

2019

Cultivos de células animales: historia, aplicaciones y perspectivas

Yenny Yolanda Lozano Jiménez
Universidad de La Salle

Diana Carolina Ochoa Cabezas
Universidad de La Salle

Ángela Cristina Zapata Lesmes
Universidad de La Salle

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/ai>

Citación recomendada

Lozano Jiménez, Yenny Yolanda; Ochoa Cabezas, Diana Carolina; and Zapata Lesmes, Ángela Cristina (2019) "Cultivos de células animales: historia, aplicaciones y perspectivas," *Ámbito Investigativo*: Iss. 1 , Article 11.
Disponible en:

This Artículo is brought to you for free and open access by the Revistas Unisalle at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in *Ámbito Investigativo* by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Cultivos de células animales: historia, aplicaciones y perspectivas



YENNY YOLANDA
LOZANO JIMÉNEZ
DIANA CAROLINA
OCHOA CABEZAS
ÁNGELA CRISTINA
ZAPATA LESMES



El cultivo de células animales es una de las herramientas alternativas y vanguardistas más empleadas en investigación, producción biotecnológica y biofarmacéutica en la actualidad. Se definen como una herramienta alternativa, en la medida en que se evita el uso de animales experimentales, simulando, con ciertas restricciones, la respuesta del tejido vivo. Es una técnica que consiste en el aislamiento de células extraídas de un tejido de interés, para colocarlas en un ambiente artificial de crecimiento propicio para su supervivencia y multiplicación. Este medio artificial debe proveer las condiciones para que las células mantengan todas sus funciones metabólicas de manera semejante a las que tenían en el organismo original. Son medios enriquecidos, como los alimentos que se ingieren en la dieta diaria, con vitaminas, minerales, iones, carbohidratos, lípidos y proteínas. Por tanto, dentro de los requerimientos fisicoquímicos y biológicos se cuentan: la composición en aminoácidos, sales, azúcares, iones y factores de crecimiento, así como pH y temperatura, entre los más importantes.

Los cultivos celulares, como modelo para la investigación, pueden mantenerse en el laboratorio, en diferentes tipos de crecimiento, teniendo en cuenta el origen y la función de las células originales. Pueden crecer adheridas sobre alguna superficie formando una capa continua de células; a este tipo de crecimiento se le denomina crecimiento en *monocapa*;

mientras que otras células, por ejemplo, de origen sanguíneo, crecen en cultivos denominados en *suspensión*. Cada uno de estos cultivos tienen múltiples aplicaciones, entre las que se incluyen: investigación con células madre, cáncer, producción de anticuerpos monoclonales, medicina regenerativa, producción de proteínas terapéuticas, entre otras.

¿Hace cuánto se conoce sobre los cultivos de células animales?

La técnica de cultivo de células animales tiene su origen siglo XIX. A partir del aislamiento de células provenientes de anfibios, Reclinhhausen, en 1866, logró mantenerlas viables en cultivos *in vitro*, para los cuales el sustrato que garantizó la supervivencia celular consistía de plasma sanguíneo. En los inicios del siglo XX, otros investigadores interesados en estudiar las células del sistema nervioso optaron por extraer fragmentos de fibras nerviosas de ranas, las cuales lograron conservar vivas con el objetivo de monitorear su desarrollo (Harrison, Greenman, Mall y Jackson, 1907). El desarrollo de estos experimentos involucró errores y aciertos, adicionales al perfeccionamiento de extracción de tejidos y de células, pasando por superar, en muchas ocasiones, los fracasos atribuidos a la contaminación por hongos y por bacterias, puesto que para inicios del siglo XX no se habían descubierto los antibióticos. Es así como se convierte en un reto





científico y de gran importancia la generación de medios de cultivo que permitan prolongar la vida de las células aisladas de organismos y de tejidos originales, así como estandarizar las técnicas que aseguran asepsia para evitar perder las células por contaminación.

Son varios los investigadores que asumieron este desafío. Entre ellos se encuentra Carrel, quien en 1912 utilizó medios de cultivo complejos que contenían plasma diluido con diferentes soluciones de sales, logrando mantener las células viables en cultivos de laboratorio durante varios meses, y a lo que más adelante se denominó un cultivo continuo por su larga duración y por permitir procesos de división celular (Carrel, 1912). En el mismo año,

Glaser y Chapman estudiaron la progresión de una enfermedad en cultivos de hemocitos y Goldschmidt, en 1915, en el Instituto de Biología Kaiser Wilhelm, tomó espermatoцитos de *Cecropia* para estudiar el desarrollo de los espermatozoides (Glaser y Chapman, 1912; Goldschmidt & Kaiser Wilhelm Institut für Biologie, 1915), resultados que en su época eran limitados por las condiciones de asepsia, pero que evidenciaban el futuro promisorio que tendrían los cultivos celulares como técnica para el estudio del funcionamiento de los seres vivos desde una perspectiva microscópica.

