamente desaparece. Este tipo de cultivo suele tener una duración limitada (no más de 10 subcultivos) por lo que se le llama cultivo celular finito. Las células poseen el mismo cariotipo del tejido original (normal o anormal), el mismo número de cromosomas y la misma cromatina sexual.

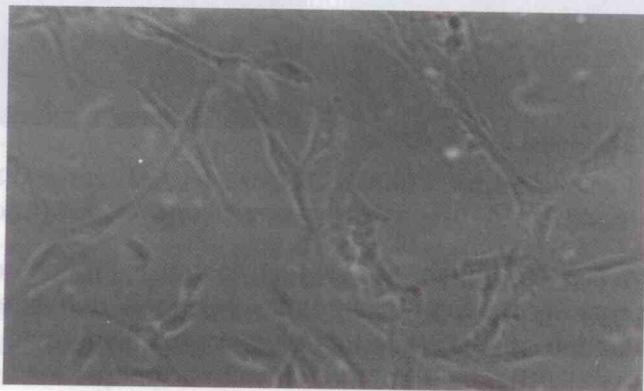


Figura 1. Cultivo primario de fibroblastos bovinos obtenidos por explante.

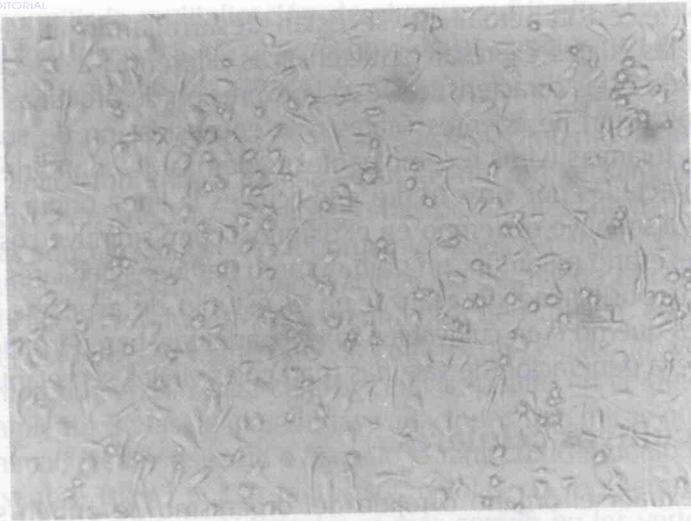


Figura 2. Cultivo primario de macrófagos bovinos.

2. Líneas Celulares: Son células derivadas de un cultivo primario, las cuales pueden subcultivarse in vitro repetidamente. Pueden subdividirse en:

a. Diploides: En éstos cultivos el 75% (o más) de la población, tiene el mismo cariotipo de las células normales de la especie de la cual se origina el tejido. Usualmente se originan de un tejido normal y continúan "normales" a medida que se subcultivan (más de 100 veces).

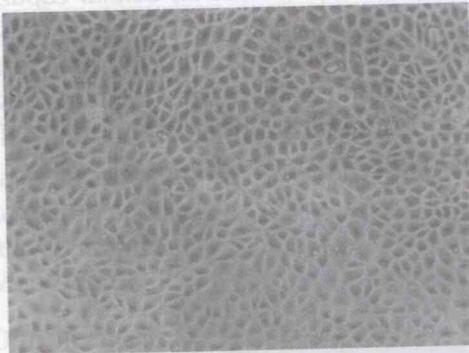


Figura 3. Línea celular MDBK. Cultivo confluyente.



Figura 4. Línea celular MRC-5 con efecto citopático parcial por Citomegalovirus.

b. Heteroploides o continuas: Aquellos en los cuales menos del 75% de la población presenta el cariotipo de las células de origen, debido a la pérdida de cromosomas. Pueden originarse de un tejido normal o anormal, pero se considera que estas células han sufrido una transformación que le confiere características de crecimiento diferentes, entre las que tenemos: inmortalización, pérdida de adherencia, menor dependencia de factores de crecimiento, capa-

ciudad de crecer en agar y de inducir tumores en ratones. La transformación puede ser espontánea o inducida, por ejemplo, mediante transfección con oncogenes o tratamiento con carcinógenos.

