

Historia de los cultivos de células animales *in vitro* y su importancia en la actualidad

History of cultured animal cells *in vitro* and its significance at present

Laura Santacruz Reyes, Ángel Melo Jimenez, Carlos Rodríguez Herrera
y Johanna Moscoso Gama

Universidad INCCA de Colombia, Bogotá, Colombia

Recibido: 12/10/2016

Aceptado: 27/01/2017

Publicado: 25/06/2017

Correspondencia:

l.santacruz@innca.co

a.melo@incca.co

c.rodriguez@incca.co

yobisna@hotmail.com

DOI: <https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc..2.2293>

Cómo citar: Santacruz Reyes L, Melo Jimenez Ángel, Rodríguez Herrera C, Moscoso Gama J. Historia de los cultivos de células animales *in vitro* y su importancia en la actualidad. *Bioc.* [Internet]. 25jun.2017 [citado diames.año];12(2). Available from: <http://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/2293>



Open Access

@Copyright: Revista Biociencias 2017

Resumen

El cultivo de células animales *in vitro* es un área de la biotecnología que avanza a pasos agigantados debido a su gran campo de acción: investigación médica, efectos farmacológicos y ambientales, trasplantes de tejidos y cirugías reconstructivas, técnicas de fusión y manipulación genética, y productos y subproductos celulares. Otro factor favorable se relaciona con sus ventajas y beneficios en cuanto a facilidad de recrear condiciones controladas para el desarrollo celular, el potencial para desarrollar investigación en pequeña, media y gran escala, alternativa al uso de animales, y reducción de costos entre otros. Desde los primeros ensayos de sobrevivencia celular fuera de organismos, el establecimiento de las primeras líneas celulares, y en la actualidad la modificación genética controlada de células, el desarrollo de medios de cultivo libres de suero y de componentes animales mediante técnicas asépticas constituyen su línea de progreso hasta brindar solución real a enfermedades, lesiones y alteraciones del hombre.

Palabras clave: Técnicas de Cultivo de Célula, Biotecnología, Investigación Genética.

Abstract

The animal cell culture *in vitro* is an area of biotechnology that is advancing rapidly due to its wide field of action: medical research, pharmacological and environmental effects, tissue transplants and reconstructive surgeries, fusion techniques and genetic manipulation, and products and by-products cell phones. Another favorable factor is related to its advantages and benefits in terms of ease of recreating controlled conditions for cell development, the potential to develop research in small, medium and large scale, alternative to the use of animals, and cost reduction among others. Since the first tests of cellular survival outside organisms, the establishment of the first cell lines, and currently the controlled genetic modification of cells, the development of culture media free of serum and animal components through aseptic techniques constitute their line of progress to provide real solution to diseases, injuries and alterations of man.

Keywords: Cell Culture Techniques, Biotechnology, Genetic Research.

I. Introducción

Las células, son la parte esencial para el funcionamiento básico de la vida que conforma a todos los seres vivos (1). Estos organismos pueden organizarse en pluricelulares y multicelulares, estos últimos; se desarrollan en diferentes tipos de células eucariotas, las cuales presentan diversos tamaños, formas y funciones (especializadas), las cuales llevan al desarrollo la formación de tejidos y/u órganos, para conformar un organismo más complejo con capacidades mayores a las de sus componentes (2,3).

El ser humano, siempre ha querido averiguar todas las actividades funcionales de las células en los organismos vivientes. Por lo que se empezaron a desarrollar cultivos de estas, los orígenes del cultivo de células animales se remontan a mediados del siglo XIX, donde los científicos de aquella época empezaron a establecer técnicas para la perduración, observación, y la visión de realizar cultivos de células de manera aislada (4).

El cultivo de células animales *in vitro* se inició a finales del siglo XIX, cuando se realizó el primer intento para desarrollar el crecimiento de órganos en distintos animales sumergiéndolos en fluidos biológicos. A pesar de ellos, hasta 1907 se tiene en cuenta al cultivo celular como un método simplemente para estudiar el comportamiento de las células animales independientemente de las variaciones sistémicas (5). Por tanto, se originaron una serie de complicaciones en las primeras siembras, una de las limitaciones era lograr establecer un medio nutritivo adecuado, lo cual fue logrado en 1910 por Burrowsel, plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo, fue uno de los primeros medios que permitió la observación y el crecimiento de tejidos.

