

Cultivos celulares

María Eugenia Castaño. *Bact. Msci. Universidad del Norte.*

A pesar de que el cultivo de tejidos fue considerado inicialmente como una técnica difícil de utilizar, hoy en día, los cultivos celulares son una herramienta poderosa para resolver muchas preguntas fundamentales en biología y medicina. Las dificultades observadas en los comienzos están hoy en día superadas gracias a factores como la disponibilidad de antibióticos, los medios de cultivo de composición definida, las instalaciones asépticas y los materiales plásticos con superficies apropiadas para la adherencia de las células. Los avances técnicos y la aparición de un buen número de compañías comerciales de suministro de medios, sueros, equipo y líneas celulares, han hecho del cultivo celular una tecnología con buena reproducibilidad.

Definición

Las células de animales o de plantas, después de ser removidas del tejido de origen, continúan viviendo si son cultivadas con los nutrientes y condiciones apropiadas. Al ser llevadas al laboratorio, el proceso es denominado cultivo celular. Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células, *in vitro*, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Las células son capaces de dividirse, incrementar su tamaño y, en las condiciones adecuadas, pueden replicarse hasta ser limitadas por algunas variables de cultivo como el consumo total de nutrientes, o la limitación del espacio físico (inhibición por contacto).



Historia de los cultivos celulares

La historia de los cultivos celulares comenzó hace más de 100 años, cuando en 1885 Wilhelm Roux cultivó células de embrión de pollo en solución salina durante algunos días, demostrando que las células embrionarias pueden sobrevivir por fuera del cuerpo del animal de origen. Desde entonces el conocimiento de cómo cultivar células *in vitro* ha aumentado considerablemente.

A principios del siglo XX, el interés por desarrollar los cultivos celulares fue promovido por la necesidad de entender los eventos fisiológicos normales. Adicionalmente, se vio la necesidad de utilizar técnicas de cultivo celular para estudiar el comportamiento de las células animales libres de la influencia sistémica, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés.

El zoólogo estadounidense R.G. Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales. Este investigador fue el primero (1907) que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios; de esta manera pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por extensión a partir del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células, como se creía hasta entonces. Estos cultivos se obtenían en una gota de linfa del anfibio, colgaba de un cubreobjetos (gota pendiente) en una cámara sellada.

En la búsqueda de un medio de cultivo adecuado para la propagación de células embrionarias, Burrows, en 1910, empleó plasma para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio resultó mejor que los anteriormente probados, permitiendo observar el crecimiento de tejido nervioso, corazón y piel.

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos para establecer cultivos de células de mamífero por largos períodos, y consiguieron mantener explantes vivos obtenidos a partir de perros, gatos y otros animales, así como el crecimiento de tumores sólidos. Los mismos autores demostraron además, que la vida de la célula se puede prolongar mediante subcultivos, empleando plasma suplementado con extractos de embrión como medio de crecimiento. Carrel, en 1913 demostró la posibilidad de mantener células extraídas de embrión de pollo, durante un periodo de tiempo superior al de la vida del animal; de hecho, mantuvo células embrionarias de pollo durante 34 años. Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel. Rous y Jones, en 1916, emplearon por primera vez extractos enriquecidos con tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo de esta manera el primer cultivo celular propiamente dicho.

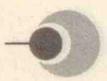
A pesar de que el primer animal del que se establecieron cultivos celulares fue un anfibio (poiquiloterma), rápidamente el interés se centró en el cultivo de células provenientes de animales homeotermos, especialmente de humanos, por su gran aplicación en el campo de la medicina. Sin embargo, en los últimos años y especialmente debido a la problemática del control de plagas e infecciones en agricultura y piscicultura, se ha desarrollado notablemente el establecimiento de líneas celulares de poiquilotermos e invertebrados.

Los primeros cultivos se hicieron a partir de explantes, en los que las células que se crecían se limitaban a las que migraban del fragmento de tejido. Estos cultivos predominaron por más de 50 años, hasta que en 1950 se empezaron a utilizar los cultivos de células disociadas. El embrión de pollo era para entonces una muy buena alternativa ya que permitía una diversidad de cultivos primarios de diferentes tipos celulares. Cuando se logró la posibilidad de obtener cepas puras de ratones, estos se constituyeron en la fuente primordial de líneas celulares continuas.

Hasta los primeros años de la década de los 60 se pensaba que las células normales tenían una capacidad ilimitada de replicarse; consecuentemente, se consideraba que el envejecimiento tenía poco efecto en los eventos intracelulares. En esta misma época este dogma fue debatido después de encontrar que las células normales tienen una capacidad finita de replicación. Este fenómeno puede ser interpretado como envejecimiento a nivel celular, lo cual se explica en la actualidad como el efecto probable del acortamiento de los telómeros en cada ronda de replicación de ADN, lo que ocurre en células normales tanto *in vivo* como *in vitro*. Las poblaciones celulares inmortales anormales (como las del cáncer) superan esta restricción activando la telomerasa, una enzima que cataliza la síntesis de secuencias TTAGGG que componen los telómeros de los mamíferos, manteniendo así una longitud constante; y por tanto, una "juventud" permanente.