3. Cepas Celulares: Es un cultivo derivado, por selección (podríamos decir "clonación") de una célula, desde un cultivo primario o de una línea celular. El nuevo cultivo tendrá propiedades o marcadores específicos que persistirán durante los pases subsiguientes.

Tipos de crecimiento celular

Durante el establecimiento de un cultivo, dependiendo del tipo de células, se pueden obtener dos tipos de crecimiento:

Células adherentes o cultivos fijos: Algunos tipos celulares requieren unirse a una superficie para multiplicarse, por lo que se conocen como dependientes de anclaje. Cuando el cultivo tiene éxito se forma una "monocapa". Para hacer un subcultivo de estas células se deben desprender y esto se puede lograr, dependiendo del tipo de células, de manera mecánica, química o enzimática.

Un cultivo en monocapa se puede obtener de dos maneras según el tipo de recipiente en el cual se siembra y dependiendo de la manipulación durante la adhesión celular: 1) Cultivo estacionario: Durante el período de crecimiento, el cultivo es incubado sin agitación. Las células se sedimentan y se adhieren al fondo del recipiente. 2) Cultivo en agitación: Un recipiente cilíndrico se rota lentamente, de tal forma que las células se unen a la superficie completa del recipiente. Se recomienda para aumentar el área de superficie disponible durante la adhesión celular.

Células no adherentes o cultivos en suspensión: Ciertos tipos de células se multiplican suspendidas en medio líquido; en este medio se pueden sedimentar pero no se adhieren a la superficie del recipiente. El subcultivo se realiza mediante diluciones cuando el cultivo inicial ha adquirido la saturación máxima. Algunas líneas celulares adherentes se pueden adaptar a crecimiento en suspensión.

Factores básicos para la supervivencia celular

Los medios de cultivo y los equipos utilizados para el mantenimiento de las células, deben proveer el ambiente adecuado para el metabolismo celular. Dentro de los requerimientos mínimos tenemos:

Presión Osmótica: En los medios de cultivos celulares, al igual que en los sistemas *in vivo*, el NaCl es la sustancia más importante en el mantenimiento

de la presión osmótica, pero los iones inorgánicos y la glucosa también tienen un papel significativo, por lo tanto su concentración en el medio debe ser cuidadosamente controlada.

Concentración de Hidrogeniones (pH): El pH óptimo para el crecimiento celular está entre 7.2 - 7.4, aunque algunas células pueden tolerar un rango de 6.6 - 7.8; por ejemplo, algunas líneas de fibroblastos normales se desarrollan mejor a un pH de 7.4 - 7.7, las células transformadas lo hacen mejor a pH 7.0 - 7.4, y se ha descrito que algunas células epidermoides pueden ser mantenidas a pH 5.5. Para controlar el pH de los medios, comúnmente, se usa rojo de fenol, que es rojo a pH 7,4 y se torna naranja a pH 7,0 o amarillo a pH 6,5.

El pH del medio guarda estrecha relación con la concentración de CO₂. Durante las primeras horas se produce alcalinización del medio por la pérdida del CO₂, pero ese efecto es neutralizado por el metabolismo celular que disminuye el pH. Aprovechando este principio podemos regular el pH mediante el sistema bicarbonato/CO₂. El bicarbonato es un elemento esencial para las células y debe formar parte del medio, aunque tiene algunas desventajas; entre ellas: 1) El bicarbonato se pierde fácilmente del medio en forma de CO₂, lo que puede repercutir negativamente en el crecimiento celular. Para prevenir que el medio se torne alcalino, la tensión de CO₂ se debe mantener mediante el uso de sistemas cerrados o proveerlo del medio externo. 2) Dado que el pKa del bicarbonato de sodio es 6.1 - 6.3 a 37°C, la capacidad óptima de actuar como buffer está en un rango que no es el óptimo para el cultivo. 3) El bicarbonato puede ser tóxico para algunos tipos de células.