En otro intento Burrows y Carrel, realizaron los primeros cultivos celulares de mamífero, los explantes obtenidos de perros, gatos y conejo se lograron conservar y obtener de esta manera, crecimiento de tumores sólidos. Su ensayo, los llevo a determinar que la vida en los diferentes cultivos se puede prolongar por medio de subcultivos. Empleando en los medios plasma suplementado con extractos de embrión.

En 1912 (6) se utilizó por primera vez extractos enriquecidos de tripsina gracias a Roux y Jones, la finalidad de la tripsina fue romper las células de embriones de pollo, creando de esta manera el primer cultivo celular, conocido y funcional. Pero siempre se han presentado problemas en los cultivos celulares por la contaminación, y para resolver esta problemática, se han desarrollado numerosos métodos de manipulación en pro de conseguir medios libres de contaminación.

Carrel en 1913 demostró cómo mantener un medio de cultivo de células extraídas de embrión de pollo, las cuales se mantuvieron durante 34 años, periodo de tiempo superior al de la vida de este. Entre 1920 y 1940 se implementaron diversas estrategias de obtención de cultivo y de mantenimiento de las en condiciones estériles, pero no hubo 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, *et al.*, aislaron células de línea celular L y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo de tejidos. Dejando en claro que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes correctos.
- 1952, *et al.*, establecen la primera línea celular continua HeLa y el medio usado fue complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.
- 1954 Rita Levi-montalcini, *et al.*, mostraron que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo “Premio Nóbel para Levi-Montalcini en 1986”.
- 1955 Eagle, realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo. Describiendo 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 en un medio de cultivo 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.
- 1969 Augusti-Tocco y Sato establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma
- Aislado clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables. Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas.
- 1974 Albert Claude, George Palade y Christian de Duve, hacen posible la mirada a las estructuras subcelulares y organelas de una célula con primeras fotos de una célula por medio de microscopio electrónico.
- 1975 Kohler y Milstein establecen la primera línea celular híbrida productora de anticuerpos monoclonales. El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nóbel.
- 1976 Sato, *et al.*, mostraron las diferentes líneas celulares que requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero.
- 1980 se empiezan a conocer los mecanismos de la transformación.
- 1990 empezaron a producirse medicamentos a escala industrial en biorreactores. Se desarrolla la biotecnología.
- 1998 se produce cartílago mediante ingeniería de tejidos y en 2003 se experimenta el auge de esta nueva disciplina.
- 2007 se reprograman células adultas para convertirlas en células pluripotenciales inducidas.

Teniendo en cuenta todos los antecedentes en diversos cultivos celulares, se empezaron a construir los primeros experimentos exitosos para el mantenimiento de cierto conjunto de células no disgregadas o explantes de diferentes tejidos, sin embargo, el crecimiento se limitó a migración de células desde el tejido con la ocasional presencia de mitosis (5,6).

II. Contexto del cultivo de células en la actualidad

La definición general que se le ha dado al cultivo de células animales, es el aislamiento de un tipo específico de células provenientes de tejidos u órganos animales, que posteriormente son colocadas en un ambiente artificial que favorece su división, crecimiento, multiplicación y en algunos casos, diferenciación (7).

Y el cultivo de células animales ha permitido estudiar la actividad intracelular, los flujos metabólicos, las interacciones con el medio ambiente, las interacciones célula-célula, la genética y la generación de metabolitos de interés (7). Estos principios básicos han sido aplicados en muy diversas disciplinas de las ciencias naturales, abarcando desde la biología celular, biología del desarrollo y la fisiología, y es por esto, que se han establecido parámetros de diferenciación en las denominadas líneas celulares.

III. Clasificación del cultivo de células

Cultivo Celular. Es aquel cultivo de células que tiene una alta capacidad de multiplicarse *in vitro*, el cual es establecido a partir del primer subcultivo de un cultivo primario y que tiene las mismas características que el tejido de origen.

