

Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales)

Lic. María Eugenia Segretín

INGEBI-CONICET - Dpto. FBMyc, FCEyN-UBA

Los científicos han desarrollado metodologías para aislar células y obtener poblaciones celulares homogéneas, que luego pueden ser incluso mantenidas y multiplicadas *in vitro* ("en vidrio" = en recipientes especiales, en el laboratorio). Los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica, ya que permiten estudiar los procesos que ocurren en las células, y en diversas aplicaciones de la biotecnología, como la producción de moléculas de interés industrial, ingeniería de tejidos, etc.

¿Cómo se obtienen las células?

El primer paso para aislar células de un mismo tipo a partir de un tejido (generalmente formado por células de diversos tipos) consiste en separar la matriz extracelular que las mantiene unidas¹. Para lograrlo, la muestra de tejido es tratada con diversas enzimas proteolíticas (como tripsina y colagenasas) que degradan las proteínas de la matriz; y también se utilizan agentes (como el EDTA - ácido etilendiaminotetraacético) que secuestran al ión calcio, del cual depende la adherencia celular. De esta forma, y mediante una suave agitación, se obtiene una suspensión celular que contiene a todas las células presentes en ese tejido.

Para separar los diferentes tipos celulares se pueden utilizar varios métodos:

1. La centrifugación, que permite separar a las células por tamaño.
2. La capacidad de adherencia al vidrio o al plástico que tienen algunos tipos celulares.
3. La unión a ciertos anticuerpos específicos para determinados componentes celulares. Estos anticuerpos se usan unidos a diferentes matrices (colágeno, bolitas de polisacáridos, de látex o de plástico). Las células unidas a la matriz (a través de los anticuerpos) se recuperan por agitación, tratamiento con tripsina (digiere a las proteínas que median la adhesión) o, en el caso de una matriz digerible (como el colágeno), degradando la propia matriz con enzimas (como la colagenasa).
4. La unión a ciertos anticuerpos acoplados a colorantes fluorescentes. Las células que contienen un determinado componente son reconocidas y "marcadas" por los anticuerpos. Las células marcadas son separadas de las no marcadas en un separador de células activado por fluorescencia o *cell sorter* (Figura 1).
5. La disección de un grupo de células a partir de una sección de tejido preparada para microscopía. La región que contiene las células de interés es irradiada con un láser, que funde un pequeño círculo con las células que están por debajo. Estas células capturadas son luego removidas para un posterior análisis. La técnica, denominada "*microdisección de captura por láser*", puede utilizarse para aislar y estudiar diferentes partes de un tumor, por ejemplo. Otra técnica relacionada emplea un láser para disectar un grupo de células y "catapultarlas" a un contenedor apropiado para un posterior análisis (Figura 2).