Debido a estas desventajas se tienen alternativas para el sistema buffer, entre ellas tenemos el uso del HEPES y de galactosa; esta última produce menos ácido que la glucosa. Además se puede adicionar buffer TRIS-glycylglicina, ácido oxaloacético o aminoácidos libres de bases. Dentro de las posibilidades anteriores, el buffer más utilizado es el HEPES porque puede usarse en un sistema cerrado, es decir, sin CO₂. Además, posee otras ventajas: 1) Debido a que su pKa es de 7.3, ofrece un pH ideal para el cultivo, 2) No se ha reportado toxicidad para ningún tipo de células, aunque presenta fotosensibilidad degradándose a productos tóxicos para las células por lo que se debe almacenar en recipientes oscuros.

Gases: Dentro de los gases necesarios para la supervivencia celular se encuentran:

Oxígeno: Aunque los requerimientos de oxígeno varían de acuerdo con el tipo de células, la mayoría requieren bajas concentraciones, por lo que generalmente es suficiente la concentración del oxígeno disuelta en el medio. Sin embargo, se debe controlar la cantidad de medio para que haya un buen inter-

cambio gaseoso; se recomienda mantener la profundidad, o altura de la columna de medio líquido, dentro de un rango de 2 - 5 mm (0.2 - 0.5 ml/cm² de superficie).

Dióxido de carbono: El CO₂ está involucrado en múltiples reacciones bioquímicas, lo que hace difícil determinar su efecto directo en el cultivo. Así, la concentración de CO₂ disuelto en el medio va a depender del pH, la concentración de CO₂ libre, la temperatura y la concentración de HCO₃⁻ y otros iones. Sin embargo, cada variable ya ha sido determinada y existen concentraciones estándar para los cultivos de células tanto en sistemas con fuente de CO₂ externa como para sistemas cerrados.

Se recomienda para los cultivos, con una densidad celular baja, utilizar recipientes abiertos y atmósferas de CO₂, debido a que el CO₂ producido por las células no alcanza a suplir los requerimientos. A altas densidades celulares puede no ser necesario adicionar CO₂ a la fase gaseosa; sin embargo, para evitar la fuga del CO₂ del sistema, se deben usar botellas bien tapadas.

Iones Orgánicos: Son necesarios para la regulación de la presión osmótica, para la actividad metabólica y enzimática, y para la adhesión y extensión celular. Los iones esenciales en un medio de cultivo son: Sodio, que proporciona la osmolaridad requerida; potasio, participa en el mantenimiento de la tonicidad celular y además actúa como cofactor enzimático; calcio y magnesio, están íntimamente ligados a los mecanismos de adhesión celular; cloro, carbonato y fosfato, son parte del sistema amortiguador del medio y los dos últimos sirven para el almacenamiento de energía.

Agua: Su naturaleza polar y su propiedad de formar puentes de hidrógeno la hacen un componente fundamental en los sistemas vivos. Participa en numerosas reacciones bioquímicas y determina las propiedades de las macromoléculas. En los sistemas de cultivos celulares se recomienda utilizar agua desionizada, bidestilada o microfiltrada. Los sistemas de filtración modernos suelen incluir una filtración por carbón y desionización de alta calidad.

Carbohidratos: Sirven como fuente de energía para las células. El más utilizado es la glucosa, la cual es metabolizada principalmente por la glicólisis para formar piruvato, que a su vez puede ser convertido a lactato o a acetoacetato para entrar en el ciclo del ácido cítrico y formar CO₂; también se pueden utilizar metabolitos intermedios como el lactato y el piruvato.

Solución de sales balanceadas (SSB): La SSB sirve para la supervivencia básica de la célula y puede usarse para cortos períodos de mantenimiento, pero al adicionar otros componentes, sirve de base para medios más complejos necesarios para la replicación y mantenimiento de células por largos períodos de tiempo.