Cuando las células son aisladas a partir de un tejido donante, pueden ser mantenidos de diferentes maneras, ya sea de forma espontánea o con la ayuda de medios mecánicos, usando el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento, la supervivencia y multiplicación *in vitro* de células derivados de órganos específicos, explantes primarios o de linajes celulares tratando de conservar al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas (4,8).

- **Cultivo de órganos:** se coloca el órgano sobre una rejilla situada en la interfase líquido-gas de un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos. Este tipo de cultivo, permite mantener al menos en parte, la arquitectura característica del tejido "in vivo". Se conservan las interacciones histológicas y, gracias a ello, este cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados, por lo que representan una buena réplica del tejido de origen. Sin embargo, no crecen mucho "la proliferación celular se limita a las células embrionarias periféricas", y no se pueden propagar.
- **Explantos primarios:** se ubica un fragmento de tejido o de órgano en la interfase sólido-líquido de un soporte de vidrio o de plástico. Las células se adhieren a la superficie y las células de la periferia del explante pueden migrar y proliferar por la superficie del soporte.

- **Cultivo celular primario:** Es el tipo de cultivo más utilizado, y se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Existen dos tipos de cultivo celular primario: Cultivos en monocapa y en suspensión.

En cuanto a las células diferenciadas en un tejido tienen una capacidad limitada para proliferar. Así, las células presentan diversas capacidades dependiendo del medio y las condiciones que se le proporcionen, una de las propiedades es la capacidad de adherencia, la cual está asociada con el tipo de célula, en las cuales influye el tipo de proteína que se presente en la superficies; la capacidad en la superficie, en la cual muchas de las células se encuentran, debido a que en ella se sintetizan proteínas relacionadas con la matriz extracelular la cual está encargada de mantener unidas a las células y tiene un papel regulador sobre las mismas *in vivo*, sin embargo, la célula puede crecer en monocapa o suspensión(9,10,11).

Algunas de las macromoléculas involucradas son la colágena, la fibronectina, la laminina y el proteoglicano, las cuales constituyen interacciones con las proteínas de la membrana citoplásmica de la célula, denominadas integrinas (son una superfamilia de glicoproteínas que participan mayoritariamente en la unión de las células con la matriz extracelular), CAMs (microorganismo del complejo de ataque a la membrana) y cadherinas (moléculas de adhesión celular de glicoproteínas transmembranales responsables de las uniones célula-célula para mantener la integridad de los tejidos animales).

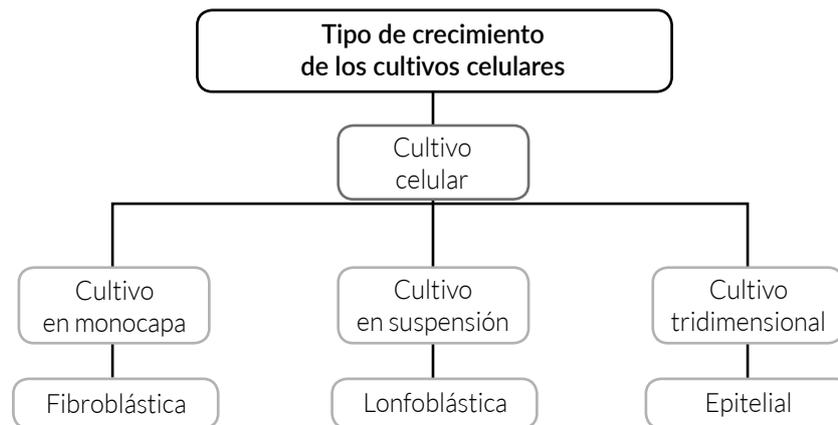
Estas proteínas además de mantener unidas a las células también participan en la transmisión de señales del exterior hacia el interior de las células. En cultivos en monocapa, la interacción de este conjunto de proteínas se da por medio de las adhesiones focales.

IV. Acción de los cultivos celulares

Los cultivos en monocapa (Grafica 1) representan una de las formas de crecimiento *in vitro* de las células provenientes de cultivos primarios o de líneas celulares dependientes de anclaje. Las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio), al que, propician el anclaje al sustrato para la proliferación celular.

Las células que se desarrollan de esta manera son estables genéticamente y tienen una naturaleza diploide normal. La monocapa celular crece (confluencia) cubriendo la superficie de soporte hasta que se establece contacto entre las células, lo que causa que éstas detengan su crecimiento.