Otro de los mayores problemas descritos para el establecimiento de los cultivos celulares, es la aparición de múltiples contaminaciones microbianas, dado que la tasa de crecimiento de las células animales es relativamente lenta comparada con los hongos y las bacterias: mientras que estas últimas pueden duplicarse cada 30 minutos aproximadamente, las células animales requieren al menos 18 o 24 horas. Para prevenir estas contaminaciones, entre los años 1920 y 1940, se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el hallazgo y producción industrial de los primeros antibióticos, se logra una mayor ampliación del mundo de los cultivos celulares.

En 1961, Hayflick y Moorhead usaron antibióticos por primera vez y lograron prevenir la contaminación. Posteriormente, estos mismos investigadores demostraron que a partir de células de tumores de origen humano se pueden originar líneas celulares.



Como lo explicaremos mas adelante, se llaman cultivos celulares primarios aquellos obtenidos recientemente de un individuo normal; estos cultivos generalmente tienen una vida relativamente corta; es decir, se pueden realizar unos pocos pases pero el cultivo muy pronto se degenera. Por el contrario, las líneas celulares son aquellas que se pueden subcultivar de manera prácticamente indefinida y esto se logran de forma espontánea y eventual a partir de cultivos primarios; o bien, mediante cultivo de células tumorales, o de células madre, o por estímulo físico, químico o biológico de los cultivos primarios; ejemplo de esto son los clones de linfocitos B de mono, obtenidos por infección con herpes. De alguna manera es necesario que la célula se modifique genéticamente para mantener su capacidad de replicación indefinida.

La importancia de los cultivos celulares, especialmente a gran escala, se volvió evidente con la necesidad de vacunas virales. Las grandes epidemias de polio de los años 40 y 50 promovieron un esfuerzo enorme para desarrollar una vacuna efectiva contra esta enfermedad. Cuando en 1949 se demostró que el poliovirus podía ser cultivado en células humanas, no neuronales, se inició un interés considerable por desarrollar vacunas en este tipo de cultivos. La vacuna contra la polio (la vacuna salk), producida a partir de virus inactivado, se convirtió en el primer producto comercial originado en cultivos de células. Esta vacuna se obtuvo, gracias a los trabajos de John Fenders, Thomas H. Weller y Frederick C. Robins, quienes recibieron el premio nobel (en 1954), por su trabajo de crecimiento de virus en cultivos celulares.

A continuación citamos otros eventos fundamentales en el desarrollo de los cultivos celulares:

1949: Alan Parks desarrolló un protocolo, aún vigente, para la congelación de células.

1952: Gey, Coffman y Kubicek establecieron la primera línea celular continua, las actualmente bien conocidas como células HeLa, obtenidas a partir de un tumor cervical proveniente de la paciente Henrietta Lacks. El medio de cultivo empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.

1954: Rita Levi-montalcini establece que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo. Este trabajo, le representó, a esta investigadora, el Premio Nobel en 1986.

1960: Barski, y en 1964, Littlefield, emplearon técnicas de fusión celular, estableciendo las bases de la genética de células somáticas para el análisis de especies animales, incluyendo al hombre.

1969: Augusti-Tocco y Sato obtuvieron la primera línea celular estable de neuroblastoma mediante el aislamiento de clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables. Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas.

1975: Kohler y Milstein desarrollan la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales, producto de la fusión de dos o más células (conocidas como hibridomas) capaces de producir continuamente un único tipo de anticuerpo. El establecimiento de la tecnología de anticuerpos monoclonales ha permitido estudios en inmunología; y su aplicación a nivel terapéutico les valió, a estos científicos, el Premio Nobel. Actualmente estos anticuerpos son de utilidad diagnóstica y terapéutica y son producidos comercialmente a gran escala.

1976: Sato publicó sus trabajos en los que demuestra que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero.

La tecnología de ADN recombinante (también conocida como ingeniería genética) se desarrolló en la década de los 70s para expresar genes de mamífero en bacterias. Muy rápido fue evidente que un gran número de proteínas complejas (y especialmente aquellas que tienen valor terapéutico) no se pueden producir en bacterias, ya que ellas no tienen el metabolismo apropiado para realizar las modificaciones postraduccionales; por ésto, las células animales genéticamente manipuladas se desarrollaron a gran escala para la producción de dichas proteínas.

En los últimos años, la aplicación de la tecnología del cultivo celular ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares. Adicionalmente, los avances han hecho posible utilizar células humanas de cultivo para uso terapéutico; por ejemplo, en reconstrucción de piel, hueso y otros tejidos, incluyendo endotelio.