Las SSB se pueden dividir en dos tipos, los que mantienen el equilibrio con aire en un sistema cerrado a una baja concentración de bicarbonato de sodio (solución de sales de Hank) y los que lo hacen con una fase gaseosa que contiene aproximadamente 5 - 10% de CO₂ a una alta concentración de bicarbonato de sodio (solución de sales de Earle).

Aminiócidos: Necesarios para la formación de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, transporte de iones; además, pueden actuar como buffer (por ser anfotéricos). *In vivo* existen 10 aa esenciales; *in vitro* se necesitan 12: Arginina, Isoleucina, Metionina, Tryptofano, Cystina, Leucina, Fenylalanina, Tirosina, Histyidina, Lysina, Treonina, Valina. La forma más utilizada de los aa son los L-isómeros porque los D-isómeros pueden actuar como inhibidores.

L-Glutamina: Es la principal fuente de carbono para la mayoría de las células en cultivo, genera precursores involucrados en algunas reacciones celulares y en la producción de proteínas. También actúa, junto con la glucosa (y a veces con el piruvato de sodio) como fuente de energía. La glutamina en solución es lábil y tiene una vida media relativamente corta, por lo que debe conservarse a - 20°C.

Vitaminas: Forman parte integral de las coenzimas involucradas en el metabolismo celular. Las más utilizadas son: ácido fólico, ácido pantoténico, inositol, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxal, tiamina, biotina, P-aminobenzóico y ácido ascórbico. Las vitaminas se pueden utilizar de acuerdo a la especialización de las células, por ejemplo, vitamina A en células epiteliales columnares ciliadas.

Suero: El suero le provee a las células algunas proteínas necesarias para el proceso de propagación y adhesión (fibronectina y fetuina), además de compuestos que favorecen el crecimiento del cultivo, entre los que se encuentran: polipéptidos, hormonas y lípidos.

Se pueden utilizar diferentes tipos de suero: humano, de caballo, cabra, ratón, pero el más utilizado es el suero fetal bovino (SFB). Se prefiere el suero de animales jóvenes ya que tiene mayor concentración de factores de crecimiento y menos sustancias interferentes (como inhibidores, toxinas, anticuerpos o agentes infecciosos). El SFB usualmente debe inactivarse por calor a 56°C por una hora con el fin de inhibir posibles agentes infecciosos, el complemento (para evitar la lisis de las células en cultivo) y algunas inmunoglobulinas reactivas.

Antibióticos y Antimicóticos: Usados con discreción y combinados con técnicas de esterilidad, ayudan a prevenir la contaminación microbiana del cultivo celular, aunque no son necesarios para el metabolismo. Los más usados son la

penicilina, estreptomycin y anfotericina B; estos se deben almacenar a -20°C y se debe tener en cuenta que a 37°C son estables por 3 días.

Medios de cultivo

Los primeros ensayos que se realizaron para mantener y propagar las células *in vitro*, usaban medios "naturales" como extractos de embrión de pollo o de proteínas, entre otros. En la búsqueda de medios que permitieran controlar las concentraciones de cada componente, se desarrollaron los medios que se usan en la actualidad.

Los medios de cultivo están constituidos por una solución salina balanceada, suplementada con factores implicados en el metabolismo celular tales como carbohidratos, aa, vitaminas, SFB o líquido amniótico y otros suplementos como lacto-albúmina hidrolizada, extractos embrionarios o de levadura y hormonas entre otros.

Unos pocos medios se pueden esterilizar en autoclave, gracias a que en su formulación no incluyen elementos termolábiles; estos se adicionan después de la esterilización. Los otros medios y la mayoría de suplementos, deben esterilizarse mediante filtración a través de una membrana con poros de 0.22 micras.

Los medios de cultivos, de acuerdo a su composición, se clasifican en:

Medios esencial mínimo (MEM): Como su nombre lo indica contiene los requerimientos mínimos de un medio. Está compuesto de SSB, aa esenciales y vitaminas; sin embargo, según las necesidades de las células se pueden adicionar otros aa, vitaminas, co-enzimas, hormonas, entre otros. A partir de este se preparan los otros tipos de medios.