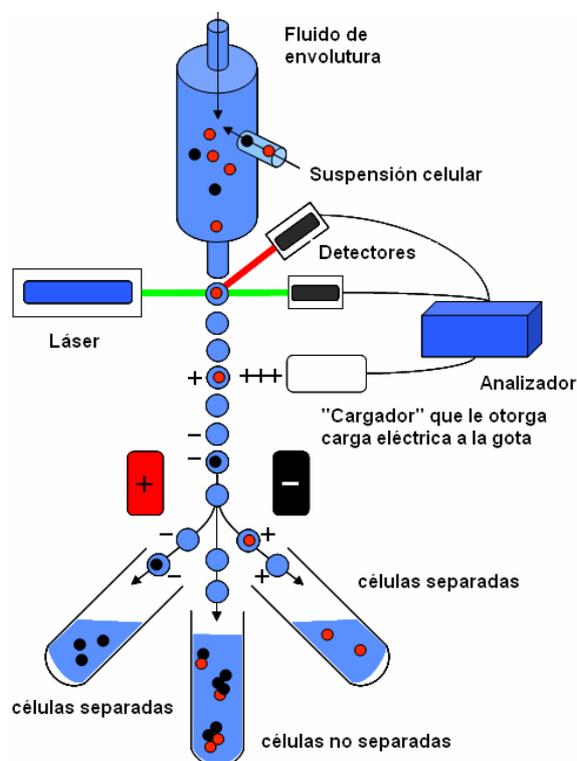


Figura 1. Equipo para la separación de células marcadas por fluorescencia. Las células individuales viajan a través de un conducto muy delgado y son iluminadas por un láser. El equipo puede detectar qué células emiten fluorescencia (por el anticuerpo adherido). Cada célula es incorporada en una gota que es "cargada" eléctricamente como negativa o positiva en función de la presencia o ausencia del colorante fluorescente. Luego, las gotas son separadas por un campo eléctrico hacia los recipientes colectores según su carga (adaptado de Alberts y col., MBC 2002).

¹ La matriz extracelular está compuesta por diferentes tipos de moléculas, entre las que se encuentran los proteoglicanos, polisacáridos como el ácido hialurónico, y proteínas como el colágeno, laminina, fibronectina, fibrina y elastina.

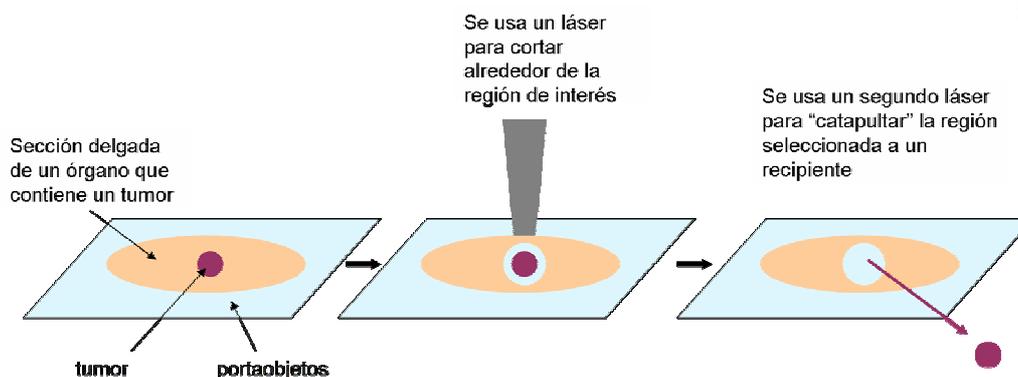


Figura 2. Técnica de microdissección para aislar células a partir de secciones de tejidos. Este método emplea un láser para escindir una región de interés y eyectarla a un contenedor, permitiendo el aislamiento de determinadas células (hasta células individuales) a partir de un tejido (adaptado de Alberts y col., MBC 2002).

¿Cómo se cultivan las células?

La mayoría de las células animales y vegetales aisladas pueden vivir, multiplicarse, e incluso presentar ciertas propiedades diferenciales, si se las cultiva en placas de plástico y con medios de cultivo adecuados. Así, las células pueden ser observadas continuamente bajo el microscopio o analizadas bioquímicamente, para estudiar los efectos del agregado o remoción de moléculas específicas, como hormonas o factores de crecimiento. Además, se pueden estudiar las interacciones entre células, cultivando en la misma placa más de un tipo celular. Cuando los experimentos se realizan con cultivos celulares, se los denomina ensayos "*in vitro*" ("en vidrio"), para diferenciarlos de aquellos que se llevan a cabo en organismos completos, o experimentos "*in vivo*" ("en organismo viviente")².