Laboratorio y equipos para cultivos de células

Son muchas las condiciones y aspectos a tener en cuenta en el diseño de un laboratorio de cultivo de células. Idealmente el cuarto de cultivo debe estar separado de los otros laboratorios, y debe tener una área reservada para manejar material recién recibido (material en cuarentena). Si esto no es posible, el trabajo debe separarse cronológicamente y utilizando materiales distintos. Además, las superficies de trabajo deben ser cuidadosamente desinfectadas entre actividades. Todo el material debe ser manipulado como potencialmente contaminado hasta que se haya demostrado lo contrario (libre de bacterias, hongos



y particularmente, micoplasmas). Entre los equipos mayores, necesarios para el cultivo de células, tenemos los siguiente:

Cabinas de flujo laminar: Dada la susceptibilidad de los cultivos celulares a contaminaciones, se diseñaron cabinas especializadas en las cuales circula solo aire filtrado y estéril; adicionalmente, dependiendo de su diseño, estas cabinas sirven para contener los patógenos que se trabajen en ella, evitando así que la persona que manipulan los cultivos se infecte. Existen dos tipos de cabina de flujo: vertical y horizontal. La de flujo vertical, conocida también como cabina de seguridad, es la recomendada para trabajar con microorganismos peligrosos dado que el aire de la cabina recircula y es filtrado antes de pasar al medio ambiente. En esta cámara están protegidos tanto las células como el operario. Las cabinas de flujo horizontal por su parte, están diseñadas de tal manera que el aire fluye en forma horizontal, esto es directamente contra el operario, de tal suerte que cualquier contaminación que se genere en la cámara, podría contaminarlo: se protege el cultivo celular pero no está protegido el operario; por consiguiente, en esta cámara solo se puede trabajar con células, pero no con agentes infecciosos. Ambos tipos de cabinas cuentan con filtros HEPA (por la frase en inglés High Efficiency Particle).

Incubadoras: Para su crecimiento, los cultivos celulares usualmente requieren de un ambiente óptimo que les brinde humedad, temperatura específica y una atmósfera con 5-10% de CO₂, dado que el medio usado es estabilizado con el sistema tampón bicarbonato de sodio/ácido carbónico. Las botellas de cultivo deben tener tapas con ventilación para permitir el intercambio gaseoso.

Microscopios: Para observar los cultivos celulares, se usan los microscopios invertidos y con contraste de fase; este contraste permite visualizar mejor las células y algunas de sus estructuras. Adicionalmente, también se usan microscopios comunes para contar las células en suspensión.

Congeladores y refrigeradores: En un laboratorio de cultivos celulares se requiere de diferentes sistemas de enfriamiento para conservar soluciones y células a bajas temperaturas. Los ultracongeladores y los tanques de nitrógeno líquido se utilizan básicamente para preservar células por largos períodos de tiempo. En estos tanques, las células se pueden almacenar bien en la fase líquida (-196°C) o en la fase gaseosa (-156°C).

Tipos de cultivos

Se conoce como cultivo de órganos el mantenimiento de tejidos, órganos completos o fragmentos, de manera que permita la preservación de la arquitectura o función características del mismo. Para ello el órgano se mantiene en un medio del cual obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos, y en el que mantiene su estructura

tridimensional. Este tipo de cultivo permite preservar los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero no permite su propagación, pues si se produce crecimiento, este se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los fibroblastos de sostén, más que al tejido del órgano propiamente dicho. Cuando se trata de pequeños fragmentos de un tejido, se conoce con el nombre de explante.

Los cultivos de células aislados directamente de tejidos de mamíferos se conocen como cultivos primarios. Estos cultivos conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$), su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto (topoinhibición). Se prefieren los cultivos provenientes de tejidos embrionarios, ya que estos crecen mejor que aquellos provenientes de tejidos de adultos. Los tejidos normales, a diferencia de los tejidos tumorales, generalmente dan origen a cultivos finitos, los cuales tienen un tiempo de vida limitado, mientras que los que se originan de tumores dan origen a líneas celulares.

Cuando se inicia un cultivo, las células que crecen son heterogéneas, pero en general, después del tercer pase, el tipo de células que crezca más eficientemente desplaza a las demás y el cultivo empieza a homogeneizarse. Si no se establecen condiciones selectivas, las células del tejido conjuntivo, especialmente fibroblastos, serán las dominantes; para evitarlo, si es el caso, se deben emplear medios selectivos, como es el caso de vinblastina, para eliminar los fibroblastos.

El sustrato para el crecimiento de las células puede ser sólido, semisólido o líquido. Las células animales pueden crecer formando una monocapa; es decir, una película única de células adheridas a la superficie del sustrato (vidrio o plástico). Estas células se dice que son dependientes de anclaje, es decir, de adhesión, y crecen en la superficie hasta cubrir el área disponible, o hasta que se agotan los nutrientes. Esta adhesión es mediada por receptores específicos de las células, localizados en la matriz extracelular. Con excepción de las células hematopoyéticas maduras, de algunas líneas celulares transformadas y de algunas células procedentes de tumores, la mayoría de las células son dependientes de anclaje.