Medios de crecimiento: Es MEM con 10 a 15% de SFB. Se emplea para iniciar los cultivos debido a su capacidad de inducción de una rápida multiplicación celular.

Medios de mantenimiento: Se usa para mantener las células vivas pero con baja actividad metabólica, atrasando la degeneración celular y aumentando el intervalo en los subcultivos. Es el mismo MEM pero suplementado con 2% de SFB.

Medios selectivos: Son utilizados para favorecer el crecimiento de un tipo de células en particular. Para su uso se deben tener en cuenta dos factores. Primero, el tipo de células, su origen y adaptación previa; segundo, la naturaleza o propósito del cultivo, tiempo de supervivencia, crecimiento y utilización (por ejemplo, estudios metabólicos o microbiológicos).

Medios de congelación: Utiliza como base el MEM, al cual se le añade SFB en altas concentraciones (hasta 50%) y glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO) al 8 o 10%, que protegen las células de los cristales que se forman durante la congelación y descongelación.

Agentes de dispersión celular

Cuando se quiere separar las células del órgano de origen o de la superficie de cultivo, se pueden utilizar la disgregación mecánica o la enzimática.

La disgregación mecánica consiste en desprender las células del tejido o del recipiente de cultivo, por medio de un instrumento como pinzas o bisturí, policías de caucho, pipetas, morteros o por el paso forzado del tejido a través de mallas o jeringas. La desventaja de esta forma de disgregación es el daño ocasionado a las células, por lo que no puede ser usado en todos los tipos celulares.

La dispersión enzimática se recomienda para disminuir el daño que ocurre cuando se utiliza disgregación mecánica. Las enzimas proteolíticas comúnmente usadas son:

Tripsina: Se obtiene a partir de páncreas porcino o bovino; su función básica es la digestión de las proteínas de adherencia. Es ampliamente usada ya que permite dispersar una gran variedad de células. Se utiliza sola, combinada con otras enzimas o con agentes quelantes de calcio para potenciar su actividad. La enzima puede neutralizarse por competición con las proteínas del SFB.

Pronasa: Es preparada a partir del *Streptomyces griseus*. Es más efectiva para disgregar células primarias y diploides pero menos eficiente para disgregar monocapas de líneas continuas. La pronasa no se inactiva por los componentes del suero, por lo tanto se debe remover de las células mediante lavados.

Colagenasa: Preparada a partir del *Clostridium histolyticum*; actúa sobre el colágeno y es más efectiva para dispersar tejido conectivo. Al igual que la pronasa, no se inactiva por la presencia de suero.

También se pueden utilizar los agentes quelantes de los cationes divalentes libres que estabilizan las uniones intercelulares mediante las cuales las células se unen al tejido o a la superficie donde crecen. De estos, el más utilizado es el EDTA o verseno.

Fases de crecimiento celular

Al iniciar un cultivo de células, *in vitro*, las fases de crecimiento celular que se presentan las podemos homologar con las que ocurren en una población

microbiana, las cuales se dividen en cuatro principales. Primero tenemos una fase de iniciación, que se presenta durante las primeras horas de sembradas las células. En esta, las células se encuentran en pequeñas agrupaciones de dos o más unidades y se van presentando algunos cambios en la morfología, asociados a la adherencia a la superficie o soporte sólido.

En la segunda fase los grupos celulares se multiplican, aumentando el tamaño de los islotes. Este crecimiento se acelera, razón por la que esta fase es llamada de crecimiento logarítmico o exponencial. Cuando las células cubren la superficie de cultivo, el contacto de unas con otras (topoinhibición) y la disminución de los nutrientes hacen que disminuya el número de divisiones; esta fase se conoce como estacionaria. Después de algunos días, si las células no son subcultivadas, comienzan su última fase, la denominada de muerte celular; en esta las células aparecen vacuoladas, granuladas y comienzan a desprenderse de la superficie dejando huecos en la monocapa hasta que esta se destruye por completo.