Existen algunas líneas celulares que tienen la capacidad de crecer tanto en monocapa como en suspensión (células de insecto, BHK21, hibridomas), sin embargo, son muy pocas las que tienen esta dualidad (12).



Grafica 1. Tipo de crecimiento de los cultivos celulares. De acuerdo a las características del soporte y el origen celular, los cultivos se pueden clasificar en monocapa, en suspensión o tridimensionales.

El crecimiento en suspensión se presenta en células cuya naturaleza es de ese tipo como en el caso de células hematopoyéticas o en aquéllas que han perdido o disminuido la síntesis de proteínas de anclaje y no desarrollan el proceso de crecimiento como algunas líneas celulares transformadas artificialmente o de células procedentes de tumores. Las células que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies pueden ser adaptadas a crecer en suspensión después de ser sometidas a una serie de subcultivos, al hacer modificaciones genéticas o cambiando el medio de cultivo.

Los cultivos continuos y de perfusión ofrecen ventajas económicas decisivas cuando se trata de aumentar la escala de operación en células en suspensión.

Mientras que en los cultivos tridimensionales se busca mantener la arquitectura *in vivo* del tejido de origen. En el caso del epitelio, los sistemas tridimensionales permiten estudiar la proliferación, morfología e interacciones intra e inter celulares. De igual forma se puede evaluar el efecto de sustancias que pueden afectar tales interacciones. En este tipo de cultivo es posible mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, sin embargo, la propagación celular es dependiente de las características de la biomatriz soporte (13,14).

Por otro lado, el cultivo de células animales presenta tres morfologías importantes: linfoblástica, fibroblástica y epitelial. Relacionadas con el origen del tejido primario (4). Las líneas con morfología linfoblástica crecen en suspensión mientras que las dos últimas crecen en forma adherente. Por tanto, la morfología de la célula correcta depende de las características dadas por el soporte. Donde las células que se separan, tienden a formar esferas, pero en el momento que se adhieren vuelven a adquirir una forma específica (5).

Cultivo Primario y subcultivo. Es cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de algún órgano de un animal; son consideradas como cultivo primario

hasta que se subcultivan con éxito. Los cultivos primarios se caracterizan por estar constituidos por diferentes tipos de células cuya morfología es marcada de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide, su crecimiento *in vitro* es limitado y presentan inhibición por contacto generado por vías de señalización intra e intercelulares (16).



Grafica 2. Esquema cultivo celular.

Cultivo secundario, se establece a partir de un subcultivo exitoso obtenido de un cultivo primario y las células dependientes de anclaje forman una monocapa que puede llegar a cubrir el soporte en el que crecen (grado de confluencia) (17). El subcultivo implica el desprendimiento de las células adheridas, la dilución de la densidad celular y su reinoculación en medio fresco. Las células pueden crecer a una velocidad constante en diversos subcultivos sucesivos, recibiendo cada uno de ellos el nombre relacionado con el pase (12).

Cultivo de explantes, son fragmentos de tejidos u órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia.

Cultivos continuos o líneas celulares. Consiste de células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las que se originaron. Pueden provenir de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario por medio de una pérdida de regulación debido al subcultivo continuo o mediante transfección con oncogenes, o el tratamiento con agentes carcinogénicos. Las líneas celulares continuas son aquellas que han demostrado posibilidades de ser subcultivadas *in vitro* por lo menos 70 pases consecutivamente y que presentan características genotípicas diferentes al tejido del cual fueron originadas. Las líneas celulares continuas pueden ser transfectadas con genes específicos para la producción de proteínas de interés, se les conoce como líneas celulares transformadas genéticamente (17). En general, algunas de estas líneas se caracterizan por no tener inhibición por contacto y crecer de manera indefinida e independiente del número de pases o subcultivos (18).

Tabla 1. Ejemplo de algunas líneas celulares, tomado de Montalván, 2009 (4).

