

Introducción a los cultivos celulares.

Introducción histórica.

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El zoólogo americano R.G. Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, en 1907.

Harrison fue el primer autor que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. Pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por expansión a partir del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada.

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero, y consiguieron mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como en el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.

Rous y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy día se utilizan.

En 1913 Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años (Sharp, 1977). Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel.

- 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 aislamiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones de entre las que podemos destacar :
- 1948 Earle y col. (Sanford, Earle y Likely, 1948) aislaron células de la línea celular L y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo de tejidos. Demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes correctos.
- 1952. Gry y col. (Grey, Coffman y Kubicek, 1952) establecen la primera línea celular continua, las actualmente bien conocidas células HeLa. El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.
- 1954 Rita Levi-montalcini y col. establecen que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo (Levi-Montalcini y Calissano, 1979). Este trabajo supuso el Premio Nobel para Levi-Montalcini en 1986.
- 1955 Eagle (Eagle, 1955) realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo. Describe que las necesidades del cultivo de soluciones corporales complejas (sueros,...) pueden ser satisfechas por tan poco como el 1% de suero de caballo dializado en un medio definido de pequeñas moléculas (aminoácidos, azúcares, ...)
- 1961 Hayflick y Moorhead usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables.
- 1965 Ham introduce el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente (Ham, 1965).
- 1969 Augusti-Tocco y Sato establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma aislando clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables (Augusti-Tocco y Sato, 1969). Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas.
- 1975 Kohler y Milstein establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975). El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nobel.
- 1976 Sato y col. publicaron sus trabajos en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero. (Sato y col., 1982).

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 con el establecimiento de co-cultivos,...

A pesar de que el primer animal del que se establecieron cultivos celulares era un anfibio, poiquilotermo, rápidamente el interés se centró en el cultivo de células de animales homeotermos, especialmente humanas, por su gran interés médico. 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.

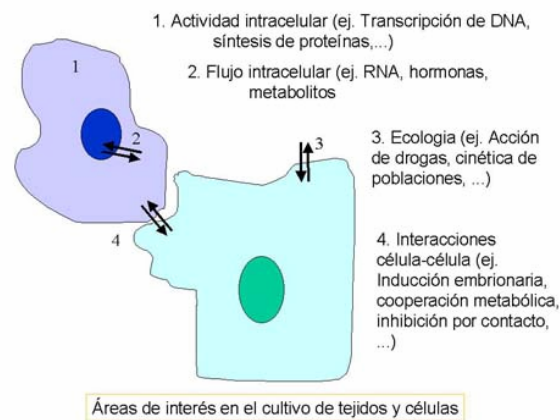
Conceptos actuales de cultivo celular.

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células '*in vitro*', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios,...

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular.

- Actividad intracelular. Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como por ej. transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético...
- Flujo intracelular. Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como por ej. ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares, movimientos del RNA: núcleo-citoplasma, movimiento de proteínas,...

- **Ecología celular.** Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación..., como por ej. estudio de las necesidades nutricionales, infecciones, estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular,...
- **Interacciones celulares.** Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacciones célula-célula.



Como ejemplo de áreas de investigación fuertemente dependientes de las técnicas de cultivo celular son:

- **Virología:** establecimiento de condiciones de cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas antivirales,...
- **Investigación del Cáncer**
- **Inmunología.** Gracias especialmente a la introducción de las técnicas de fusión celular en la producción de anticuerpos monoclonales, así como en el análisis de la genética de la célula somática.
- **Ingeniería de proteínas.** Por la producción de proteínas en líneas celulares: interferón, insulina, hormona de crecimiento,...
- **Estudios de interacción y señalización celular,** en la diferenciación y en el desarrollo. Comprende el estudio de los receptores y de las vías de translocación de la señal.
- **Aplicaciones diagnósticas.** Por ejemplo en medicina y farmacología destacan el análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales, ensayos de toxicidad,...
- **Aplicaciones médicas:** mantenimiento y producción de tejidos para trasplante.
- **Aplicaciones industriales y agronómicas:** producción por reproducción "in vitro" de clones de plantas de interés comercial,...