Criopreservación

Una posibilidad interesante de los cultivos celulares es la de poderlos conservar por largos períodos de tiempo (meses o años) a bajas temperaturas (menores de -150°C), en las que las células se mantienen en un estado de animación suspendida hasta que se necesiten; así, si es necesario trabajar varias líneas celulares pero no todas a la vez, es posible ahorrar reactivos, dinero y tiempo. Este procedimiento es útil, además, para resolver la pérdida por contaminación, minimizar los cambios genéticos en líneas celulares continuas y evitar el envejecimiento y posible transformación o la pérdida de las funciones originales de las células.

Las células se suspenden en medio de congelación, se enfrían a un ritmo constante (generalmente 1°C por minuto) y después se introducen en nitrógeno (N_2) líquido. El proceso de descongelación, por el contrario, debe realizarse usando el menor tiempo posible; para ello debe retirarse el vial del N_2 líquido, sumergirlo en el baño María de 37 a 40°C agitándolo suavemente hasta que se descongele completamente; luego el contenido del vial es diluido en medio fresco y llevado a una botella de cultivo.

La función del criopreservante es actuar como agente higroscópico; esto es, que pueden absorber agua dentro y fuera de la célula para evitar la formación de cristales que, de otro modo, romperían las membranas celulares. La elevada concentración de suero contribuye probablemente a mantener la integridad conservando la concentración intracelular de proteínas en las células permeabilizadas por acción del dimetilsulfóxido (DMSO). El glicerol tiene efecto muy parecido al del DMSO.

Las células sólo deben criopreservarse cuando se encuentran en la fase exponencial del crecimiento y en buen estado, es decir, morfológicamente normales y sin indicios de envejecimiento. Cuando se congelan células que están confluentes por más de 24 horas o demasiado crecidas no se recuperarán bien de la criopreservación. Antes de la criopreservación los cultivos también deben ser examinados cuidadosamente en busca de contaminación microbiana ya que no tiene sentido congelar un cultivo contaminado, pues las bacterias también sobreviven a estas condiciones.

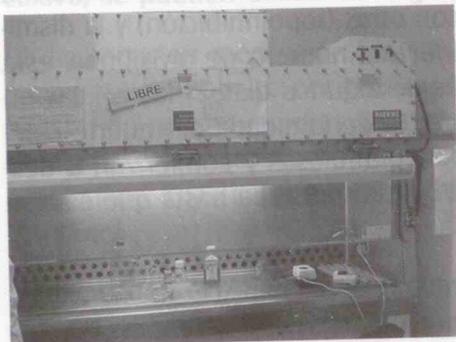


Figura 5. Cámara de flujo laminar.

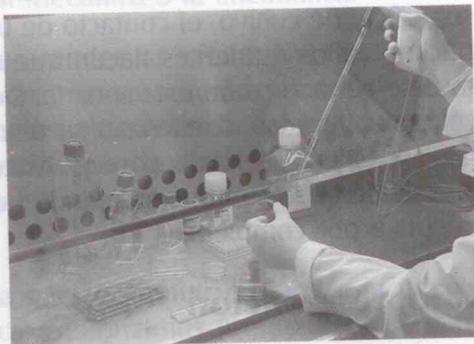


Figura 6. Acercamiento. Se observan diferentes soportes de crecimiento para cultivos celulares.

Contaminación de cultivos celulares

Las contaminaciones pueden afectar no solo el cultivo y el uso de las células, sino también la validez de los resultados experimentales. Los cultivos celulares se pueden contaminar con virus, bacterias, hongos y con células de otros cultivos (contaminación cruzada). Estas contaminaciones pueden tener varios orígenes:

1. Los tejidos originales pueden ser portadores potenciales de virus y otros microorganismos patógenos.
2. Los productos biológicos, principalmente el suero y las enzimas, son las principales fuentes de contaminación, en especial de mycoplasma y nanobacteria.
3. El personal de laboratorio puede contaminar cultivos con su propia flora por medio de sus manos o de su boca.
4. Muchos contaminantes provienen del medio ambiente del laboratorio, pero también la vidriería y el equipo de laboratorio, en especial el que usa agua como las incubadoras y el baño María, pueden servir como posibles fuentes de contaminación.