Los recipientes para cultivo deben ofrecer una superficie no tóxica, biológicamente inerte y con una leve carga positiva que facilite la adherencia de las células que son eléctricamente negativas. Los recipientes más convenientes son los de poliestireno tratado, que viene en varias presentaciones adaptables a las necesidades del usuario.

Algunas otras células crecen como cultivos en suspensión; esto es, independientes de anclaje. Es de destacar que en todo tejido existe una fracción o tipo celular que es capaz de crecer en suspensión; a pesar de que su origen no está claro, se cree que se trata de células madre indiferenciadas.



En los cultivos primarios, ocurre una selección de tipo darwiniano, donde las células que crecen más eficientemente bajo estas circunstancias de cultivo, proliferan y desplazan a las demás. Cuando se alcanza la confluencia del cultivo, es decir, cuando las células han llenado la superficie del sustrato disponible, detienen su crecimiento debido a la inhibición por contacto. Cuando se trata de cultivos originados en tejidos neoplásicos, no ocurre la topoinhibición, y las células tienen la tendencia a crecer en focos o grumos.

Subcultivo: Una vez se alcanza la confluencia en el cultivo es cuando se expresan los aspectos más característicos de las células. Es en este estado cuando el parecido morfológico y fisiológico, es mayor al tejido celular de origen. Es también el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario un pase de células, que consiste en subcultivar las células; es decir, removerlas del recipiente original (con ayuda de enzimas proteolíticas, como tripsina, colagenasa o pronasa; generalmente en combinación con quelantes de calcio y magnesio como el EDTA) y sembrarlas en otros recipientes en una concentración apropiada que asegure el desarrollo de una nueva monocapa. Los cultivos en suspensión, por su parte, se subcultivan mediante dilución en medio fresco (no usado) y en algunos casos, con adición de un poco del medio usado, que es portador de factores de crecimiento específicos.

En algunos casos se hace necesario recurrir a un método mecánico para remover las células (policía de caucho), cuando las enzimas no son eficientes para el tipo de células del caso, o bien no es recomendable utilizar las enzimas, para evitar la remoción de receptores de la superficie celular. A propósito, es interesante mencionar que la reacción de proteólisis de la tripsina puede neutralizarse rápidamente con la adición de medio que contenga suero bovino, ya que este contiene α -1 antitripsina, el cual contiene altas concentraciones de proteína que compiten por la enzima y de esta manera, evitan el daño celular. En otros casos, los quelantes de calcio pueden ser suficientes para lograr el desprendimiento celular.

Existen diferencias marcadas en el comportamiento de los cultivos primarios, dependiendo del organismo del que provienen y de las características mismas del tejido; por ejemplo, los hepatocitos de adultos no se establecen más que como cultivo primario, mientras que las células endoteliales de cordón umbilical humano permanecen en cultivo de 3 a 9 pases, y los fibroblastos dérmicos humanos pueden superar los 20 pases. Dependiendo del tipo de células, más temprano o más tarde, todos los cultivos entran en una fase de senescencia, con acumulación de numerosas anomalías, pérdida de funciones especializadas, y finalmente las células mueren.

En algunas ocasiones aparecen en el cultivo células inmortales, que posteriormente forman líneas estables o cultivos celulares permanentes. La explicación para esta inmortalización es desconocida, pero la frecuencia de dicha transformación se incrementa con

infecciones con ciertos agentes virales y con exposición a mutágenos; de donde se deriva que el mecanismo asociado puede ser de orden mutagénico asociado con factores relacionados con el ciclo celular. Las líneas celulares que eventualmente resultan de un cultivo celular primario, presentan diferencias con relación al cultivo primario: cambios en morfología y en el contenido de cromosomas; además estas células tienen una capacidad incrementada de formar tumores en un hospedero inmunodeficiente.

Se considera que la capacidad de un cultivo celular primario para establecerse como línea estable está relacionada directamente con su variabilidad genética. Así, líneas celulares que no llegan a ser estables se mantienen euploides, como es el caso de fibroblastos humanos, fibroblastos de pollo y la glia humana; mientras otras células, que tienen la tendencia a hacerse aneuploides, se transforman con mayor frecuencia en líneas celulares continuas, como es el caso de las células epidérmicas.

Cuantificación de las células y su viabilidad: Para efectos de todos los procedimientos que se vayan a realizar con las células en cultivo, es necesario determinar el número de células; para el efecto se utiliza la cámara de Neubauer y un colorante vital, que permita diferenciar las células vivas de las muertas. Uno de tales colorantes es el azul de tripano que es capaz de traspasar la membrana citoplasmática de las células muertas, mientras que las vivas lo rechazan y se observan claras y refringentes (Dado que este colorante es tóxico y potencialmente carcinógeno, debe manipularse con guantes).