De manera paralela a estos estudios, surgió una serie de innovaciones para la obtención de cultivos celulares. A partir del estudio

de los componentes biológicos que mantienen a las células unidas para formar tejidos y que favorecen los procesos de comunicación intercelular, se incluyeron técnicas que utilizan enzimas encargadas de destruir esas conexiones entre las células, como la denominada tripsinización, técnica ampliamente utilizada hoy en día.

En 1916, Rous y Jones demostraron que una solución de tripsina al 3% es óptima para obtener una suspensión de células separadas unas de otras, las cuales posteriormente pueden ser sembradas en frascos con medios de cultivo enriquecidos y dar origen a nuevos cultivos celulares (Rous y Jones, 1916). Actualmente, esta es una de las maneras por medio de las cuales, cuando hay muchas células en un frasco de cultivo, se pueden generar nuevos cultivos y garantizar la sobrevivencia celular al adicionar más medio y garantizar alimento para todas las células.

Después del descubrimiento de los antibióticos, uno de los logros más importantes del siglo pasado, durante la década de los veinte con el científico británico Alexander Fleming, es que el avance en esta técnica de estudio se consolida. El uso de antibióticos como la estreptomina en 1948 por Keilová, sobre cultivos celulares procedentes de explantes (partes de tejido y células) de corazón, aorta y hueso frontal, demostró su utilidad para obtener cultivos libres de microorganismos bacterianos, con baja toxicidad para las células (Keilová, 1948).

Posteriormente, el desarrollo de medios de cultivo químicamente definidos demostró, de manera exitosa, que el aislamiento y la propagación de células de diferentes orígenes era posible. Por ejemplo, el crecimiento de células de cáncer de diferentes tejidos, como el del carcinoma epidermoide de la cavidad bucal, se dio en un medio de cultivo que había sido estandarizado y empleado exclusivamente para otras células. Este hallazgo dio lugar en 1955 a la producción de diferentes medios de cultivo, con características nutricionales y químicas diferentes, que pueden ser utilizadas para el crecimiento de células de diversa procedencia (Eagle, 1955).

Algunos retos

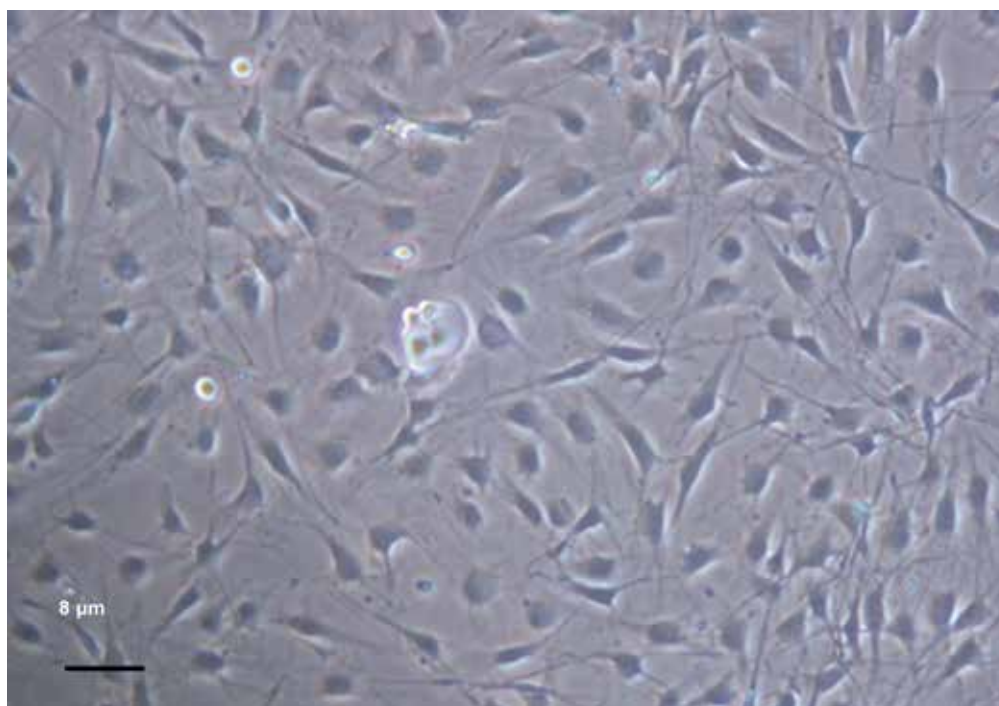
Uno de los principales retos que enfrentaron los primeros investigadores que establecieron cultivos celulares fue el mantenimiento por amplios intervalos de tiempo de células animales en cultivo artificial. Este reto fue superado parcialmente en 1943 por el grupo de investigación de Earle, quienes mediante la exposición de células de fibroblastos (figura 1) a un agente mutagénico lograron prolongar la vida de las células en el laboratorio por un tiempo de 406 días (Earle et al., 1943).

