

# **Cultivo de células animales**

M. Iturralde Navarro y J. Coll Morales

*Departamento de Biotecnología del Instituto Tecnológico para Posgraduados, Madrid*

Publicado en la Revista MEDICINA CLINICA  
Vol. 82 - Núm. 6 - Sábado 18 Febrero 1984 - Págs. 273 al 280

## Cultivo de células animales

M. Iturralde Navarro y J. Coll Morales

Departamento de Biotecnología del Instituto Tecnológico para Posgraduados. Madrid

Desde primeros de siglo la técnica de los cultivos celulares ha aportado un poderoso instrumento analítico para el estudio de los fenómenos celulares, hasta entonces no utilizado. El mismo hecho de conseguir que las células de un organismo vivo sobrevivan y se multipliquen fuera de ese organismo supone el conocimiento y, por lo tanto, el control de todos los requerimientos y mecanismos que funcionan *in vivo*. Sólo puede llegarse a este estado después de muchas pruebas y errores y todavía hay muchos de los requerimientos celulares que siguen siendo un misterio. Las diferencias de comportamiento que puede exhibir un mismo tipo celular *in vivo* e *in vitro* sobre todo después de varios meses o años fuera del organismo hace que no puedan extrapolarse sin más los resultados obtenidos *in vitro* a la situación real *in vivo*. La prueba final siempre es el comportamiento de la célula en su entorno natural. Pero además de estos estudios que podríamos denominar básicos, los cultivos celulares se usan hoy en día para obtención y propagación de híbridos celulares, diagnóstico de enfermedades hereditarias y cáncer, propagación de virus y micoplasmas, estudio de los efectos de fármacos y antibióticos y producción de sustancias orgánicas complejas. Es, por todo ello, que el progreso en el conocimiento y control de esta técnica lleva aparejada su repercusión en un importante abanico de aplicaciones. Debido a que aún existen numerosas lagunas en este conocimiento y a que por lo tanto todavía no podemos controlar totalmente el entorno celular *in vitro* es por lo que los cultivos celulares son un campo de investigación de actualidad.

### Células *in vivo* e *in vitro*

La célula es la unidad funcional del ser vivo. Está limitada por una membrana proteico-lipídica dentro de la cual se encuentra el núcleo celular donde reside la información genética (DNA) y las enzimas que llevan a cabo las reacciones celulares. La membrana permite el paso de algunas sustancias e impide el de otras, con lo que mantiene unas ciertas condiciones en el interior de la célula que hacen posible su funcionamiento y supervivencia. La célula, como individuo perteneciente a un ser vivo, tiene todas sus necesidades satisfechas (tabla 1). Los requerimientos fisicoquímicos,

nutritivos, de crecimiento y de defensa se realizan a través de mecanismos fisiológicos que procura el organismo completo. Hace unas decenas de años se demostró que las células podían extraerse de los tejidos y propagarse *in vitro* en condiciones de esterilidad rigurosas (tabla 1). Entre otras necesidades que había que reproducir en el laboratorio están: las necesidades físicas (pH, osmolaridad) las necesidades nutritivas (aminoácidos, purinas y pirimidinas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y coenzimas y sales), factores macromoleculares de crecimiento y medios de defensa frente a las infecciones. Estas necesidades tanto cualitativa como cuantitativamente difieren según el tejido y la especie, lo que hace complejo el mantenimiento de las células. Es absolutamente necesario reproducir y mantener todos los requerimientos en valores exactos que no se conocen de antemano. Por eso los primeros cultivos se hacían en suero u otros líquidos biológicos; pero además de que estos medios a menudo fallaban, no podía controlarse el cultivo por la sencilla razón de la complejidad molecular de los líquidos utilizados. El siguiente paso se intentó dar en cuanto a la definición de nutrientes y necesidades físicas, en lo que se llamaron los medios definidos, de los que hay ya casi un centenar que son comerciales. Actualmente se avanza lentamente en el conocimiento de un tercer requerimiento que apareció al intentar sustituir totalmente el suero por los medios definidos químicamente: los factores de crecimiento. Estos factores han resultado ser difícilmente caracterizables debido, entre otras cosas, a sus pequeñas concentraciones en el suero, su actuación en conjunto (sinergismo) y sus interrelaciones moleculares entre ellos mismos o con nutrientes. Esto ha hecho que aún hoy día se utilicen para los cultivos celulares medios con 5-10 % de sueros animales indefinidos.

Las células trasplantadas del tejido al tubo de laboratorio (cultivos primarios) mueren al cabo de un tiempo variable pero definido. Raras veces es posible mantener estos cultivos más allá de varias semanas o en cultivo indefinido; cuanto esto sucede dan lugar a las líneas celulares.

Las líneas celulares pueden ser no transformadas o transformadas (tabla 2). La transformación puede ser espontánea o inducida (por agentes químicos o virus y recientemente por transfección) y es notorio el que las células procedentes de tejidos tumorales estén transformadas. Las líneas celulares de uso más frecuente pertenecen a los tres tipos más comunes de células según su aspecto morfológico en cultivo: linfóide, epitelial y fibroblásticas. Las células de tipo linfóide crecen generalmente en suspensión, mientras que tanto las células de tipo epitelial como las fibroblásticas crecen ado-

Correspondencia: Dra. M. Iturralde, Departamento de Biotecnología del Instituto Tecnológico para Posgraduados, Paseo Juan XXIII, 3. Madrid-3

Manuscrito recibido el 27-9-1983.