Línea celular	Características	Origen
293	Hígado (humano) transformado con adenovirus	Humano
3T3	Fibroblastos de anclaje	Tejido conectivo de ratón
BHK21	Fibroblastos de anclaje	Riñón de cría de hámster Sirio
CHO	Células en suspensión, semejantes a epiteliales	Ovario de hámster Chino
COS	Hígado	Mono
E14,1	Células madre embrionarias	Ratón
H1, H9	Células madre embrionarias	Humano
HeLa	Células en suspensión, semejantes a epiteliales	Carcinoma cervical humano
IMR-90	Células en suspensión, semejantes a epiteliales	Pulmón de embrión humano
L	Fibroblastos de anclaje	Tejido conectivo de ratón
L6	Mioblasto	Rata
McCoy	Fibroblastos de anclaje	Origen de ratón similar a células T
MDCK	Semejantes a epiteliales	Riñón canino
MPC-11	Células en suspensión, semejantes a linfoblastos	Mieloma de ratón
MRC-5	Fibroblastos diploides, vida limitada	Pulmón de embrión humano
Namalwa	Células en suspensión, semejantes a linfoblastos	Linfoblastoide humano
PC12	Célula cromafin	Rata
PtK1	Célula epitelial	Rata canguro
R1	Células madre embrionarias	Ratón
S2	Células similares a los macrófagos	Drosophila
SP2	Célula plasmática	Ratón
Vero	Fibroblastos de anclaje	Mono verde africano
WI-38	Fibroblastos de anclaje	Pulmón de embrión humano
WISH	Semejantes a epiteliales	Amnion humano

V. Conclusiones

- La infección del torrente sanguíneo es una de las entidades frecuente en el medio hospitalario con una carga alta de morbilidad, mortalidad y costos sanitarios.
- *Pseudomona aeruginosa* es el tercer patógeno Gram negativo más frecuente en infecciones del torrente sanguíneo.
- La capacidad de adaptación a medios hostiles y capacidad de adquisición de mecanismos resistencia, hacen de la *Pseudomona aeruginosa* una bacteria susceptible a la selección de cepas multidrogoresistentes a los fármacos disponibles.

- La terapia combinada incrementa la actividad antimicrobiana a través del efecto sinérgico farmacodinámico, maximiza la tasa y extensión de eliminación, previene el crecimiento de subpoblación resistente y minimiza la presión selectiva.
- A pesar de las limitaciones metodológicas de los ensayos clínicos, la terapia de manejo contra *Pseudomona aeruginosa* multidrogoresistentes en infecciones del torrente sanguíneo, la piedra angular son las Polimixinas en combinación a un segundo antimicrobiano antipseudomona.
- En la terapia combinada los estudios clínicos y las series de casos evidencia que el uso de carbapenems como segundo antibiótico junto a polimixinas han demostrado incrementar el efecto bactericida contra aislamientos multidrogoresistentes lo que se ve reflejado, en menores tasas de mortalidad entre pacientes tratados con este régimen.

VI. Cultivos histotípicos y organotípicos

Los cultivos histotípicos son cultivos de un solo tipo celular que consigue alcanzar una elevada densidad celular (tal y como ocurre en los tejidos). Mientras, los cultivos organotípicos y la arquitectura característica del tejido in vivo se mantiene parcialmente. El órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes, donde libera los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, generalmente esférica. Estos cultivos permiten mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero no permite su propagación ya que el crecimiento de producirse es limitado periferia. La imposibilidad de propagación obliga, en cada nuevo experimento, a partir de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad (19).

Mientras el cultivo de células supone una disgregación celular, ya sea por medios enzimáticos o mecánicos y la suspensión celular que se obtiene 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, puesto que las células que se cultivan directamente desde el sujeto son células primarias; estos tienen un periodo de vida limitado, ya que después de un cierto número de divisiones las células entran en el proceso de senescencia y dejan de dividirse, manteniendo la viabilidad. Ocasionalmente, un cultivo primario se mantiene durante más generaciones de las esperadas (20).

VII. Aplicaciones del cultivo celular

Los cultivos celulares se utilizan tanto en la investigación básica como en la aplicada. En la investigación básica, permiten estudiar fenómenos complejos como, por ejemplo:

- La actividad intracelular: transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, ciclo celular, diferenciación, apoptosis.
- El flujo intracelular de biomoléculas: procesamiento del ARN, el movimiento del ARN desde el núcleo hacia el citoplasma, el movimiento de las proteínas hacia diversos orgánulos, el ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos.