Medios de cultivo

En el organismo, las células y los tejidos constantemente son alimentados con fluidos circulantes en el cuerpo, los cuales proveen nutrientes y oxígeno y remueven productos de desecho del metabolismo celular. Estos fluidos proveen todos los compuestos necesarios para la supervivencia, diferenciación, crecimiento y función de las células *in vivo*. De la misma forma, cuando las células son cultivadas *in vitro*, son completamente dependientes de fluidos de cultivo para sus requerimientos nutricionales. Cada tipo de cultivo celular requiere un medio de cultivo específico y a este se llega por ensayo y error; esto es, no existen fórmulas precisas para el efecto.

Las primeras soluciones utilizadas para cultivos celulares consistían en suero sanguíneo, coágulos de plasma y linfa. Durante la década de los 30, se establecieron los requerimientos nutricionales para el crecimiento de células en cultivo y de ahí se desarrollaron los nuevos medios sintéticos.

En 1950, Morgan formuló el "Medio 199", que permite el crecimiento de células primarias de embrión de pollo. Este medio contiene 61 nutrientes sintéticos, además de 5-10% de suero bovino fetal (SBF).

En 1955, Eagle realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo e identifica 28 sustancias que son esenciales para el crecimiento de células HeLa (humanas) y células L (murinas). Describe que la necesidad de soluciones corporales complejas en el medio de cultivo (como el suero) puede ser satisfecha con una mínima cantidad (1%) de suero de caballo, dializado en un medio definido de moléculas pequeñas (aminoácidos y azúcares, entre otros). El medio basal de Eagle (MBE) incluye, además, glucosa como fuente de energía, 13 aminoácidos como precursores de proteínas, 8 vitaminas como cofactores y seis sales que proveen cofactores metabólicos, controlan el pH y regulan el balance electrolítico. Muchas células requieren, además de los anteriores, 1-5% de SBF como soporte para su crecimiento y es por esta razón que a estos medios se les denomina medios semisintéticos.

Eagle desarrolló posteriormente otro medio, el MEME (medio esencial mínimo de Eagle), el cual contiene concentraciones mayores de aminoácidos y vitaminas. Este es el medio más común en los laboratorios de células, y su mayor ventaja es que permite mantener los cultivos por más tiempo, sin necesidad de cambio de medio. En 1965, Ham introduce el primer medio definido, libre de suero, capaz de mantener indefinidamente algunas células de mamífero en cultivo.

Las soluciones salinas balanceadas (SSB) son mezclas simples de sales con glucosa y se utilizan como diluyente para todos los nutrientes de un medio de cultivo, para lavar tejidos, para mantener las células por períodos cortos de tiempo y para mantener el pH y la presión osmótica.

Las dos SSB más usadas son las desarrolladas por J.H. Hanks y W.R. Earle, las cuales contienen, además, rojo fenol como indicador de pH. Debido a que estas soluciones contienen sistemas tampón a base de bicarbonato, el metabolismo de las células en el cultivo producirá alteraciones en la concentración de hidrogeniones, detectables por el rojo fenol. El color de este indicador a pH 7.2 es rojo y cambia a púrpura a pH mayor de 8.0 y a anaranjado amarillo a un pH menor de 6.6. Las SSB de Hanks son usadas en cultivos para incubar en sistemas cerrados y las de Earle en atmósferas a 5% de CO₂.

Básicamente, las soluciones balanceadas deben contener:

- Iones como Na, K, Ca, Mg, Cl, P.
- Elementos adicionales, tales como hierro, zinc, selenio.
- Fuente de energía: Los azúcares son los más frecuentemente usados; la glucosa es la más común.
- Aminoácidos: Son 13 esenciales en los cultivos celulares.
- Vitaminas: A, B, C, según la especialización de las células que se cultivan.

- Proteínas, péptidos, lípidos, proteínas lipídicas de transporte.
- Micronutrientes como minerales.
- Antibióticos y antimicóticos: Aunque no se requieren para el crecimiento celular, a menudo se usan para controlar el crecimiento de bacterias y hongos contaminantes. Su uso no sustituye las técnicas asépticas.

Generalmente los medios definidos son suplementados con suero como soporte para el crecimiento de la mayoría de las células. El suero aporta inhibidores de proteasa, factores de crecimiento, hormonas, minerales, lípidos, fibronectina y otros compuestos que son importantes para el metabolismo celular, la adhesión y el desplazamiento de las células, la división y la viabilidad celular. Generalmente se usa suero de bovino adulto o fetal, o de caballo y, en algunos casos, de humano. El papel exacto de todos sus constituyentes no es claro.