Med Clin (Barc) 1984; 82: 273-280

TABLA 1

## Requerimientos de las células

| Concepto                           | Crecimiento <i>in vivo</i>   | Crecimiento <i>in vitro</i>              |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------|
| Requerimientos físicos             |                              |                                          |
| pH                                 | Control fisiológico          | Tampones indicadores y % CO <sub>2</sub> |
| Osmolalidad                        | Control fisiológico          | Humedad 100 %                            |
| Oxígeno                            | Hemoglobina                  | Ventilación directa                      |
| Temperatura                        | Control fisiológico          | Termostato                               |
| Redox                              | Control fisiológico          | Agentes reductores                       |
| Substrato                          | Tejidos                      | Plásticos no tóxicos                     |
| Requerimientos nutritivos          |                              |                                          |
| Aminoácidos                        | Suero circulante             | Cambio de medio                          |
| Purinas y pirimidinas              | Suero circulante             | Cambio de medio                          |
| Hidratos de carbono                | Suero circulante             | Cambio de medio                          |
| Lípidos                            | Suero circulante             | Cambio de medio + detergente             |
| Vitaminas y coenzimas              | Suero circulante             | Cambio de medio                          |
| Sales                              | Suero circulante             | Cambio de medio + EDTA                   |
| Factores de crecimiento            |                              |                                          |
| Específicos para cada tipo celular | 100 % de suero               | 5-20 % de suero o factores purificados   |
| Defensa                            |                              |                                          |
| Catabolismo                        | Suero circulante             | Cambio de medio                          |
| Infecciones                        | Anticuerpos y sistema inmune | Antibióticos y esterilidad               |

Las necesidades o requerimientos celulares se han agrupado en 4 tipos distintos: físicos, nutritivos, factores de crecimiento y defensa. Estas necesidades se satisfacen de distinta manera en el organismo (crecimiento *in vivo*) y en el tubo de ensayo (crecimiento *in vitro*). En ambos casos todas las necesidades se tienen que satisfacer para asegurar un crecimiento óptimo.

TABLA 2

## Diferencias en algunas propiedades entre cultivos primarios y líneas celulares

|                                           | Cultivo primario                                                        | Líneas celulares                                                         |                                                                         |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|                                           |                                                                         | No transformadas                                                         | Transformadas                                                           |
| Número de cromosomas                      | Mismo número inicial con pequeña variación entre células; 2n            | Número inicial diferente con considerable variación entre células; > 2n. | Número inicial diferente con considerable variación entre células; > 2n |
| Morfología cromosómica                    | Idéntica a la extensión de la médula ósea del donante                   | A menudo diferente de una extensión de médula ósea del donante           | A menudo diferente a una extensión de médula ósea del donante           |
| Inhibición por contacto                   | Presente                                                                | Presente                                                                 | Ausente                                                                 |
| Duración del crecimiento <i>in vitro</i>  | Finita (50 generaciones)                                                | Indefinida                                                               | Indefinida                                                              |
| Tejido de origen                          | Benigno                                                                 | Benigno                                                                  | Maligno                                                                 |
| Bioensayo de malignidad                   | Negativo                                                                | Negativo                                                                 | Positivo                                                                |
| Frecuencia de desarrollo de las líneas    | Una línea puede desarrollarse en cualquier órgano y en cualquier tiempo | Raro, suceso impredecible                                                | Raro, suceso impredecible                                               |
| Eficiencia de clonaje                     | Baja                                                                    | Alta                                                                     | Alta                                                                    |
| Crecimiento en suspensión <i>in vitro</i> | No                                                                      | Sí                                                                       | Sí                                                                      |

Los cultivos primarios se establecen por disociación de las células de un tejido normal y generalmente se dividen durante varias semanas y luego mueren. Raras veces es posible mantenerlos en cultivo indefinidamente; cuando esto sucede, dan origen a una línea celular no transformada con las características que se dan en la tabla. Cuando el tejido de origen es un tejido tumoral maligno, las células pueden continuar en cultivo durante tiempo indefinido y se dice que están transformadas. Frecuentemente es posible, a partir de células sanas que morirían en cultivo, inducir su transformación haciéndolas «inmortales» mediante la infección con los virus apropiados.

sadas a las superficies de los tubos de cultivo. Estos tipos celulares que crecen en las superficies exhiben el fenómeno denominado inhibición por contacto, es decir, cesan de dividirse cuando llegan a confluir ocupando toda la superficie disponible. Las células transformadas de estos tipos suelen escapar a esta inhibición<sup>1</sup>. Las curvas de crecimiento de cultivos primarios tienen 4 fases: adaptación al medio de cultivo, fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria o de detección del crecimiento y muerte del cultivo. Estas fases se distinguen tanto en cultivos en suspensión como en cultivos en medios semisólidos en los que se puede seguir la evolución de cada tipo celular. Una vez el cultivo entra en crisis, generalmente todas las células mueren. Esto puede suceder en unos pocos días o meses, según el tejido de origen y las condiciones del cultivo. En algunos casos puede observarse una población de células que se recupera y vuelve a crecer en fase exponencial, pudiéndose mantener indefinidamente en esta fase con los cambios de medio adecuados; es entonces cuando se establece una

línea celular. Las líneas celulares pueden guardarse congeladas a  $-196^{\circ}\text{C}$  (en nitrógeno líquido). La descongelación rápida hace que se recupere la línea con aproximadamente un 50 % de viabilidad celular.

## Requerimientos físicos

Los requerimientos físicos pueden agruparse en: pH, osmolalidad, oxígeno, temperatura, redox y substrato.

El pH fisiológico varía de 6,9 a 7,7, lo que corresponde a una concentración de bicarbonato (el tampón fisiológico) de unos 24 mM a 5 % CO<sub>2</sub>. Los tejidos producen CO<sub>2</sub> como consecuencia de la oxidación de carbohidratos y ácidos grasos principalmente. El CO<sub>2</sub> reacciona con el agua contenida en los líquidos fisiológicos dando lugar a iones bicarbonato e iones hidrogeno que alteran el pH. Cada tipo celular en cultivo exhibe una estrecha dependencia del pH. Para mantener un pH fisiológico *in vitro* se usan concentraciones de bicarbonato de 24 mM en los medios de cultivo, así como

incubadores con 5-10 % de  $\text{CO}_2$ . También se han usado medios sin bicarbonato tamponados con herpes en atmósferas naturales. Las células en cultivo producen  $\text{CO}_2$ , el cual, dependiendo del volumen del cultivo, densidad celular y su intercambio gaseoso, puede no ser eliminado lo suficientemente rápido con lo que aumentaría la concentración de iones hidrógeno y bajaría el pH. Por otra parte, al abrir el incubador o mantener los cultivos al exterior se produce una alcalinización del medio que puede llegar a matar las células. Debido a la importancia del control del pH se suele incluir en los medios de cultivo indicadores visuales, como el rojo fenol, que permiten apreciar estas variaciones y cuidar que las células no estén expuestas a estos pH extremos durante largo tiempo<sup>2</sup>.