- Genómica y proteómica: análisis genético, infección, transformación celular, inmortalización, senescencia, expresión génica, rutas metabólicas.
- Ecología celular: el estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular y de su diferenciación, el estudio de las necesidades nutricionales, la cinética de la población celular.
- Las interacciones celulares: morfogénesis, proliferación celular, adhesión celular, interacciones con la matriz, invasión celular.
- En la investigación aplicada, las técnicas de cultivo celular utilizan en campos tan diversos como:
- Virología: Cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas.
- Biotecnología: producción industrial de fármacos en biorreactores (interferón, insulina, hormona de crecimiento).
- Inmunología. Producción de anticuerpos monoclonales, señalización, fenómenos de inflamación.
- Farmacología: Efecto de diversos fármacos, interacciones con el receptor, fenómenos de resistencia.
- Ingeniería de tejidos. Producción de tejidos artificiales (piel, cartílagos) para el tratamiento de grandes quemados, injertos o autotransplantes, desdiferenciación y diferenciación inducida.
- Toxicología: citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis.

VIII. Ventajas del cultivo celular

- Control del medio extracelular que se puede controlar en un cultivo.
- Distintos factores como: pH, temperatura, humedad, presión osmótica, tensiones de O₂ y de CO₂, concentración de nutrientes, etc; se pueden controlar a conveniencia.
- Homogeneidad de la muestra. Ya que las células de un cultivo son bastante homogéneas en comparación con la variabilidad existente entre animales de experimentación.
- Disminución del gasto. Si se experimenta con fármacos, al utilizarse cultivos de células se utilizan concentraciones muy bajas de dichos productos.
- Disminución de la necesidad de realizar ensayos *in vivo*. Evitándose en gran medida el sacrificio de animales de experimentación.
- Desarrollo de cultivos histotípicos y organotípicos que incrementan la fiabilidad de los modelos experimentales.

Limitaciones:

- Excesiva sensibilidad dado que el crecimiento de las células es relativamente lento y es dependiente en muchos casos de factores no del todo conocidos. Además, existen contaminantes como:

hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas y virus que suelen tener un crecimiento más rápido y pueden llegar a matar las células en cultivo.

- Límite de producción a causa de la cantidad normal en el laboratorio de 10g de células.
- Inestabilidad a muchas líneas celulares continuas son inestables por ser aneuploides (cambio en el número cromosómico).

IX. Desventajas del cultivo celular

Las técnicas de cultivo celular necesitan unas estrictas condiciones de asepsia porque las células animales crecen menos rápido que la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, los mohos y las levaduras. Además, las células precedentes de animales no pueden desarrollarse en medios de cultivo, por lo que es necesario agregar a los medios suplementos como suero, plasma y fluidos intersticiales, entre otros para de una manera u otra proveer a las células cultivadas un medio semejante al in vivo (21).

Una mayor limitación en el cultivo de células es el gasto de esfuerzo y materiales para la producción de una pequeña cantidad de células o de tejido. Los costos de producir células en cultivo son diez veces más que el uso de tejido animal, ya que se invierte bastante en ensayos o procedimientos preparativos que pueden ayudar en la estandarización del proceso reduciendo tiempo de manipulación, volúmenes de muestra, tiempos de centrifugación, etc. (22).

En los cultivos celulares se dificulta relacionar las células cultivadas con las células funcionales ubicadas en el tejido del cual son derivadas, esto porque en la mayoría de los casos presentan propiedades muy diferentes; para esto es necesario utilizar marcadores de células los cuales van a ser de gran ayuda en el momento de caracterizarlas en cultivo porque van a garantizar que las células crecidas en cultivo son las mismas que se sembraron y no otras. Además, suelen presentarse problemas de inestabilidad genética cuando se realizan varios pases de cultivos de células no transformadas, lo que va a originar una gran heterogeneidad en el crecimiento de las células y en su diferenciación (23).