Se usa suero fetal ya que, a diferencia del suero adulto, contiene mayores concentraciones de factores de crecimiento y menos sustancias indeseables. En todo caso el suero debe ser inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, para desnaturalizar sustancias inhibitoras como proteínas del complemento. En general, el suero se utiliza entre el 5 a 10% para medios de crecimiento y del 1 al 2% para medios de mantenimiento.

El uso de suero también tiene algunas desventajas, como su costo, su composición poco definida, alta variabilidad entre lotes, posible contaminación viral y priónica, presencia de sustancias interferentes, etc. Como alternativas se han diseñado medios libres de suero que contienen componentes esenciales específicos para cada tipo de cultivo.

Según el uso que se le da a los cultivos celulares, los medios se pueden definir como medio de mantenimiento, o de crecimiento, como mencionamos anteriormente. También se utiliza un medio de congelación, que contiene hasta un 20% de SBF, que cumple la función de crioprotector. Los medios selectivos llevan sustancias que favorecen el crecimiento de cierto tipo de células, dependiendo de la especialización que tengan y del uso que se les da en los experimentos. Adicionalmente, se conoce como medio definido aquel del que se conocen todos y cada uno de los componentes y sus concentraciones exactas. Establecer un medio definido supone conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión.

Entre los parámetros que podemos controlar en los cultivos celulares, los más importantes son los siguientes:

Temperatura: La temperatura óptima de incubación depende de la temperatura fisiológica del animal de procedencia de las células: 36.5-37°C, para mamíferos y 40°C,



para aves; sin embargo, la temperatura también puede variar un poco dependiendo del órgano de origen.

pH: El pH ideal del medio de cultivo es 7.2-7.5, pero también se pueden presentar variaciones según el tipo de célula; por ejemplo, los cultivos de piel crecen mejor en pH levemente ácidos. El sistema tampón que se utiliza contiene Na, K, HCO_3 y HPO_4 ; también se ejerce control mediante la atmósfera de CO_2 de la incubadora y si se carece de esta posibilidad se debe utilizar el tampón HEPES(4-(2-hidroxi etil)-1-acido pipe-razinetano sulfoxido)

Humedad: El ambiente húmedo de la incubadora se logra manteniendo un recipiente con agua dentro de la misma.

Fase gaseosa: la concentración de bicarbonato y la tensión de CO_2 deben estar en equilibrio para mantener el pH. En general, las células se cultivan en ambientes de 5-10% de CO_2 , dependiendo de la concentración de NaHCO_3 . El oxígeno generalmente es proporcionado por la atmósfera y es suficiente con el que queda disuelto en el medio de cultivo. Por esta razón es necesario mantener el nivel del medio de cultivo a una altura de aproximadamente 0.5 cm. Algunos cultivos necesitan una concentración de O_2 de hasta el 95%, mientras otros crecen mejor en niveles reducidos de este gas; tal es el caso de los condrocitos y algunas neuronas.

Luz visible: La luz puede tener efectos adversos sobre las células, ya que puede inducir la producción de componentes tóxicos en algunos medios; las células deben cultivarse en la oscuridad, con exposición a la luz lo menos posible. También es importante tener esta precaución con los mismos medios de cultivo.

Consideraciones de seguridad

Por bioseguridad, se debe asumir que todos los cultivos representan un riesgo biológico dado que podrían albergar virus latentes y otros microorganismos. Por esta razón, además de las normas generales de obligatorio cumplimiento, en el laboratorio, es necesario cumplir con algunas reglas específicas para la protección de quien trabaje con cultivos celulares y para los cultivos mismos:

- Para el manejo de cultivos congelados es necesario utilizar guantes térmicos, máscara protectora y delantal anti-salpicaduras
- En el laboratorio de cultivos se debe utilizar una bata de laboratorio exclusivo para este lugar.
- Utilizar guantes y gorro
- Limpiar las superficies de trabajo con desinfectantes (por ejemplo etanol al 70%) entre las operaciones y dejar pasar al menos 15 minutos entre el ma-

nejo de diferentes líneas celulares.

- Evitar el pipeteo bucal.
- Lavarse las manos antes y después de manipular los cultivos y antes de dejar el laboratorio.
- Esterilizar todos los desechos antes de ser desechados.
- Utilizar el nivel de seguridad apropiado según los microorganismos a manipular.

Adicionalmente, es importante señalar algunas prácticas no deseadas en un laboratorio de cultivos celulares:

- Acumulación de desechos dentro de la cabina de bioseguridad o en incubadoras.
- Acumulación de personas en el laboratorio de cultivos.
- Manipulación de células de fuentes desconocidas sin un periodo de cuarentena.
- Utilización de medios de cultivos envejecidos: la vida media del SBF y de la glutamina, por ejemplo, son cortas.