El cultivo de tejidos y células comenzó en 1907 con un experimento diseñado para esclarecer una controversia en el área de la neurobiología. El investigador Dr. Ross Harrison, quien trabajaba en la Universidad Johns Hopkins, publicó un breve pero crítico artículo ("Observaciones de la fibra nerviosa viva en desarrollo") que introdujo exitosamente una nueva técnica, el cultivo de tejidos, para demostrar experimentalmente cómo se originan las fibras nerviosas. Los experimentos originales con fibras nerviosas se basaron en el cultivo de pequeños fragmentos de tejidos, llamados "explantos". Utilizando técnicas asépticas, Harrison tomó fragmentos del tubo neural (tejido embrionario precursor del sistema nervioso) de un embrión de rana, y lo depositó en una gota de líquido linfático fresco ("medio de cultivo") de rana colocada sobre un cubreobjetos estéril. Una vez que la linfa coaguló, invirtió el cubreobjetos sobre un portaobjetos de vidrio que poseía una depresión, creando así un cultivo en gota suspendida, técnica utilizada por los microbiólogos para estudiar las bacterias. Luego de periódicas observaciones al microscopio, pudo describir el desarrollo de fibras nerviosas *in vitro* a partir de las neuronas presentes en el tejido extirpado. Así, además de argumentar sólidamente la "doctrina neural", resolvió los problemas básicos del cultivo celular, como el medio, la observación y la contaminación.



Experimento de Ross Harrison (1907), donde el explanto es la porción de tejido neural, incluido en una gota de linfa. Adaptado de www.corning.com.

Como se mencionó anteriormente, los cultivos se establecen principalmente a partir de suspensiones celulares generadas por disgregación de tejidos. A diferencia de las bacterias, la mayoría de las células que forman parte de tejidos no pueden vivir en suspensión, y requieren una superficie sólida sobre la cual crecer y multiplicarse. Este soporte generalmente es la base de una placa o frasco de plástico, aunque a veces los requerimientos son más complejos y el plástico debe antes recubrirse con componentes de la matriz extracelular (sustancia que rodea y contiene a las células en los tejidos, y con la cual interactúan), como por ejemplo el colágeno y la laminina.

² En los laboratorios de bioquímica, por *in vitro* se entienden aquellas reacciones químicas que se llevan a cabo en un tubo de ensayo en ausencia de células, mientras que *in vivo* se refiere a las reacciones químicas que ocurren dentro de la célula, aún en cultivo.

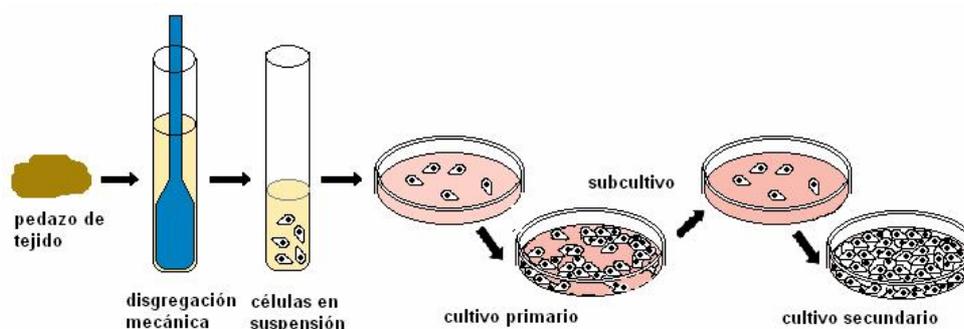
Cultivos primarios

Se denominan así a aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin fraccionamiento previo para separar los distintos tipos celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada. Pueden ser removidas del recipiente de cultivo para formar cultivos secundarios (figura 3).

Cultivos secundarios

En estas condiciones las células suelen multiplicarse hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una *monocapa* (capa de una célula de espesor). Como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco. Así, podrán subcultivarse durante semanas o meses. En este estadio, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades según su origen. Por ejemplo, los fibroblastos (células que sintetizan fibras y mantienen la matriz extracelular del tejido de muchos animales) secretarán colágeno, las células derivadas de tejido muscular esquelético se fusionarán para generar fibras musculares con capacidad contráctil espontánea, las células nerviosas extenderán prolongaciones (axones) eléctricamente excitables que podrán conectarse (establecer sinapsis) con otras células nerviosas, las células epiteliales formarán largas capas con varias propiedades de un epitelio intacto (figura 4). Gracias a que estos fenómenos ocurren en cultivo, es posible estudiarlos con diferentes metodologías, a veces no aplicables a tejidos intactos.