X. Cultivo de células animales y su perspectiva a partir de las contaminaciones

Las células eucariotas en cultivo crecen lentamente, con tiempos superiores a las 24 h (24). En caso de ocurrir una contaminación por estos organismos pueden provocar la muerte del cultivo en poco tiempo (7). Para evitarlo se utilizan una serie de técnicas de trabajo que suponen la máxima asepsia, así como la esterilización del material y el trabajo en ambientes estériles (cabina de flujo laminar) (25). Asimismo, se utilizan cócteles de sustancias antimicrobianas y antifúngicas en el medio, aunque en multitud de ocasiones no es posible usarlas o bien no son suficientes para prevenir la aparición de microorganismos (26).

Contaminación bacteriana y levaduras. Los medios de cultivo proporcionan un medio ideal para el crecimiento de los contaminantes microbianos y los procedimientos de manipulación son susceptibles

de provocar contaminación por bacterias; los antibióticos añadidos en los cultivos a corto no son recomendables en los cultivos a largo plazo. Para evitar las contaminaciones por bacterias es necesario extremar las condiciones de esterilidad y realizar controles sobre las soluciones y envases a usar (27). Los controles de esterilidad están diseñados para detectar no aquellos contaminantes de crecimiento rápido que producen cambios considerables en el medio de cultivo (28).

- Trabajo en ambiente estéril, en una cabina de flujo laminar o en el área de influencia de un mechero bunsen.
- Usar pipeteadores automáticos y pipetas automáticas. Si no se dispone de estos nunca pipetear directamente con la boca sino mediante un tubo de goma e intercalando algodón en la boca de la pipeta.
- Mantener los recipientes abiertos tan poco tiempo como sea posible.
- Todas las botellas de medio y de soluciones atemperadas en un baño deben secarse cuidadosamente antes de usarlas.
- Ante cualquier duda limpiar con alcohol 70% o flamear el material que pueda estar contaminado si no es reemplazable, o reemplazarlo si es posible.
- Si se descubre un recipiente contaminado no se debe abrir. Si se han de tomar muestras para su análisis conviene hacerlo en ambiente estéril y después limpiar cuidadosamente el área de trabajo y conectar la iluminación UV.

Contaminación por micoplasmas. Los micoplasmas son células procariotas pequeñas (0,3 a 0,5 μL de diámetro) que pueden formar pequeñas colonias. No poseen pared celular y por ello sólo son capaces de crecer en ciertos medios.

Los cultivos primarios suelen estar libres de micoplasmas, pero muchas de las líneas celulares continuas están infectadas. La contaminación suele proceder de suero animal contaminado (29).

Dado que la contaminación con micoplasmas no es tan evidente como la contaminación por bacterias o levaduras es importante por una parte tener en cuenta el posible efecto de los micoplasmas sobre el cultivo, y realizar controles periódicos de su presencia (30).

Los efectos dependen de la especie implicada. Otras especies no producen la muerte celular pero retardan el crecimiento celular pues consume los requerimientos del medio (31).

Contaminación por virus. Es un problema grave pues su prevención y eliminación es realmente difícil por lo que los sueros deben ser controlados rutinariamente, aunque la validez de estos ensayos es limitada. Por ello la única alternativa es el uso de medios libres de suero.

Los virus pueden tener un efecto citopático marcado, pero los más peligrosos son aquellos que crecen a baja tasa o en unas pocas células tan sólo (32).