De la concentración de iones depende la presión osmótica, que es la responsable del intercambio de agua y de nutrientes entre la sangre y las células. La osmolalidad fisiológica es de unos 285 mosm/l. Los principales iones implicados en estos intercambios son el sodio, el cloro y el bicarbonato (extracelular) y el potasio, magnesio, fosfato y proteínas (intracelular). Estas diferencias en concentración iónica se mantienen por gastos de energía. La mayor parte de la actividad osmótica en el medio de los cultivos celulares es debida a iones. Para mantener constante la osmolaridad de los cultivos se hace necesario evitar la evaporación del agua bien utilizando receptáculos cerrados, bien utilizando incubadores con alta humedad (100 % de saturación). La concentración relativa de los iones en el medio de cultivo va variando con el crecimiento celular hasta que se hace incompatible con éste. El control de este fenómeno no tiene más solución que el cambio frecuente de medio de cultivo. El oxígeno actúa como donador de electrones en las reacciones metabólicas oxidativas por las que se degradan los nutrientes para obtener la energía necesaria para la vida, fundamentalmente en forma de ATP. En los cultivos celulares, la oxigenación se consigue teniendo cuidado de no tapar herméticamente los cultivos, mantener densidades celulares moderadas y de no utilizar cultivos estáticos de gran volumen.

Las células animales están adaptadas a crecer a la temperatura del organismo al que pertenecen, existiendo diferencias entre distintos tejidos. La temperatura del organismo viene determinada por la relación entre producción y pérdida. Las células animales se cultivan a la temperatura del tejido al que pertenecen. El mantenimiento de una temperatura constante se lleva a cabo mediante termostatos en los incubadores, existiendo varios diseños para evitar gradientes de temperaturas: camisas de agua, circulación forzada de aire, situación de los termostatos, etcétera.

En el organismo existen sistemas redox consistentes en un elemento que se oxida al ceder electrones a otro que se reduce. Muchas reacciones metabólicas (fosforilación oxidativa, transporte) y especialmente la estructura-actividad de las proteínas (puentes disulfuro) dependen del potencial redox. Al establecer cultivos celulares, se destruyen estos equilibrios y, dado que el sistema está en un ambiente oxidante (oxígeno del aire), la tendencia del sistema es de un desequilibrio hacia ese lado, por lo que a menudo se hace necesario añadir al medio de cultivo una reserva suficiente de compuestos reductores (cisteína, glutatión, betamercaptoetanol).

Las células en el organismo no están aisladas sino estrechamente en contacto unas con otras formando tejidos. Todo el conjunto actúa como un sustrato celular formado por las mismas células y atravesado por capilares y venas a través de las cuales se renueva el medio que las baña. Toda esta estructura se deshace al efectuar una extracción de células con destino a un cultivo celular y además se les pone en

contacto con una superficie artificial, generalmente plástico. Ello hace que no todas las células sean capaces de adaptarse al nuevo sustrato, además de que existen sustratos tóxicos para determinados tipos celulares. La disociación de tejidos en suspensiones celulares requiere la rotura de las uniones extracelulares. La elección del método depende de la composición del tejido. Puede ser simplemente mecánica (tejidos blandos como el hígado, médula ósea), enzimática (tejidos duros como el músculo) o bien una combinación de ambas. El tratamiento enzimático, generalmente proteasas, destruye las conexiones intercelulares y deja las células aisladas. El uso de EDTA como quelante de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  también favorece la disociación de tejidos. Las diferencias de crecimiento que exhiben distintos tipos de células en relación al sustrato son características de su capacidad de proliferación. Por ejemplo, las células derivadas de tejidos sanos de animales (cultivos primarios) no se suelen multiplicar en suspensión, al contrario que las líneas celulares bien establecidas que han adquirido un alto grado de autonomía, las células cancerosas y las células transformadas por virus<sup>3</sup>.

### Requerimientos nutritivos

Un nutriente es una sustancia que necesitan las células para realizar sus funciones normales: crecimiento, metabolismo, división celular o diferenciación. Los principales requerimientos nutritivos de los cultivos celulares son esencialmente los de una célula dentro del organismo: aminoácidos, purinas y pirimidinas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y coenzimas y sales<sup>4</sup>.

Los aminoácidos esenciales varían con la especie y el tejido. Son principalmente arginina, cistina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Y los no esenciales son principalmente alanina, asparraguina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, prolina y serina. Se utilizan en cultivos celulares a unas concentraciones de 0,01 a 4 mM. La glutamina es generalmente el factor limitante del crecimiento celular debido a que es inestable en el medio de cultivo. Por ello, el medio comercial debe enriquecerse en glutamina cuando se realiza un cultivo celular.

Las purinas y pirimidinas están formadas por una molécula de azúcar, ácido fosfórico y una base nitrogenada. Son necesarias tanto en estado libre como para formar parte de coenzimas y por ser los componentes esenciales de los ácidos nucleicos. Las células son capaces de sintetizarlas partiendo de sus precursores, L-glutamina, L-ácido aspártico, glicina y bicarbonato. Estos precursores, en combinación con el suero, mantienen muchos tipos de células en cultivo, pero generalmente con purinas y pirimidinas se mejora el crecimiento. Las purinas y pirimidinas que se utilizan para cultivos celulares son: bases (adenina, guanina, hipoxantina, xantina, uracilo, citosina, timina), nucleósidos (adenosina, desoxiadenosina, guanosina, desoxiguanosina, citidina, desoxicitidina, 5-metilcitidina, timidina, uridina), nucleótidos (AMP, ATP, UTP, 5-metil-CMP) y azúcares precursores. Se utilizan a unas concentraciones de 0,001 a 0,041 mM.

Los carbohidratos que necesita una célula en cultivo son principalmente la D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, D-maltosa, D-galactosa, B-glucosa, glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato. Los disacáridos (maltosa), pero no las pentosas (lactosa y sacarosa), pueden sustituir a la D-glucosa. La galactosa puede reemplazar a la glucosa en algunos medios de cultivo ya que reducen la cantidad de ácido láctico producido. Otras fuentes de energía son los cetoácidos y los ácidos carboxílicos como el oxalacetato,

malonato, carbamilsulfato, glutarato y el piruvato (el más utilizado). Se utilizan a concentraciones de 0,008 a 10 mM.