Los cultivos celulares tienen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo tienen unas desventajas que hay que tener en consideración. Como ventajas podemos citar:

- **Permiten un control preciso y fino del medio ambiente.** En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial...), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular,...). Esto es cierto completamente sólo para algunas líneas celulares para las que se han definido los denominados medios definidos. Un medio definido es aquel en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman, y la concentración exacta en que se encuentran. Establecer un medio definido supone conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Sin embargo en muchas líneas no se han llegado a establecer medios definidos. En estos casos se trata de medios que se suplementan con soluciones complejas (suero, extractos de embrión, etc...) en los que se encuentran factores hormonales y nutritivos imprescindibles para el mantenimiento del cultivo pero cuya naturaleza se desconoce. Estas soluciones complejas están sujetas a variación de lote a lote.
- **Caracterización y homogeneidad de la muestra.** Las células en cultivo de una línea celular (cultivo primario propagado), o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación.
- **Economía.** Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la droga las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en animal completo. Es diferente el coste de investigación de un nuevo fármaco para la empresa farmacéutica que está desarrollando moléculas si ha de sintetizar de cada una de las que ha de probar en cantidades del orden del gramo (para el estudio en animales) a que baste con pocos miligramos.
- **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 'in vivo' pero es una alternativa válida en muchas situaciones. Incluso un cultivo celular primario permite realizar experimentos que suponen el sacrificio de uno o pocos animales, pero con ellos se pueden ensayar un número de condiciones experimentales que pueden suponer si el estudio se hace con animales de experimentación el sacrificio de decenas o cientos.

En cuanto a las desventajas del cultivo celular:

- **Técnica sensible.** El crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas,...) y además dado que proceden de organismos pluricelulares son incapaces de crecer en ausencia de una compleja mezcla de nutrientes que simula el plasma o el fluido intersticial. Esto supone la necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante a nivel tanto del instrumental requerido como del personal cualificado para su manipulación.
- **Cantidad y costo.** El costo de producción de 1 gr de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal. Asimismo existe una limitación de producción, que es del orden de 10 gr de células en un laboratorio normal, y que para ser superior a 100 gr requiere instalaciones de tipo industrial.

- Inestabilidad. Muchas de las líneas celulares continuas son inestables, como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide. La población celular puede variar su composición si alguna de las subpoblaciones celulares es capaz de crecer con una tasa ligeramente superior, es decir podemos encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que se resiembran a partir de un stock congelado cada determinado tiempo, o después de un determinado número de generaciones.
- Validez del modelo "in vitro". Cuando nos referimos a un cultivo celular nos estamos refiriendo exactamente a un disgregado celular de un tejido de origen y que se diferencia de éste en que:
 - × se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido.
 - × se han perdido las interacciones heterotípicas, entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular. Es de destacar que los avances más excitantes en la función celular proceden del reconocimiento de la importancia de las interacciones específicas de las células con otras células o con el sustrato.
 - × carece de los componentes sistémicos de regulación, implicados en la regulación de la homeostasis 'in vivo', especialmente los sistemas nervioso y endocrino.