XI. Referencias bibliográficas

1. Mazzarello, P. 1999. A unifying concept: the history of cell theory. *Nature Cell Biology*. 1 (1):13-15.
2. Cooper G, Hausman RE. *The Cell*. 4 Edition. Editorial ASM Press. USA. pp. 4-37.
3. Nelson D.L., Cox M.M. 2004. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 4ª Edición. MPS Publishers. USA. pp. 3-12.
4. Montalván, C. A. T., García, A. O., González, I. D., Mondaca, S. E., y Acosta, A. M. (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40 (4), 35-46.
5. Harrison R.G. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 4(1):140-143.
6. Carrel A. On the permanent life of tissue outside the organism. *Jouof ExpMed*. 1912; 15 (1): 516-528.
7. Freshney R.I. 2005. *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. Ed. John Wiley. USA. pp 4-37.
8. Freshney, R. I. (2006). Basic principles of cell culture. *Culture of cells for tissue engineering*, 11-14.
9. Ham, R.G., McKeehan, W.L. (1978) Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells. *In Vitro* 14: 11-22.
10. Mather, J.P. (1998) Making informed choices: medium, serum, and serum-free medium. How to choose the appropriate medium and culture system for the model you wish to create. *Methods Cell Biol*. 57: 19-30.
11. Karmiol, S. (2000) Development of serum-free media. In Masters, J.R.W, ed., *Animal Cell Culture*, 3rd Ed. Oxford, Oxford University Press, pp. 105-121.
12. Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animal). Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología.
13. Visconti R.P., Kasyanov V., Gentile C., Zhang J., Markwald R.R., Mironov V. 2010. Towards organ printing: engineering an intra-organ branched vascular tree. *Expert Opinion Biological Therapy*. 10 (3): 409-20.
14. Williams D.F. On the nature of biomaterials. 2009. *Biomaterials*. 30 (30): 897-909.
15. Sánchez, M.A. O., Ortega, M. L. O., & Barrientos, J. V. R. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*, 23 (1).
16. Wiktor T.J., Fernández M.V., Koprowski H. 1964. Cultivation of Rabies Virus in Human Diploid Cell Strain WI-38. *Journal of Immunology*. 93 (1): 353-366.
17. Morier, L., Gómez, M., Rodríguez, J. J., & Pérez, L. (2004). Obtención y caracterización de una línea celular diploide de riñón humano. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(1), 42-48.
18. Vesely, P. (2004). *Molecular biology of the cell*. By Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and Peter Walter. *Scanning*, 26 (3), 153-153.

19. Pauwels, K., Van Vaerenbergh, B., Dai Do Thi, C., Berghmans, L., Waeterloos, G., Van Bockstaele, D., & Sneyers, M. (2007). Animal cell cultures: Risk Assessment and biosafety recommendations. *Appl-Biosafety*, 12, (1), 26-38.
20. Betancourt Gamboa K, Barciela Calderón J, Guerra Menéndez J, Cabrera Carballo N. Uso de células madre en el complejo bucofacial. *Rev Arc Méd (Camagüey)*. 2012; 16(5), 651-661.
21. Hermersdörfer, H. (1995). *RI Freshney: Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. 486 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. Wiley-Liss, a John Wiley and Sons, Inc., Publication. New York, Chichester, Brisbane, Toronto. Singapore 1994.
22. Brand T, André B, Schneider A, Buchberger A, Arnold HH. (1997). Chicken NKx2-8, a novel homeobox gene expressed during early yolk and foregut development. *Mech of dev*. 1997; 64(1), 53-59.
23. Driscoll, D. A., Salvin, J., Sellinger, B., Budarf, M. L., McDonald-McGinn, D. M., Zackai, E. H., & Emanuel, B. S. (1993). Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *Journal of Medical Genetics*, 30(10), 813-817.
24. Fogh, J., Holmgren, N. B., & Ludovici, P. P. (1971). A review of cell culture contaminations. *In vitro*, 7(1), 26-41.
25. Nardone, R. M. (2007). Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell biology and toxicology*, 23(6), 367-372.
26. Gil-Loyzaga, P. (2011). Cultivo de células animales y humanas: aplicaciones en medicina regenerativa. *Visión*.
27. Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico diagnóstico: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.
28. Gentilini, E., Reinoso, E., Echeverría, M., & Leardini, N. (2007). *Microbiología veterinaria*. N. O. Stanchi, & P. E. Martino (Eds.). Inter-Médica.
29. Rivera-Tapia, J. A., Zurita, G. M., & Méndez, C. R. (2006). Contaminación por micoplasmas en cultivos celulares. *An Med (Mex)*, 51(3), 109-112.
30. Rivera-Tapia, J. A., Cedillo-Ramírez, M. L., & Juárez, C. G. (2002). Some biological features of Mollicutes. *Revista Latinoamericana de microbiología-México*, 44(2), 53-57.
31. Van Kuppeveld, F., van der Logt, J., Johansson, K. E., & Melchers, W. (1996). Demonstration of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by a Mycoplasma Group-Specific Polymerase Chain Reaction. *Human Cell Culture Protocols*, 525-538.
32. Robertson JS, Cook P, Attwell AM, et al. Replicative advantage in tissue culture of egg-adapted influenza virus over tissue-culture derived virus implications for vaccine manufacture. *Vaccine* 1995; 13:1583-8.