Los lípidos son necesarios para las células ya que forman parte de la membrana y porque un considerable porcentaje de la energía requerida se deriva de la oxidación de los ácidos grasos. Los fosfolípidos y el colesterol son los principales constituyentes de las membranas. Se utilizan a una concentración de  $3 \times 10^{-4}$  o  $1 \times 10^{-3}$  mM. Muchas células de mamíferos en cultivo sintetizan lípidos a partir de sustancias que no lo son para satisfacer sus necesidades, pero normalmente los lípidos se incluyen en el medio de cultivo o están presentes en el suero. Las células de mamíferos no pueden sintetizar ciertos ácidos grasos insaturados (ácidos grasos esenciales); éstos tienen que estar presentes en el medio de cultivo o bien los obtienen del suero donde se encuentran ligados a la albúmina o a lipoproteínas. Estos ácidos grasos son el linoleico (18:2) y el araquidónico (20:4).

Las vitaminas que necesita una célula en cultivo son colina, acetilcolina, ácido fólico, nicotinamida, ácido nicotínico, ácido pantoténico, coenzima A, piridoxina, piridoxal, piridoxamina, piridoxal fosfato, riboflavina, flavín-mononucleótido, flavín-adenindinucleótido, tiamina, tiamina-fosfato y coenzima B. Se utilizan a concentraciones de  $2 \times 10^{-5}$  a 10 mM. El inositol y la vitamina B, que actúan como coenzimas, no son requeridos para todas las líneas. La colina tiene un importante papel como donador de metilos. El ácido ascórbico mantiene el potencial redox a un nivel en el que las células llegan a estar estables en cultivo, pero su inestabilidad a pH fisiológico, debido a su rápida oxidación (especialmente si no hay agentes reductores como el glutatión), hace que muchos medios comerciales no lo incluyan dentro de sus componentes.

Las sales son necesarias porque mantienen la osmolalidad y se requieren para la actividad de algunas enzimas. Los metales son necesarios para el crecimiento y el metabolismo celular. Las sales se utilizan a concentraciones de  $1 \times 10^{-5}$  a 130 mM, con una osmolalidad total de unos 303 mOsm. A concentraciones mayores inhiben el crecimiento celular. Los niveles óptimos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  regulan la captación de aminoácidos. Las concentraciones de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  afectan el potencial de membrana. El bicarbonato se necesita como tampón para regular el pH. Los metales intervienen en pasos claves de las vías metabólicas y son necesarios para el crecimiento de todos los tipos celulares.

Actualmente existen muchos medios comerciales para el cultivo de células, químicamente definidos, pero no se ha logrado una unificación. Ello es debido a que aunque los requerimientos básicos de nutrientes, aminoácidos, purinas y pirimidinas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y coenzimas y sales son, en general, comunes a todas las células, las proporciones adecuadas de estos componentes y los requerimiento de hormonas o metales son muy específicos. Los medios de cultivo comerciales proporcionan todos estos requerimientos en las proporciones antes mencionadas para tipos de células conocidos. Dado que es importante obtener un medio libre de toxicidad, se hace necesario utilizar reactivos de primera calidad, de gran pureza<sup>5</sup>.

### Factores de crecimiento

La mayoría de los factores de crecimiento (tipo hormonal) son proteínas producidas por tejidos específicos y vertidas a la circulación sanguínea u otros fluidos. Los factores de crecimiento se encuentran en cantidades muy pequeñas en el suero, entre  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  por ciento de las proteínas totales. Cada tejido, y por lo tanto sus células, está bajo el control

de varias hormonas del organismo. Estas hormonas afectan tanto el metabolismo como el crecimiento celular, de forma que las actividades de los distintos tejidos de un organismo están coordinadas. Al separar las células de los tejidos y del organismo, esta coordinación se interrumpe; sin embargo, las células *in vitro* siguen exhibiendo requerimientos de tipo hormonal para su normal funcionamiento y proliferación. Estos requerimientos *in vitro* han recibido el nombre de factores de crecimiento<sup>6</sup>. Todas las células animales parecen necesitar los factores macromoleculares contenidos en el suero para su multiplicación *in vitro*. Muy pocas células son capaces de crecer en ausencia de sueros y las que lo hacen producen ellas mismas sus factores de crecimiento. Más de un factor de crecimiento es esencial para una proliferación óptima en cultivos. Por ejemplo, el factor estimulador de multiplicación de fibroblastos es una familia de polipéptidos con pesos moleculares similares (10 K) y con diferentes puntos isoeléctricos. Estos y otros factores similares (somatomedinas) circulan en el suero ligados a proteínas de mayor peso molecular. La unión específica de las somatomedinas a los transportadores del suero depende a su vez de otros factores de crecimiento. Por último, algunos factores de crecimiento no son estimuladores cuando se usan solos, pero se vuelven altamente efectivos cuando se utilizan junto a otros, siendo su efecto mayor que el aditivo (sinergismo)<sup>7</sup>. La complejidad de la composición del suero y la baja concentración a la que se encuentran los factores de crecimiento en él hace difícil su estudio y aislamiento. Por estas razones se sigue incluyendo un 5-20 % de suero indefinido en los medios de cultivo a pesar de que la composición del suero es desconocida y varía de preparación en preparación. Dependiendo de la especie, unos sueros son mejores que otros para un determinado tipo de tejido celular pero además dentro de una misma especie se encuentran variaciones según la época del año, la edad del animal, o el estado fisiológico, entre otras. La mejor fuente de factores de crecimiento para cultivos celulares es el suero fetal de ternera, que es rico en factores de crecimiento y pobre en contenido de anticuerpos. El estudio y aislamiento de factores de crecimiento que permitan eliminar la necesidad de incluir sueros en los medios de cultivo celular es un tema actual de investigación desde hace varios años<sup>8</sup>.