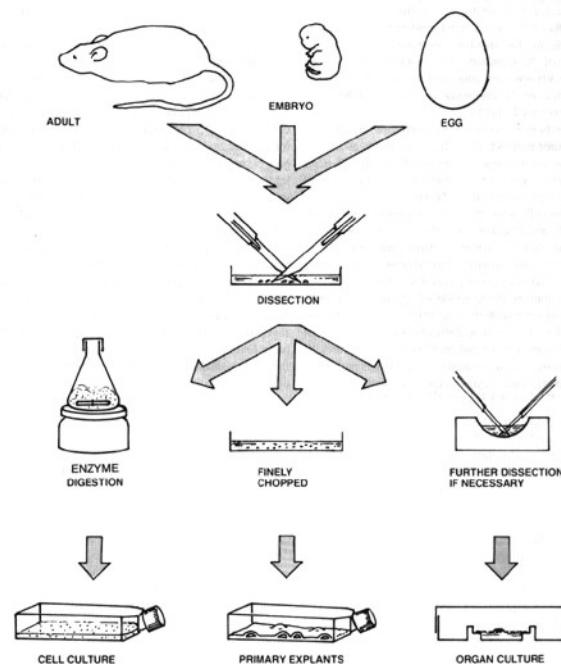
Cuando se establece el cultivo, las células se desdiferencian, y entre otras cosas se hacen móviles e inician su proliferación. Esta desdiferenciación puede, en algunos casos ser revertida por procedimientos de diferenciación inducida por hormonas, confluencia, inductores químicos (ésteres de forbol,...) pero no está claro si el estado rediferenciado es equivalente al estado de diferenciación 'in vivo'.

Por todo lo anterior hemos de ser precavidos en cuanto a la validez de los resultados obtenidos "in vitro" respecto a lo que pueda observarse "in vivo". Sin embargo actualmente se están realizando gran cantidad de estudios de validación de modelos "in vitro" dentro del desarrollo de los métodos alternativos a la experimentación animal, por ejemplo por [ECVAM](#) (European Center for Validation of Alternative Methods), [ALTWEB](#) (Colección de recursos para el desarrollo de métodos alternativos a la experimentación animal en web de la Universidad John Hopkins, USA), [Invitox](#) (Colección de protocolos "in vitro"), [Invitroderm](#) (Alternativas a los ensayos de irritación dérmica en animales), etc.

Tipos de cultivos de tejidos.

Se podría hablar de tres tipos de cultivos:

- **Cultivo de órganos.** Implica que la arquitectura característica del tejido "in vivo" se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, en general esférica. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero por el contrario no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los tipos celulares embrionarios. La imposibilidad de propagar obliga a partir en cada nuevo experimento de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad.
- **Explantos primarios.** Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante.
- **Cultivo celular.** Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento.



En la actualidad los cultivos celulares son los más empleados fundamentalmente por la posibilidad de propagación, así como por las ventajas en la cuantificación, caracterización y repetibilidad de las muestras. A fin de compensar la ausencia de interacciones heterotípicas se realizan desde hace unos años cultivos mixtos con importantes éxitos.

Biología de la célula en cultivo.

En el proceso de establecimiento de un cultivo celular se seleccionan las células que crecerán según numerosos criterios. Así solo formarán el cultivo aquellas células que sean por una parte capaces de superar el proceso de disgregación, y por otra capaces de adherirse al sustrato y proliferar en forma de monocapa o en suspensión.

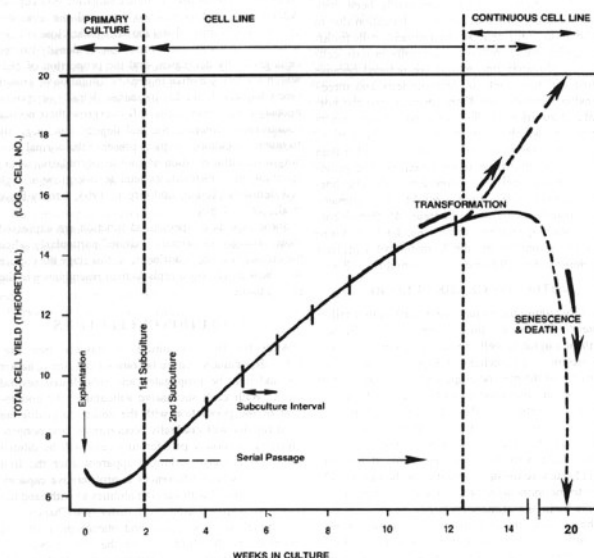
El crecimiento en monocapa significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma inicia la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje dependientes, es decir no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras. El crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes de anclaje, y es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores. 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 cepa ("stem cells") indiferenciadas.