Figura 3



Cultivos continuos o líneas celulares

La mayoría de las células de los vertebrados dejan de dividirse luego de un determinado número de divisiones en cultivo, por un proceso llamado *senescencia celular*. Por ejemplo, los fibroblastos humanos normales se dividen solamente entre 25 y 40 veces en cultivo, antes de detenerse. En estas células, así como en muchas otras, la capacidad limitada de proliferación es el resultado de un acortamiento progresivo de los *telómeros* (porción de ADN que se encuentra en los extremos de los cromosomas). En las células somáticas (todas las células que no son células sexuales) se encuentra "apagado" el gen que codifica para la enzima *telomerasa*, que se encarga de mantener la integridad de los telómeros; como consecuencia, los telómeros se acortan en cada división celular.

A los fibroblastos humanos se los puede forzar a proliferar indefinidamente si se les provee el gen que codifica para la telomerasa; así, pueden propagarse como una línea celular "inmortalizada".

Pero como se mencionó, no todas las células humanas se immortalizan de la misma manera. Algunas células, a pesar de que sus telómeros permanezcan largos, pueden frenar sus divisiones celulares como consecuencia de la activación de mecanismos denominados "puntos de control" (*check points*) del ciclo celular. Para immortalizar estas células, hay que lograr la inactivación de los *check-points*. Una forma de hacerlo es introducir ciertos "*oncogenes*" (genes promotores del cáncer) que pueden obtenerse de virus que causan cáncer, como algunas cepas del virus del papiloma humano, adenovirus, etc.

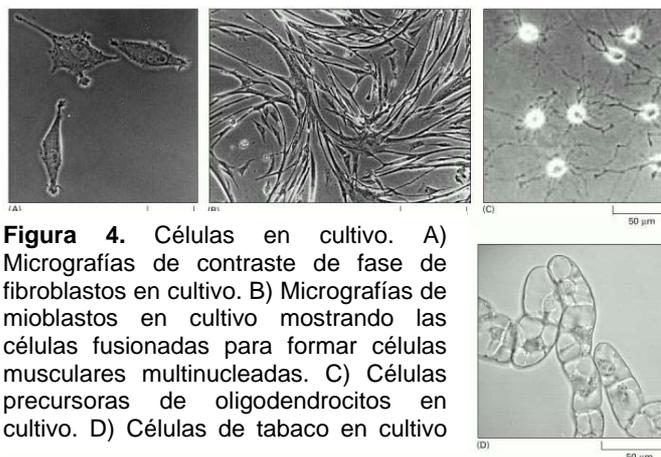


Figura 4. Células en cultivo. A) Micrografías de contraste de fase de fibroblastos en cultivo. B) Micrografías de mioblastos en cultivo mostrando las células fusionadas para formar células musculares multinucleadas. C) Células precursoras de oligodendrocitos en cultivo. D) Células de tabaco en cultivo

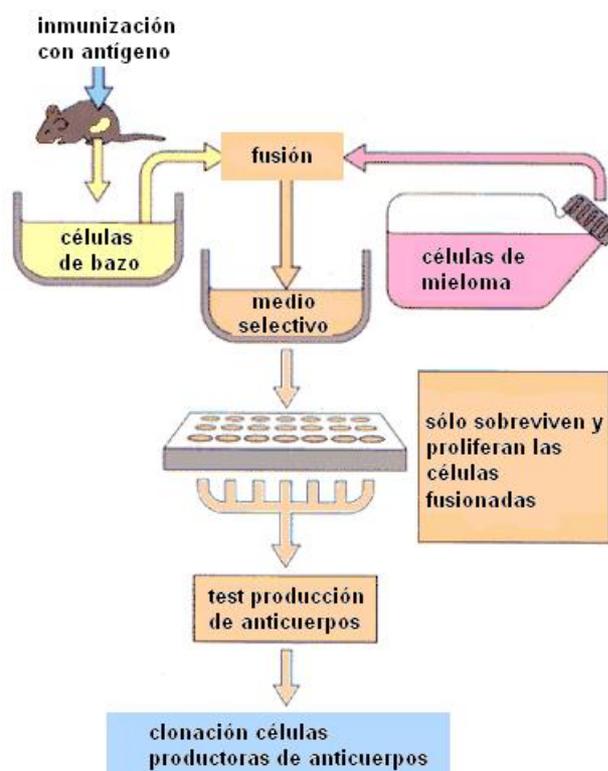
A diferencia de las células humanas, las de los roedores no tienen “apagado” el gen de la telomerasa, por lo que sus telómeros mantienen el largo a través de las divisiones celulares. Pero cuando son cultivadas, esas células experimentan cambios genéticos que inactivan los mecanismos de *checkpoint*, produciendo líneas celulares inmortalizadas espontáneamente. Ambos tipos de líneas celulares son muy útiles en la investigación celular, como fuente de un gran número de células uniformes, que pueden ser conservadas y almacenadas en nitrógeno líquido (a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) por un período muy largo de tiempo, reteniendo su viabilidad y siendo un buen modelo experimental para las primeras etapas de una investigación.