### Defensa

Como resultado de los procesos metabólicos oxidativos obtenemos productos finales algunos de los cuales son tóxicos para las células. En cultivo se siguen produciendo estos metabolitos, pero al contrario que en el organismo no existen mecanismos detoxificadores. Por esta razón, el medio de cultivo ha de cambiarse a menudo. En el organismo las células están protegidas de compuestos extraños y de infecciones por el sistema inmune, así como por una serie de estructuras y mecanismos fisiológicos (piel, mucosas, sudor, secreciones antibacterianas y antifúngicas). Nada de esto existe en los cultivos celulares, donde es absolutamente necesario mantener condiciones rigurosas de esterilidad. Entre las medidas que se toman para mantener la esterilidad destacan:

- 1) Uso de habitaciones de trabajo especialmente condicionadas (aire filtrado, luz ultravioleta, presión positiva);
- 2) Uso de vitrinas con aire filtrado y protegidas de la respiración del operador;
- 3) Material-estéril de un solo uso o bien esterilizable (calor, filtración, alcohol, radiación);
- 4) Medios de cultivo filtrados por 0,2  $\mu\text{m}$ . Inclusión de antibióticos en el medio de cultivo; y

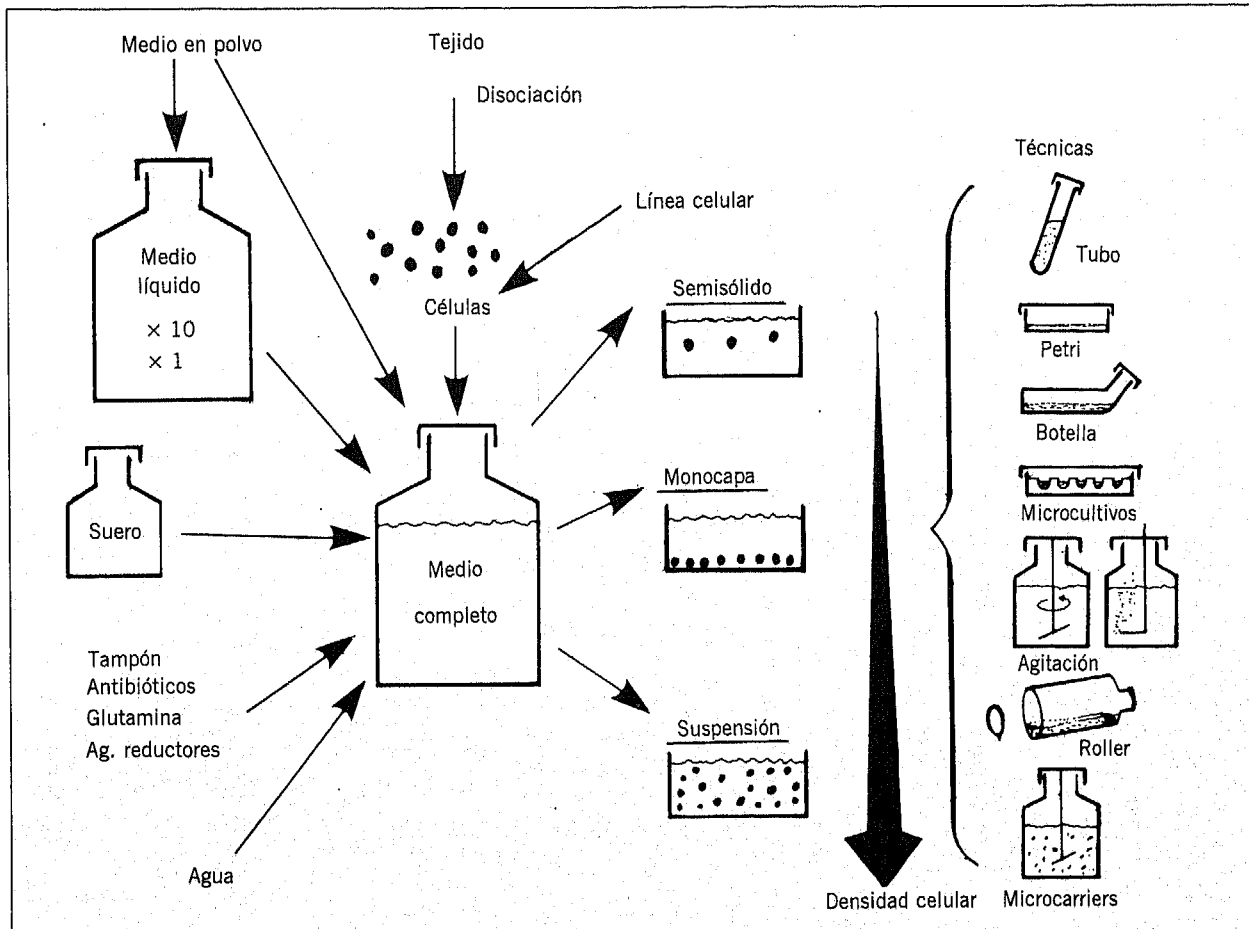


Fig. 1. Esquema de utilización de los medios y técnicas para cultivos celulares. Para obtener el medio de cultivo completo se comienza mezclando los componentes puros en las debidas proporciones según el medio. El resultado son los medios en polvo o concentrados que generalmente son comerciales y es la forma de almacenamiento. A éstos se les añade aditivos en el momento de comenzar el cultivo. Los aditivos son el suero como fuente de factores de crecimiento y nutrientes, antibióticos para prevenir la contaminación, tampones de pH, glutamina y agentes reductores. El cultivo puede hacerse en medio semisólido a poca densidad celular (clonaje) utilizando agar, fibrina o metilcelulosa, en monocapa a densidades medias o en suspensión a densidades altas. La realización del cultivo puede hacerse mediante varias técnicas, como: tubo, cápsula de Petri, botellas, microcultivos, agitación, botellas rodantes (roller) y microtransportadores (microcarriers). Para cada aplicación habría que seleccionar el método más adecuado. La técnica de microtransportadores combina la de monocapa y la de suspensión y parece ser la que puede llegar a densidades celulares mayores.

5) Limpieza constante de cámaras de incubación y material.