Cuando se mantiene el cultivo se establece una nueva selección: aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. En el momento en que se alcanza la confluencia las células, en general, detienen su crecimiento, aunque pueden existir tipos celulares, neoplásicos, que sigan duplicándose y que desplacen a los otros del cultivo.

Así pues se ha de entender el cultivo como un ente dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a la que estén sometidos.

Una vez se alcanza la confluencia en el cultivo es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado cuando el parecido morfológico y fisiológico es mayor al modelo celular de origen. Es también el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir, replaquear o propagar las células.

Es una observación generalizada que después del tercer replaqueo el cultivo se estabiliza y homogeneiza: el tipo celular de mayor tasa de crecimiento ha ocupado completamente el cultivo desplazando a los otros tipos celulares. En general, si no se establecen condiciones selectivas las células del tejido conjuntivo, especialmente fibroblastos, serán las seleccionadas finalmente. Para evitar que las células más especializadas del cultivo se vean desplazadas de éste por los fibroblastos y otras células de rápido crecimiento se han establecido protocolos detallados de medios selectivos.



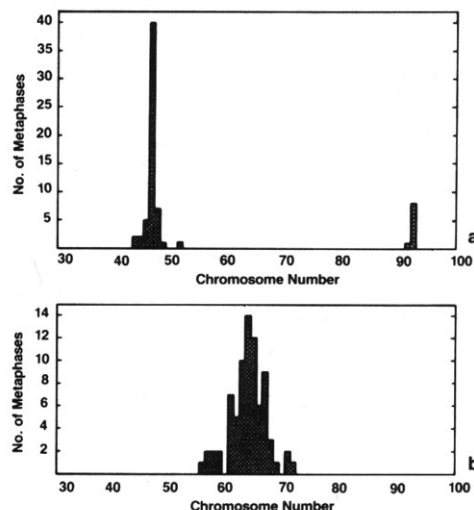
Evolución de una línea celular hipotética. Comportamiento a lo largo de las semanas.

En el momento en que las células comienzan a dividirse en la placa su número se incrementa, hasta ocupar todo el espacio. En ese momento es necesario tomar algunas y resembrar en una nueva placa. En el caso de células en cultivo primario el factor de dilución de un pase al siguiente suele ser de 1/2 a 1/5 pero no superior. En el caso de líneas celulares establecidas la dilución puede ser tan elevada como 1/100 o 1/1000, siendo la habitual 1/10. El caso más extremo serían los procesos de clonaje en los que se siembran en pocillos (multiwell de 96 pocillos) 1 única célula.

El crecimiento de las células en cultivo primario prosigue a lo largo de una serie de generaciones o pases característicos de cada tipo celular y condiciones de cultivo. Así los hepatocitos de adultos no se establecen más que como cultivo primario mientras que las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) permanecen en cultivo de 3 a 9 pases, y los fibroblastos dérmicos humanos pueden superar los 20 pases. Sin embargo al final todas ellas entran en una fase de senescencia, con acumulación de numerosas anomalías, pérdida de funciones especializadas, etc... que conducen a la muerte del cultivo.

Sólo ocasionalmente un cultivo primario se mantiene durante más generaciones de las esperadas. Es debido a la aparición en el cultivo de células inmortales. Estas células forman líneas estables o cultivos celulares permanentes. La razón de la immortalización de estas células es en la mayor parte de los casos desconocida pero se incrementa la frecuencia de immortalización mediante infecciones virales, tratamientos con mutágenos, etc... por lo que deben estar relacionadas con la pérdida, espontánea o inducida por el tratamiento, de las vías de control celular. Se hipotetiza que la capacidad de un cultivo celular primario para establecerse como línea estable está relacionado directamente con su variabilidad genética. Así líneas celulares que nunca se establecen como estables se mantienen euploides como es el caso de fibroblastos humanos (Hayflick y Moorhead, 1961), fibroblastos de pollo (Hay y Strehler, 1967), y la glia humana (Pontén y Westermarck, 1980) mientras que otras líneas frecuentemente se convierten en aneuploides y se transforman en líneas celulares continuas con mayor frecuencia, como es el caso de las células epidérmicas (Green y col., 1979; Thomas J., 1979).