A pesar de la gran similitud que las células de una línea tienen entre sí, no son idénticas. La uniformidad genética en una línea celular puede mejorarse por clonado celular, a través del cual se aísla una sola célula, la que prolifera para formar una colonia de células clonales (idénticas). Una de las aplicaciones más importantes de esta estrategia es el aislamiento de líneas celulares mutantes que poseen defectos en ciertos genes. Su estudio puede servir para inferir el papel que tiene la proteína ausente o alterada en las células normales.

Entre los cultivos celulares más promisorios, desde el punto de vista médico, se encuentran las líneas de células madre embrionarias humanas. Estas células, obtenidas del macizo celular interno de un embrión en los primeros estadios del desarrollo, pueden proliferar indefinidamente reteniendo la habilidad de originar cualquier tipo celular del cuerpo. Estos cultivos celulares podrían revolucionar la medicina al proveer de células capaces de reemplazar o reparar tejidos dañados. Hay otras fuentes de células madre que se están investigando en tejidos adultos, como la médula ósea y el cordón umbilical.

Los hibridomas

Se sabe que es posible fusionar dos células formando un heterocarionte (o heterocarion), es decir, una célula con dos núcleos separados pero con los contenidos citoplasmáticos compartidos. Para lograrlo, se trata una suspensión de células con compuestos que inducen la fusión de membranas (fusógenos), tales como el polietilenglicol (PEG) o ciertos virus. Eventualmente, un heterocarionte puede entrar en mitosis, produciendo una célula híbrida en la cual las envolturas de ambos núcleos se han disgregado, permitiendo juntar los cromosomas de ambos en un único gran núcleo. Tales células híbridas pueden clonarse estableciendo una línea celular, pero se sabe que en muchos casos la línea resultante es inestable genéticamente, y tiende a perder parte del material genético.



En 1975, un equipo integrado por el científico argentino César Milstein, desarrolló, mediante la técnica de fusión, una línea celular híbrida clave para la producción de anticuerpos monoclonales (todos iguales) para fines terapéuticos y de diagnóstico: los hibridomas (este desarrollo llevó al Dr. Milstein a ser galardonado con el Premio Nobel). Los hibridomas son líneas resultantes de la fusión de dos tipos celulares: linfocitos B secretores de inmunoglobulinas (anticuerpos) y células derivadas de una línea tumoral de linfocitos B (figura 5). De la fusión se obtiene una mezcla heterogénea de células, y con un medio de cultivo especial se seleccionan las células fusionadas que producen anticuerpos y proliferan indefinidamente. Estos hibridomas son propagados como clones individuales, y cada uno de ellos sirve como una fuente estable y permanente de un anticuerpo monoclonal. Dicho anticuerpo reconoce un único epítipo antigénico (es decir, una pequeña porción de una proteína). Una de las ventajas de los hibridomas, en comparación con los cultivos clonales de linfocitos B, es que estos últimos tienen una vida limitada en cultivo.