Los principales organismos contaminantes son:

- 1) *Bacterias*. Tienen gran capacidad de proliferación, generalmente en 1 ó 2 días pueden destruir el cultivo. Se detectan fácilmente por la acidificación del medio. Son sensibles a gran cantidad de antibióticos que no perjudican a las células.
- 2) *Virus*. Sus efectos son más difíciles de detectar y no son sensibles a antibióticos. La única protección es utilizar una buena técnica estéril.
- 3) *Micoplasmas*. Sus efectos pasan en muchos casos totalmente inadvertidos y no suelen ser sensibles a antibióticos. La única protección es utilizar una buena técnica estéril y efectuar pruebas periódicas para asegurarse de su ausencia.
- 4) *Hongos y levaduras*. Sus efectos son visibles fácilmente bien por las hifas que desarrollan o las colonias de rápida proliferación, respectivamente. Son sensibles a algunos antibióticos aunque su uso está restringido ya que suelen perjudicar a las células.

### Tipos de cultivos

Los principales tipos de técnicas para cultivos celulares animales (fig. 1) son tres: en medios semisólidos, en monocapa y en suspensión.

Los cultivos en medios semisólidos se hacen principalmente en agar, en coágulos de fibrinogenotrombina (generalmente utilizando plasma) o en metilcelulosa. En todos los casos el objetivo es producir una suspensión celular que en un momento, bien por enfriamiento (agar), por reacciones enzimáticas (coágulo) o por naturaleza (metilcelulosa), constituya un entramado molecular en el que las células queden fijas. De esta forma es posible analizar la progenie de cada una de las células individuales o clona. El análisis clonal (número de colonias, tipos de colonias, tamaño de colonias) es un método poderoso para estudios básicos sobre crecimiento y diferenciación celular, ensayos hormonales y estudio de efectos tóxicos<sup>10,11</sup>. El agar (0,3 %) suele ser tóxico para la mayoría de los cultivos primarios, siendo una característica común de las células transformadas su capacidad para formar colonias en agar. Para culti-

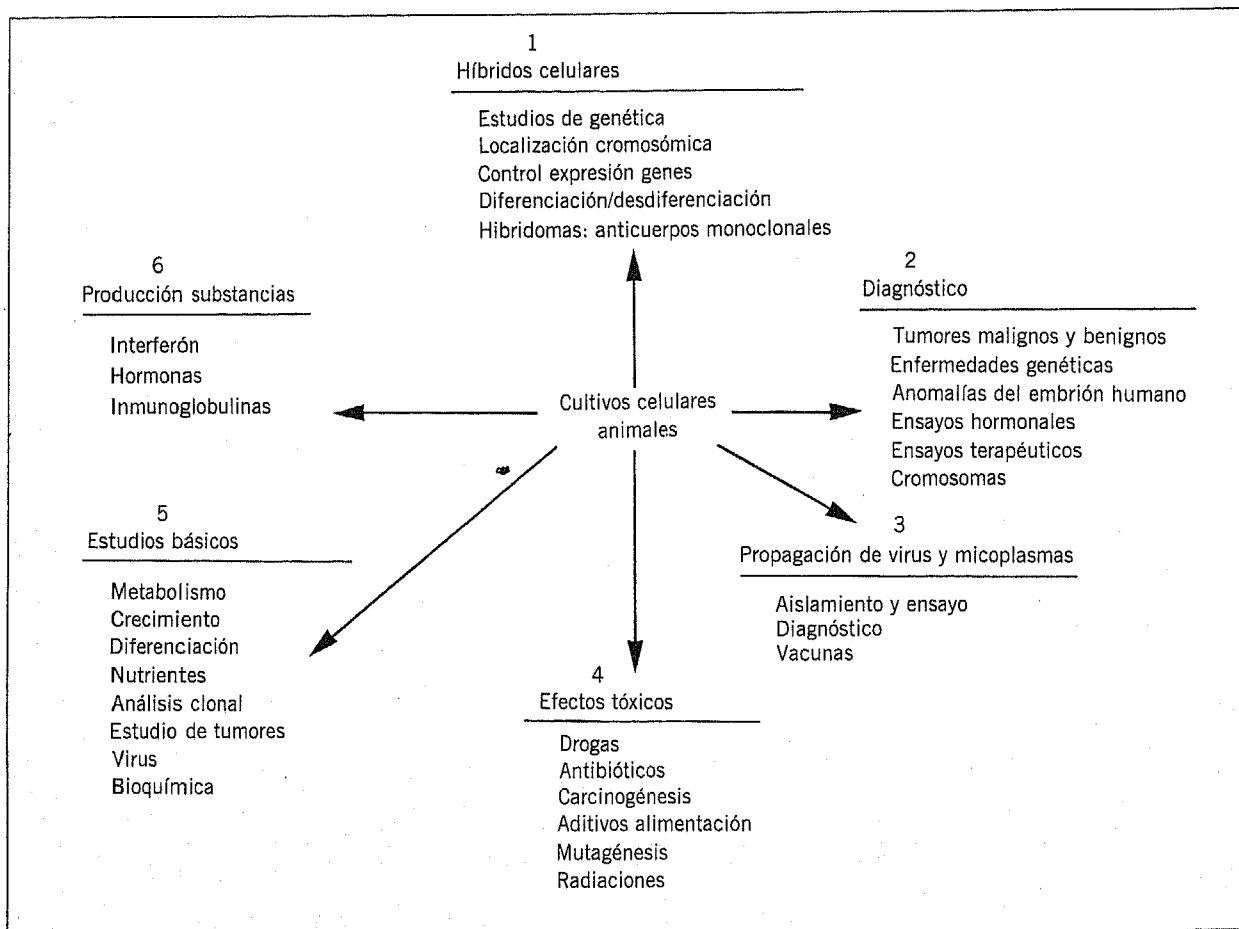


Fig. 2. Esquema de algunas aplicaciones de los cultivos celulares animales. Excepto para los estudios básicos, para todas estas aplicaciones se emplean líneas celulares establecidas. Las principales aplicaciones de los cultivos celulares animales se han dividido en 6 apartados: 1) híbridos celulares; 2) diagnóstico; 3) propagación de virus y micoplasmas; 4) efectos tóxicos; 5) estudios básicos, y 6) producción de sustancias.

vos primarios pueden utilizarse los coágulos o la metilcelulosa, entre otros. Las densidades celulares que se utilizan para estos métodos son pequeñas.