Comparación del número de cromosomas por célula en una línea primaria glial y una línea estable de melanoma.

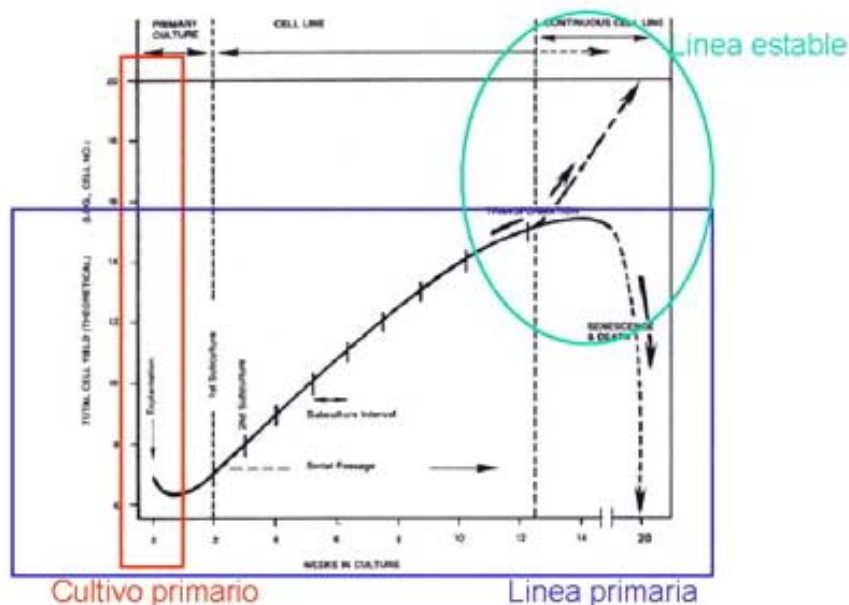


Existen diferencias muy importantes entre una línea celular continua y una línea primaria o un cultivo primario. En la tabla siguiente se recogen las propiedades diferenciales de las líneas finitas y continuas.

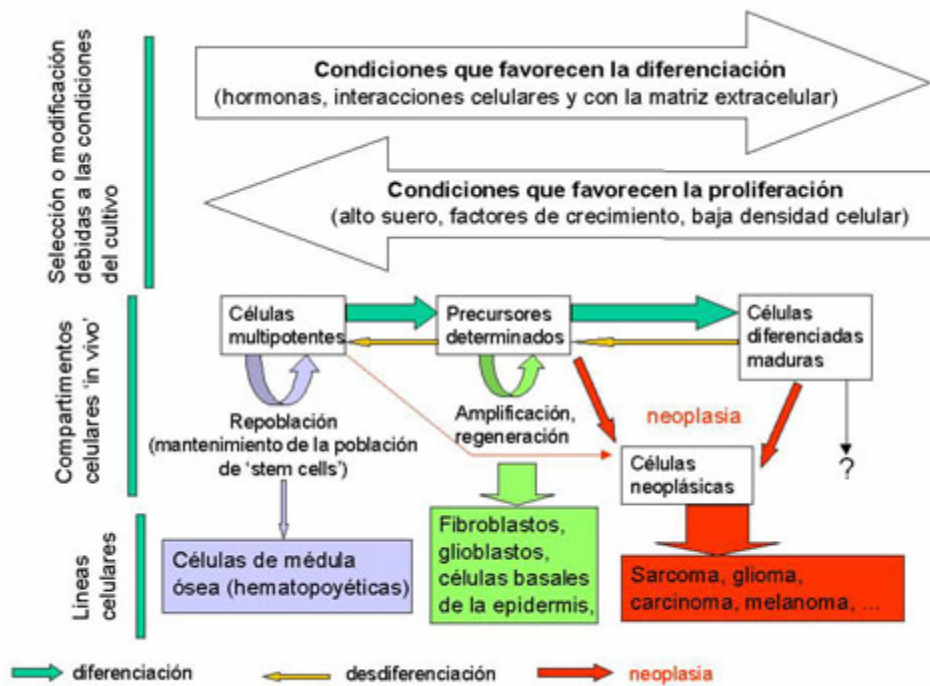
	Final	Continua
Ploidía	Diploide / Euploide	Heteroploide / Aneuploide
Transformación	Normal	Transformada
Tumorigenicidad	No-tumorigénica	Tumorigénica
Dependencia de anclaje	Si	No
Inhibición por contacto	Si	No
Limitación de crecimiento por densidad	Si	No
Mantenimiento	Cíclico	Posible mantenerlas quiescentes
Requerimientos de suero	Elevados	Bajos
Eficiencia de clonaje	Baja	Elevada
Marcadores	Pueden expresar marcadores específicos	Cromosomales, enzimáticos... se pierden
Funciones especializadas	Se mantienen	Se suelen perder
Tasa de crecimiento	Baja (24 a 96 h tiempo de replicación)	Rápida (12 a 24 h)
Rendimiento en cultivo	Bajo (<10 ⁶ células/mL; <10 ⁵ células/cm ²)	Alto (>10 ⁶ células/mL; >10 ⁵ células/cm ²)