Figura 5. Preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales contra un antígeno en particular. El medio de cultivo selectivo utilizado luego de la fusión celular contiene un inhibidor que bloquea las rutas de síntesis de los nucleótidos. Como consecuencia, las células deben utilizar una vía alternativa para fabricar sus ácidos nucleicos. Esta vía es defectiva en la línea celular mutante derivada del tumor de linfocitos B, pero está intacta en las células de bazo (linfocitos B) obtenidas del ratón inmunizado. Debido a que ninguna de las células utilizadas para la fusión inicial puede crecer por sí sola, sólo las células híbridas o hibridomas sobreviven.

¿Qué contienen los medios para el cultivo de células?

Hasta los años '70, el cultivo de tejidos parecía ser producto de una mezcla de ciencia y alquimia. De a poco, los fluidos coagulados (como en el experimento de Harrison) fueron reemplazados por placas con medios líquidos que contenían pequeñas cantidades de una serie de moléculas necesarias para la supervivencia y multiplicación celular: sales, glucosa, aminoácidos y vitaminas. Además, la mayoría de los medios incluían una mezcla poco definida de macromoléculas adicionadas bajo la forma de suero fetal bovino o equino, o extracto crudo de embriones de pollo. Dichos medios se siguen utilizando en la actualidad para los cultivos de rutina, y por lo tanto es difícil saber qué macromoléculas requiere un determinado tipo celular para funcionar y multiplicarse. Como consecuencia, se desarrollaron numerosos medios químicamente definidos, denominados "libres de suero", que poseen, además de las pequeñas moléculas mencionadas, varias proteínas específicas necesarias para la supervivencia y proliferación, como los factores de crecimiento. Así, gracias a estudios que buscaban establecer las condiciones mínimas de cultivo para un comportamiento celular adecuado, se descubrieron muchas moléculas de señalización extracelulares esenciales para la supervivencia, desarrollo y proliferación de determinados tipos celulares.

Los medios de cultivo son generalmente tamponados para mantener un pH alrededor de 7,4 y tienen, además, indicadores de pH, como el rojo fenol, que cambian de color a medida que aparecen catabolitos ácidos como resultado del metabolismo celular. Suelen agregarse también antibióticos y antimicóticos para impedir la contaminación con microorganismos.

Composición de medios de cultivo para células de mamífero

Aminoácidos	Vitaminas	Sales	Otros compuestos*	Proteínas requeridas en los medios definidos libres de suero
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosa	Insulina
Cisteína	Colina	KCl	Penicilina	Transferrina
Glutamina	Folato	NaH ₂ PO ₄	Estreptomina	Factores de crecimiento específicos
Histidina	Nicotinamida	NaHCO ₃	Anfotericina	
Isoleucina	Pantotenato	CaCl ₂	Rojo fenol	
Leucina	Piridoxal	MgCl ₂	Suero fetal bovino	
Lisina	Tiamina			
Metionina	Riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptofano				
Tirosina				
Valina				

* La penicilina y la estreptomina son antibióticos y la anfotericina es un antimicótico, que se adicionan para impedir el crecimiento de bacterias y hongos contaminantes, respectivamente. El rojo fenol es un indicador de pH. Los cultivos crecen usualmente en contenedores de plástico o vidrio con una superficie apropiada para la adhesión celular, y se mantienen en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% aire.

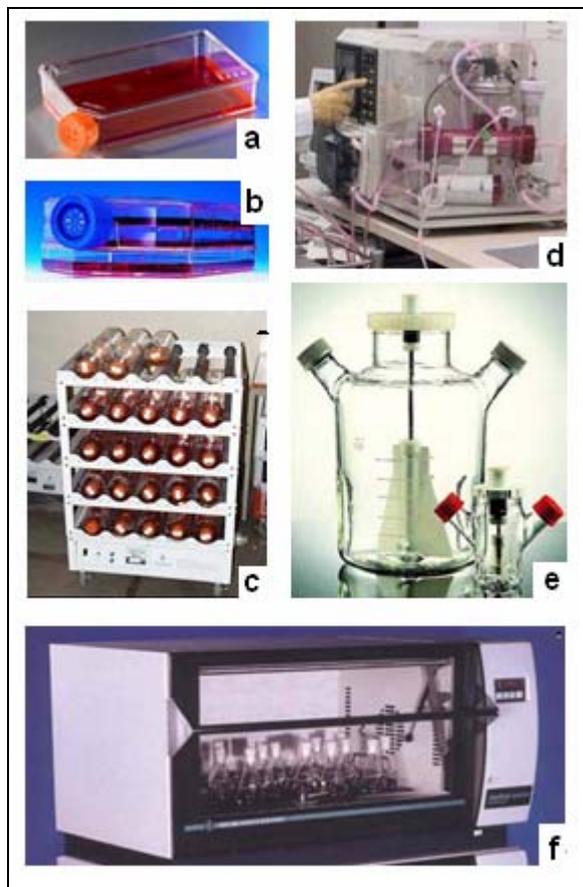
¿En qué recipientes se cultivan las células?