Los cultivos en monocapa se hacen en superficies de plástico no tóxico (placas de Petri, botellas, botellas rodantes, microtransportadores). No todos los tipos celulares se adhieren a las superficies, siendo los más corrientes en este tipo de cultivo los fibroblastos. Las densidades celulares que se obtienen por este método vienen determinadas por la superficie utilizable (inhibición del crecimiento por contacto). Su principal ventaja es la facilidad del cambio de medio sin más que verter y reponer el medio, debido a que las células permanecen adheridas a las superficies.

Los cultivos en suspensión pueden hacerse por varios métodos (fig. 1). No todos los tipos celulares se adaptan a este tipo de cultivo. La utilización de microtransportadores, pequeñas esferas donde se adhieren las células, permite una técnica de cultivo intermedia entre los cultivos en monocapa y en suspensión. Desde el punto de vista de la movilidad del medio de cultivo, pueden ser continuos o discontinuos. Un cultivo continuo (perfusión) es aquél en el que el medio fresco entra constantemente al cultivo y el medio utilizado sale. Los cultivos discontinuos utilizan un mismo medio por un tiempo hasta que las células hacen disminuir los nutrientes y se acumulan en el medio productos catabólicos.

Alcanzado este punto se cambia el medio de cultivo. Según el recipiente donde se lleve a cabo el cultivo, éste puede ser: en tubo (5-10 ml), en Petri (1-20 ml), en microcultivos (10-100 µl), en botellas con agitación (varios litros), en botellas rodantes (varios litros), que son botellas que se mantienen con giro lateral, y microtransportadores (varios litros), que utilizan pequeñas bolitas de materiales inocuos donde se adhieren las células, consiguiéndose de esta manera cultivos en monocapa-suspensión que alcanzan grandes densidades y productividad.

La utilización de una u otra técnica de cultivo depende de la aplicación concreta para la cual se esté utilizando. A modo de ejemplo, mientras que los microcultivos se utilizan frecuentemente para estudios básicos en los que se necesita efectuar gran número de experimentos con el mínimo coste y el máximo control de variables, los cultivos en suspensión tales como botellas rodantes o microtransportadores se utilizan cuando lo que se quiere obtener es un gran número de células por ejemplo para producción de virus, hormonas o para llevar a cabo estudios bioquímicos<sup>12</sup>, por ejemplo.

#### Aplicaciones de los cultivos celulares

Las aplicaciones de los cultivos celulares se han agrupado en las siguientes categorías (fig. 2): híbridos celulares,

diagnóstico, propagación de virus y micoplasmas, efectos tóxicos, estudios básicos y producción de sustancias<sup>12,13</sup>. La fusión de dos células procedentes de distintos tejidos y aún de dos especies diferentes da origen a híbridos celulares que manifiestan características de ambos tipos celulares. Los híbridos celulares se han utilizado para estudios de genética, localización cromosómica, control, expresión de genes, estudios de diferenciación y desdiferenciación y tecnología de hibridomas: anticuerpos monoclonales. Utilizando esta técnica se han podido realizar estudios de genética en organismos pluricelulares que de otra manera no hubieran sido posibles debido a las dificultades de reproducción y análisis de la progenie de los métodos de la genética clásica. Ha sido posible la localización de los genes en los cromosomas debido a que los híbridos van perdiendo cromosomas y funciones al azar. Esta aplicación de los cultivos celulares es muy actual dada la naciente tecnología de los hibridomas, principalmente en cuanto a la producción de anticuerpos monoclonales. En este método se seleccionan híbridos a partir de mielomas (células cancerosas productoras de anticuerpos y capaces de propagarse *in vitro* e *in vivo* indefinidamente) y linfocitos (células normales estimuladas a fabricar un anticuerpo definido y que son incapaces de propagarse). Los híbridos que se seleccionan son aquellos capaces de propagarse y que además producen el anticuerpo deseado. Las aplicaciones de esta técnica a largo plazo se prevee que revolucionarán el campo de la terapéutica, ya que abren la posibilidad real del tratamiento del cáncer debido a su alta especificidad. Actualmente se está utilizando esta técnica en diagnósticos clínicos y para purificación de proteínas que se encuentran en muy bajas concentraciones en los líquidos de origen (hormonas, interferon)<sup>9,14</sup>. El diagnóstico utilizando cultivos celulares se ha aplicado a la diferenciación de tumores, enfermedades genéticas, anomalías prenatales en el embrión humano, ensayos hormonales, ensayos terapéuticos y observación de anomalías cromosómicas. La mayor o menor malignidad de las células procedentes de un tumor es generalmente proporcional a su multiplicación y propagación en el medio de cultivo y por lo tanto es una característica que puede utilizarse para ayudar al diagnóstico. Se han realizado estudios sobre el comportamiento de células malignas y normales y una de las diferencias observadas *in vitro* es que el crecimiento de células malignas no se detiene, mientras que el crecimiento de células normales es inhibido por contacto con otras células. Los cultivos celulares sirven para detectar diversas enfermedades genéticas como la citrulinemia, el síndrome de Hurler o la galactosemia. La detección prenatal de desórdenes genéticos por el análisis de cultivos de células fetales obtenidas de los líquidos internos (amnios) se utiliza para detectar prematuramente posibles anomalías metabólicas que pueden ser corregidas si su diagnóstico se hace durante el embarazo. La capacidad de los cultivos celulares de respuesta a pequeñas concentraciones de hormonas, a menudo no detectables por ningún otro método, los hace susceptibles de ser utilizados como un ensayo hormonal. Asimismo, pueden utilizarse los cultivos celulares para ensayos de productos terapéuticos y como método de obtención de células en las que fácilmente se puedan analizar los cromosomas. En general, el uso de los cultivos celulares como método de diagnóstico requiere de una mejor estandarización y caracterización de los cultivos, así como el establecimiento de criterios definidos para un diagnóstico más exacto. Debido a que los virus y micoplasmas sólo pueden multiplicarse en tejidos vivos, uno de los métodos para su propagación son los cultivos celulares. Este método tiene la ventaja del mayor control y reproductibilidad a la que puede someterse todo el proceso. Se utilizan líneas celulares suscepti-