Se considera que el uso de agentes antimicrobianos puede enmascarar, con el tiempo, la presencia de algunos microorganismos, ocasionando así una infección latente o crónica del cultivo celular con consecuencias desastrosas.

Es muy importante reconocer el tipo de contaminante que afecta los cultivos para poder controlarlo. Las bacterias, hongos y levaduras se pueden observar al microscopio fácilmente; además, su proliferación hace que el medio se torne turbio y se altere el pH. También se puede usar la coloración de Gram y el aislamiento del contaminante en medios específicos.

Entre los agentes que con más frecuencia contaminan los cultivos se encuentra el Mycoplasma, el cual es uno de los microorganismos más pequeños de vida libre (0.15 - 1 μm); por carecer de pared celular es resistente a la penicilina y otros antibióticos; sobrevive y se multiplica fácilmente en cultivos celulares y, de los contaminantes más comunes, es probablemente el más difícil de detectar. Cuando está presente en cultivos celulares, no siempre resulta en alteraciones microscópicas de las células o del medio; muchas infecciones crecen lentamente y no destruyen la célula hospedera pero puede tener numerosos efectos en cultivo, entre ellos:

- Puede inhibir el metabolismo y consecuentemente el crecimiento y las respuestas esperadas.
- Puede alterar la morfología y función de la célula, producir cambios en los cromosomas y en la antigenicidad de la membrana celular.
- Puede destruir las monocapas por efecto citopático similar al producido por virus, puede inducir hemadsorción y hemaglutinación.
- Puede causar un incremento o disminución en la replicación viral.
- Se pueden presentar problemas si las células infectadas con Mycoplasma se usan como antígenos, particularmente en evaluaciones serológicas.

La técnica más utilizada para detectar la contaminación, por este microorganismo, es la coloración con Hoechst, con la que el DNA aparece amarillo-verdoso o azul-grisoso al microscopio de fluorescencia, dependiendo del sistema de filtro usado. Como el núcleo se colorea y el citoplasma de células normales o no contaminadas no lo hace, la observación de partículas extranucleares coloreadas, en la mayoría de los casos, indica contaminación. Estas partículas se pueden encontrar asociadas con la membrana celular, en el espacio intercelular o libres en el medio.

El virus de la diarrea viral bovina también se encuentra como contaminante de cultivos, proveniente generalmente del suero fetal bovino. De él se conocen dos cepas, una citopática y otra no citopática; esta última es la que

frecuentemente se encuentra en los cultivos celulares, produciendo efectos similares a los del *Mycoplasma*.

Recientemente se descubrió la Nanobacteria, que es una partícula cocoide de la que aún se desconoce su familia, posee pared celular y un diámetro de 0.05 - 0.5µm. Es productora de Apatita biogénica en la envoltura (Carbonato de apatita). Tiene unas propiedades inusuales, tales como resistencia al calor y antibióticos convencionales. Es un patógeno intracelular encontrado en humanos, sangre de bovino y en suero comercial para cultivos de células; *in vitro* e *in vivo* es citotóxica, produce formación de cristales y calcificación en la matriz intra y extracelular. Se detecta mediante microscopía electrónica, coloración con el método de Hoechst modificado, Rayos X, tinción Von Kossa y análisis químico.

Además de la contaminación microbiana, también es posible observar una contaminación cruzada. Los laboratorios que manipulan más de un tipo de células deben reconocer la posibilidad de que los diferentes cultivos se puedan mezclar. Por ejemplo, algunos estudios indican que ciertas líneas celulares contienen marcadores de células HeLa. Para prevenir esta contaminación, se debe trabajar un cultivo al tiempo en la cámara de seguridad y el área de trabajo se debe desinfectar entre un cultivo y otro.