Existen numerosos contenedores y recipientes para cultivar células y tejidos, dependiendo de las características de las células a cultivar y de la escala deseada.

Cuando se cultivan células para hacer experimentos, se hacen cultivos a pequeña escala. En esta escala, las células se multiplican en frascos que tienen una base de 25 a 175 cm² (figura 5, frascos T). En un recipiente típico de 175cm² pueden obtenerse aproximadamente 1x10⁷ células adheridas, y unas 1x10⁸ células cuando se trata de líneas que crecen en suspensión. En los frascos T estándares no es posible producir cantidades mayores de células, dada la cantidad de tiempo insumida para los

repetidos pasajes necesarios a medio fresco, la demanda de espacio en un incubador (que controla la composición de gases, la temperatura y la humedad del entorno) y el costo de los insumos.

Cuando se necesita aumentar la escala del cultivo (escalado o *scaling-up*), se deben tener en cuenta numerosos parámetros, incluyendo problemas asociados con la falta de nutrientes, el intercambio gaseoso (especialmente la escasez de oxígeno), y la aparición de metabolitos tóxicos como el amonio y el ácido láctico.



Existen muchos sistemas para escalar los cultivos celulares, que se muestran en la figura 6. Entre ellos, es posible encontrar desde arreglos de frascos triples y botellas cilíndricas, hasta biorreactores más complejos en su estructura. En todos los casos, es necesario asegurar el correcto intercambio gaseoso y la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, el arreglo de botellas de cultivo sobre rodillos que se muestra en la figura 6c, está diseñado de forma tal que las células cubran toda la superficie interna de la botella, con rodillos que al girar aseguran que el medio de cultivo bañe a todas las células, aportándole nutrientes y retirando desechos. Otro ejemplo es el biorreactor (6d) que permite obtener un rendimiento importante de anticuerpos a partir de un cultivo celular.

La adición de bolitas de distintos materiales inertes puede ayudar también a aumentar la densidad celular en cultivos al aumentar la superficie de cultivo entre 10 y 100 veces.

Figura 6. Contenedores para cultivo de células. a) Frasco T; b) Frasco triple; c) botellas rodantes; d) biorreactor; e) frasco con paletas; f) frascos con agitación (Erlenmeyer). Fotos: www.sigma-aldrich.com

Tipo de contenedores para cultivo de células y sus capacidades

Contenedor	Máx Vol (ml)	Máx células (suspensión)	Máx células (adhesión)
Frasco T	150	1.5×10^8	$\sim 10^7$
Frasco triple	150	1.5×10^8	3×10^7
Biorreactor	8000	-----	1.5×10^{10}
Botellas rodantes	1000	1×10^9	1×10^8
Fracos para agitación (Erlenmeyer)	1000	1×10^9	-----
Fracos con paletas	1000	1×10^9	-----

Fuentes consultadas

- Introducción al cultivo celular. Universidad de Barcelona, España, <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm>
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, y Peter Walter. "Molecular Biology of the Cell", Editorial Garland, 4ta. Edición (2002).
- "Celebrando un siglo del cultivo de tejidos", en <http://www.corning.com/Lifesciences/cells100/>
- "Técnicas fundamentales en el cultivo celular. Un manual de laboratorio". Sigma, <http://www.sigmaaldrich.com>