bles a la infección y cultivos en masa. La multiplicación de los virus y micoplasmas en las células cultivadas se ha usado principalmente para su aislamiento y ensayo, diagnóstico y obtención en cantidad para vacunas. Es fácilmente observable el efecto destructivo o citopatogénico que se produce en las células por infección con virus. Este efecto puede ser eliminado por anticuerpos proporcionando una prueba de neutralización. Muchos virus pueden detectarse y neutralizarse usando esta técnica y así se han aislado un gran número de virus. El uso de los cultivos celulares en diagnóstico sirve para demostrar la presencia del virus y detectar anticuerpos en el suero de los pacientes. El más común de los métodos empleado es el cultivo celular en monocapa. Los cultivos primarios o secundarios mantienen el número diploide de cromosomas, lo que los hace particularmente susceptibles a ciertos virus. Los cultivos celulares continuos presentan la ventaja de poder ser subcultivados indefinidamente, pero durante la transformación que sufren las células el número de cromosomas se hace anormal y la susceptibilidad a ciertos virus disminuye. Por último, se han conseguido cultivos celulares semicontinuos que son líneas continuas que mantienen el número de cromosomas diploide. Una de las mayores aplicaciones de los cultivos celulares animales es su utilización como sustrato para la multiplicación de virus con el objetivo final de producir vacunas, es decir, virus atenuados<sup>12</sup>.

Debido al estrecho control de las variables a las que pueden someterse las células en cultivo, comparado con otras formas de efectuar pruebas, este método se ha utilizado para demostrar efectos tóxicos de drogas, antibióticos, posibles cancerígenos, aditivos en alimentación, mutagenesis y efecto de radiaciones.

Los cultivos celulares permiten obtener cantidades suficientes de poblaciones de células homogéneas de manera reproducible, por lo que se pueden utilizar como modelos en el estudio de los mecanismos celulares. A modo de ejemplo pueden citarse estudios sobre metabolismo celular, control del crecimiento, estudios sobre los mecanismos moleculares de la diferenciación, requerimientos nutritivos, análisis clonal de los descendientes individuales de cada célula, estudio de células tumorales, efectos y aislamiento de virus y numerosos estudios bioquímicos. El problema principal de estos estudios es su extrapolación a los fenómenos *in vivo*. Por otra parte, los cultivos primarios, los más cercanos al fenómeno natural, no permiten obtener suficiente número de células para estudios básicos. Una forma de contrarrestar este problema es la de transformar los cultivos primarios con virus sensibles a la temperatura. Según este método, las células del cultivo primario transformadas se pueden obtener en cantidad. Una vez hecho esto se cambia el cultivo a una temperatura en la que el virus no es activo y las células revierten al estado normal permitiendo un análisis más próximo al estado *in vivo*<sup>3,10</sup>.

Los cultivos celulares han supuesto un poderoso método para el estudio de producción de hormonas y en la expresión de las funciones específicas de las células que las producen. Es de gran interés el uso potencial de los cultivos celulares en la obtención de productos de valor farmacéutico y medicinal; de este modo se han obtenido la hormona de crecimiento y prolactina, la hormona coriónica y la hormona paratiroidea. También es teóricamente posible que el interferón humano pueda ser producido por cultivos celulares y procesado para uso clínico, si bien su producción es muy costosa.

El campo de la producción hormonal mediante cultivos celulares parece que va a ser desbancado por el uso de las modernas técnicas conocidas por ingeniería genética<sup>13</sup>. Ahora bien, existen todavía muchos problemas con sustan-

cias complejas (glucoproteínas) y con elementos cuya elaboración requiere la actuación de un tándem de genes, por lo que la mejora de la técnica de los cultivos celulares puede ser la clave de la producción comercial de muchas sustancias.

### Agradecimiento

Se agradece por su ayuda a la Caja de Ahorros de Zaragoza, Aragón y Rioja, al Instituto Tecnológico para Posgraduados de Madrid su soporte informativo e infraestructura, a S. Martín su crítica del manuscrito, a Angelines San Juan su mecanografía y a J. Coll Pérez sus dibujos.

### BIBLIOGRAFIA

1. Pollack R, Pfeiffer S. Animal cell culture. Nueva York. Cold spring Harbor, 1971.
2. Eagle HMD. Some effects of environmental pH on cellular metabolism and function in control of proliferation. En: Bayard Clarkson M, Baserga R, ed. Animal Cells. Nueva York. Cold Spring Harbor Laboratory. 1974; 1-11.
3. Han RG. Cloning of mammalian cells de methods. En: Prescott DM, ed. Nueva York, Cell Physiology V. 1972; 37-39.
4. Fleischaker RJ, Giard DJ, Weaver J. Progress with computer-coupled, mammalian cell culture investigations. Departamento de Nutrición y Ciencia de la Alimentación Industrial Liaison Programa, M.I.T. 1980.
5. Horton HC. A survey of commercially available tissue culture media. Journal of the Tissue Culture Association 1970; 6: 89-108.
6. Gospodarowicz J, Moran SJ. Growth factors in mammalian cell culture. Annu Rev Biochem 1976; 530-552.
7. Coll JM. Factors stimulating chick erythroid cell proliferation and differentiation *in vitro*. Tesis Doctoral Massachusetts Institute of Technology, U.S.A. Diciembre, 1978.
8. Barnes D, Sato G. Serum-free cell culture: a unifying approach. Cell 1980; 22: 649-655.
9. Iturralde MN. Obtención de anticuerpos monoclonales contra la proteína C reactiva. Tesis de licenciatura. Universidad de Navarra, Pamplona. Junio 1983.
10. Coll JM, Ingram VM. Identification of ovotransferin as heme—colony—and burst-stimulating factor in chick erythroid cell cultures. Exp Cell Res 1981; 131: 173-184.
11. Coll JM, Ingram VM. Stimulation of heme accumulation and erythroid colony formation in cultures of chick bone marrow cells by chicken plasma. Cell Biol int Rep 1978; 76: 184-190.
12. Kruse PF, Patterson JR. Tissue culture: methods and applications. Nueva York, San Francisco, Londres: Academic Press, 1973.
13. Alonso CB, Coll JM, Herranz EL. La ingeniería genética en la biotecnología. Cuadernos CDTI. Septiembre, 1981.
14. Coll JM, Palomo C, Martín SH. Obtención de anticuerpos monoclonales y posible uso de diagnóstico clínico. Inmunología 1982; 3: 47-79.