Algunas definiciones que son importantes son:

- **Cultivo primario.** Cultivo establecido a partir de un tejido u órgano. Las células mantienen la viabilidad un periodo de tiempo limitado y no se reproducen en cultivo. En general en cultivo presentan una reducción en el número total de células vivas a lo largo del tiempo. Ejemplos: hepatocitos obtenidos de hígado adulto, neuronas, etc...
- **Línea primaria.** Cultivo establecido a partir de un tejido u órgano que se mantiene un periodo de tiempo limitado pero con reproducción de las células en el cultivo. Ejemplos: fibroblastos dérmicos, queratinocitos, células endoteliales de aorta bovina (BAEC), células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC), etc...
- **Línea celular continua.** Cultivo que se establece a partir de un tejido u órgano, en muchos casos de un tumor, y que se mantiene en cultivo un tiempo ilimitado. Se trata de células "inmortales".



El cultivo de las células no presenta las mismas dificultades independientemente del tipo de célula de que se trate. Hay grandes diferencias que se relacionan fundamentalmente con el grado de diferenciación del tipo celular. Así pues en general se puede establecer como norma que una línea celular será tanto más fácil de establecer o cultivar cuanto más indiferenciada sea, con las excepciones de las líneas tumorales de células diferenciadas.



Los cultivos primarios de muchos tipos celulares son posibles porque las células pierden algunas de sus propiedades diferenciadas, entre ellas la característica incapacidad de dividirse, y se convierten en células que mantienen tan solo algunas de las propiedades que las caracterizaban. Esta pérdida de propiedades puede ser debida a desdiferenciación o desadaptación. La primera implica una pérdida irreversible de una propiedad diferencial del tipo celular (por ejemplo un hepatocito en cultivo pierde sus enzimas característicos (arginasa, aminotransferasas,...) no puede almacenar glucógeno ni sintetizar las proteínas del suero...), mientras que la segunda implica que la característica especializada perdida no es irreversible sino consecuencia de la pérdida de la señal (por ejemplo externa, hormonal, nerviosa, ...) y que basta con recuperarla para que se reexpresen (por ejemplo Michalopoulos y col. (Michalopoulos y Pitot, 1975; Sattler y col., 1978) han demostrado que los hepatocitos de rata pueden reexpresar tirosina aminotransferasa en presencia de ciertas hormonas (insulina e hidrocortisona) cuando crecen sobre una matriz de colágeno).