Es muy importante prevenir la contaminación, tomando medidas preventivas para controlar al máximo las fuentes de microorganismos indeseables, además de evitar la pérdida de cultivos debida a la contaminación cruzada. Para el trabajo con cultivos celulares se deben tener en cuenta, muy especialmente, las siguientes recomendaciones:

1. Todo el material que tenga contacto con los medios de cultivo y las células debe estar estéril.
2. Mantener las botellas y cajas de petri estériles tapadas hasta el momento de usarlas.
3. Las pipetas estériles deben abrirse solo en el momento de usarlas.
4. No hablar mientras se lleven a cabo técnicas estériles ya que esto genera aerosoles contaminantes.
5. Nunca pipetear con la boca (aunque las pipetas tengan filtro) ya que el *Mycoplasma* puede estar presente en la boca y contaminar los cultivos.
6. No realizar movimientos bruscos dentro de la cabina de flujo laminar ya que esto genera turbulencias de aire que pueden estar cargadas de microorganismos contaminantes.

Cultivos celulares en virología

A continuación se describen algunos ejemplos de las líneas celulares frecuentemente usadas para aislamiento e identificación de agentes virales.

LÍNEA CELULAR	TEJIDO DE ORIGEN	VIRUS que pueden ser aislados en cada tipo celular
HEp - 2	Carcinoma epidermoide de laringe humano	Herpes simplex, Enterovirus, Poliovirus, Adenovirus
MDBK	Riñón bovino	Herpes y Adenovirus bovino, Estomatitis vesicular
MDCK	Riñón canino	Influenza, Adenovirus
MRC - 5	Pulmón embrionario humano	Citomegalovirus
VERO	Riñón de mono	Herpes, Poliovirus
BHK - 21	Riñón de hamster	Estomatitis vesicular, Fiebre aftosa
HeLa	Carcinoma de cervix humano	Poliovirus, Adenovirus
RD	Rhabdomiosarcoma humano	Poliovirus, Herpes simplex
PK 15	Riñón porcino	Estomatitis vesicular, Parvovirus porcino
A. albopictus	Larva de Aedes albopictus	Arbovirus

Nota: Algunas de las líneas celulares que aparecen en la tabla, permiten la replicación de varios agentes virales, pero sólo se describe el sistema óptimo para cada agente.

Perspectivas

Como ya mencionamos, se están haciendo ensayos para clonar células, modificadas genéticamente, para promover la expresión estable de factores que requieran los virus para replicarse, haciéndolas susceptibles o permisivas a infección con diferentes agentes. También existe la posibilidad de reducir la susceptibilidad celular a algunos de los agentes contaminantes provenientes del tejido de origen o de los suplementos de origen biológico, como el caso de retrovirus de mono, el virus de la diarrea viral bovina, entre otros; esto es posible mediante modificación genética de las células, induciendo delección de genes que codifiquen factores esenciales para la entrada o replicación del microorganismo, o bien manipulándolas para que expresen un factor inhibitorio.

El desarrollo simultáneo de la tecnología para la generación de animales transgénicos, ha provisto una herramienta para el estudio de la patogénesis viral y para discernir la importancia funcional de ciertos genes y sus productos durante la replicación viral en animales. El mismo principio puede aplicarse, teóricamente, para la generación de líneas celulares primarias útiles para la detección y el estudio de los virus.

Bibliografía

- Bird BR, Forrester F. Basic laboratory techniques in cell culture. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Centers for Disease Control. 1981.
- Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of Virology, Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. ASM Press, pp 25-33. 2000.
- Fresney R I. Culture of animal cells, A Manual of Basic Technique. 2 nd ed. Alan R. Liss, Inc., New York. 1987.
- Morgan SJ, Darling DC. Cultivo de células animales. Acribia, S.A. Saragoza. 1993.
- Olivo PD. Transgenic cell lines for detection of animal viruses. Clinical Microbiology Reviews, July: 321-334. 1996.