Contaminación de cultivos celulares

Como se discutió antes, la tasa de replicación de las bacterias, hongos y levaduras, es mucho mayor a la de las células eucarióticas. Adicionalmente, los medios de cultivo tienen todos los requerimientos nutricionales necesarios para que estos microorganismos no deseados se multipliquen. En algunas ocasiones, la contaminación se detecta por cambios repentinos del pH del medio. Por lo general, el pH disminuye en contaminaciones con bacterias y aumenta en contaminaciones con hongos. Adicionalmente, el medio cambia de apariencia: se torna turbio, espumoso o con granulaciones microscópicas oscuras. Es necesario hacer controles microbiológicos para comprobar la esterilidad de los medios.

Además de bacterias y hongos, es común la contaminación con micoplasmas. Este tipo de agentes es el más nocivo dado que los micoplasmas generalmente no destruyen los cultivos, ni producen cambios visibles en el medio; solo algunas cepas de micoplasmas son citopáticas. Este tipo de contaminación puede producir cambios en el metabolismo y en la susceptibilidad de las células a los agentes a estudiar; de ahí su potencial para alterar los resultados.

Para la detección de micoplasmas es necesaria la prueba bacteriológica. Este método tiene un límite de detección de 1 unidad formadora de colonia (UFC). Sin embargo hay algunas cepas que no son cultivables. En estos casos, se puede hacer una coloración indirecta de DNA, utilizando el reactivo de Hoechst. Esta técnica es rápida (24 horas)



mientras que el cultivo requiere hasta 4 semanas, pero la sensibilidad es solo de 10 UFC/ml. Para mejorar este resultado se puede combinar la coloración con un cocultivo con una línea celular indicadora como las células Vero. El colorante de Hoechst se une al DNA en forma específica; por tanto los núcleos celulares fluorescen y, cuando hay contaminación con micoplasmas, aparecen también pequeños cocos o filamentos adheridos a las células o libres en el medio. El reactivo de Hoechst es tóxico por ser un intercalante de DNA, consecuentemente debe manejarse con la debida precaución.

Los antibióticos más comúnmente utilizados en cultivos celulares son: la penicilina (inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas), estreptomycin (inhibe bacterias Gram negativas), gentamicina (inhibe tanto Gram positivos como Gram negativos) y anfotericina (antimicótico).

Otro tipo de contaminación en cultivos celulares, es la contaminación cruzada que puede ocurrir cuando se manipulan diferentes tipos de células dentro de la misma cámara simultáneamente. La contaminación de un cultivo con células HeLa es particularmente interesante puesto que éstas tienen ventajas sobre prácticamente todas las demás líneas celulares: tienen un tiempo de generación muy rápido y sus requerimientos nutricionales son más bajos.

Criopreservación

La criopreservación de los cultivos celulares es importante para mantener reservas que son necesarias para tener células disponibles en caso de contaminación y principalmente para disponer de "stocks" de bajo pasaje, pues las células en uso se envejecen con cada pase, y pueden sufrir mutaciones y cambios fenotípicos, hasta que finalmente se degeneran, a menos que sea una línea celular continua o inmortal, como el caso de las células HeLa.

El proceso de congelación es letal para la célula debido a los efectos de los cristales de hielo, que dañan las membranas particularmente al momento de la descongelación. Por tanto, es necesario utilizar agentes crioprotectores y altas concentraciones de SFB (entre 20 y 90%). El crioprotector más comúnmente usado es el dimetil sulfoxido (DMSO) y, en segundo lugar, el glicerol. En las células HL60 el DMSO induce diferenciación, por lo cual su uso como crioprotector no es el indicado.

Se congelan células que se encuentren en fase logarítmica de crecimiento. Las células se desprenden de la fase sólida y se concentran en el medio de congelación a razón de por lo menos 2.000.000 de células/ml (es necesario recordar que la eficiencia de descongelación no es muy alta, lo que justifica esta alta concentración). La velocidad o tasa del

enfriamiento es variable según el tipo de células pero, en general, debe ser de 1 a 3°C por minuto, en forma manual con la ayuda de isopropanol y en viales especiales. También existen máquinas programables para el efecto. Con el isopropanol se logra hacer el proceso más lento hasta alcanzar una temperatura de -80°C (aproximadamente 4 horas). En este momento los viales pueden ser transferidos al tanque de nitrógeno líquido (-196°C), donde las células, teóricamente, se conservan para siempre.

Al contrario de la congelación, el proceso de descongelación debe ser muy rápido para prevenir la formación de cristales cuando la temperatura baja de -50° a 0°C., El vial que contiene las células se lleva del nitrógeno líquido a un baño maría a 37°C y debe agitarse suavemente mientras ocurre la descongelación (~1 min); luego las células se lavan con medio de crecimiento a 37°C, por dos veces y utilizando una velocidad de centrifugación baja (las células en este momento son muy frágiles).

Células madre

Célula madre o "stem cell" se define como una célula progenitora, autorenovable, con capacidad de dividirse por períodos indefinidos en cultivos y capaz de regenerar uno o más tipos celulares diferenciados.

En los animales superiores, las células madre se han clasificado en dos grupos: Células madre embrionarias que se derivan de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocisto (7-14 días), y son capaces de generar todos los diferentes tipos celulares del cuerpo; por ello se llaman células totipotenciales; y células madre órgano específicas derivadas, tras muchas divisiones celulares, de las células madre embrionarias. Estas células son multipotenciales, es decir, son capaces de originar las células de un órgano específico en el embrión, y también, en el adulto. Mas recientemente se ha comprobado que estas últimas células pueden ser inducidas a regenera tejidos distintos al de su órgano de origen.

El ejemplo más claro de células madre órgano-específicas, es el de las células de la médula ósea, que son capaces de generar todos los tipos celulares de la sangre y del sistema inmune. Existen células madre en otros órganos y hasta ahora, en adultos, se han identificado células madre de piel, de grasa subcutánea, de músculo cardíaco y esquelético, de cerebro, de retina y de páncreas, entre otros. Todas éstas células, en principio, podrían cultivarse para su aplicación a la terapia de diferentes enfermedades. Este promete ser el campo de mayor expectativa en la medicina del siglo XXI.



Usos de los cultivos celulares

La investigación médica, principalmente el desarrollo de la virología, la producción de vacunas antivirales y la comprensión de las neoplasias, ha influido de manera muy importante en el desarrollo de los cultivos celulares como una técnica moderna y sofisticada. Una de las principales ventajas de los cultivos es la reproducibilidad de los resultados, pero es necesario tener en cuenta que las células pueden cambiar a lo largo de los pases seriados y, de esta manera, la ventaja anterior desaparece. Por esta razón, se ha desarrollado la técnica de clonación de células para disminuir la variabilidad de los resultados y también se recomienda mantener células congeladas, para conservar los "stocks" de las células originales.

Los mayores campos de aplicación general de los cultivos celulares, entre otros, son los siguientes:

En virología:

- Aislamiento, propagación y cuantificación de virus
- Estudio de la interacción entre células y virus.
- Evaluación de fármacos
- Producción de vacunas antivirales.

En biología molecular y celular:

- Estudio de la estructura y función de genes
- Estudio de oncogenes celulares, carcinógenos y mutágenos
- Estudio del comportamiento de células cancerígenas
- Metabolismo, crecimiento y diferenciación celular
- Factores de crecimiento, acción de hormonas y receptores

En biotecnología:

- Producción de proteínas, como anticuerpos y hormonas.
- Estudios de biotoxicidad de potenciales agentes farmacéuticos
- Producción de hibridomas
- Estudios de biocompatibilidad
- Producción de células de determinado tipo para procedimientos como trasplantes.
- Producción de sustancias biológicas (transgénicas o no) a gran escala

- Producción *in vitro* de clones de plantas de interés comercial.
- Producción de plantas transgénicas

Cultivo de células de plantas

Las células de plantas han sido cultivadas para producir ingredientes necesarios en la industria de alimentos. Recientemente se ha hecho un inmenso progreso en el estudio del metabolismo de las plantas y en el desarrollo de bioprocesos, así como en el diseño y operación a gran escala de biorreactores para cultivos de células vegetales. Un amplio rango de ingredientes de alimentos, tales como harinas, colorantes, aceites esenciales, edulcorantes y antioxidantes, se han logrado producir en cultivo. Japón ha sido el país más activo en esta área. Los productos de Ginseng derivados de cultivos de células en suspensión de *Panax ginseng*, usados en la producción de vinos, bebidas tónicas y licores de hierbas, han sido producidos por una compañía, en Japón, desde 1990.

Ventajas y desventajas de los cultivos celulares en la experimentación científica

Ventajas	Desventajas
Control del ambiente fisicoquímico y fisiológico pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O ₂ , CO ₂ , tensión superficial y, Hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, respectivamente.	Técnica complicada Supone la necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento. Dado que proceden de organismos pluricelulares, son incapaces de crecer en ausencia de nutrientes que simulen el plasma o el fluido intersticial.
Homogeneidad del substrato celular Las células establecidas en cultivo son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se puede obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, contrario a la situación con animales de experimentación.	Inestabilidad genética Muchas de las líneas celulares continuas son inestables, como consecuencia de la aneuploidía. La población celular cambia su composición, pudiéndose encontrar diferencias significativas de una generación a la siguiente.
Motivaciones éticas La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo <i>in vivo</i> pero es una alternativa válida en muchas situaciones.	Validez del modelo <i>in vitro</i> Los cultivos celulares se diferencian del tejido de origen ya que han perdido la organización tridimensional, las interacciones entre los distintos tipos celulares y con la matriz extracelular y carecen de los componentes sistémicos de regulación.