Este resultado evidenció que con las condiciones adecuadas de nutrientes y de asepsia asociadas a la adición de antibióticos, se podía prolongar el tiempo de vida de las células. Otro reto consistió en

el uso de los cultivos celulares para el estudio de enfermedades; es así como en 1949 el equipo de Enders fue el primero en propagar el virus de poliomielitis en diferentes tejidos humanos (Enders, Weller y Robbins, 1949), estudio que llevó a que

en 1952 se generara la primera línea celular de origen humano, a la cual denominaron HeLa, nombre asociado con la paciente de la cual fueron extraídas las células de cáncer de cuello uterino, llamada Henrietta Lacks, en 1951 (Gey, 1952).

Figura 1. Micrografía de fibroblastos provenientes de cultivo primario de nervio ciático de ratón de la cepa ICR, se removió el tejido perineural y se cultivaron fibroblastos y células de Schwann

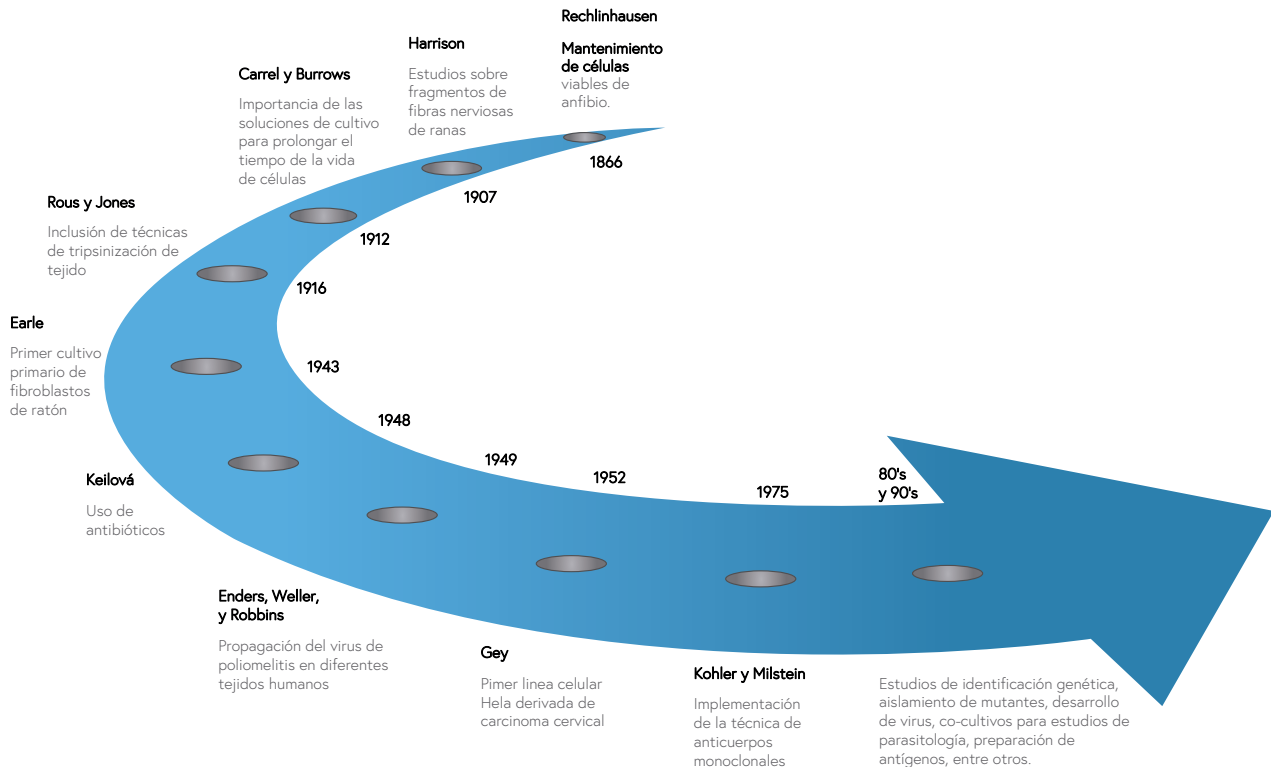


► Fuente: elaboración propia.

La línea celular se refiere a células que permanecen en división continua durante todo el tiempo que se mantengan en cultivo, sin morir y manteniendo sus características físicas y de requerimientos de nutrientes relativamente estables. Esto permite desarrollar investigaciones durante largos periodos de tiempo, manteniendo las células con características idénticas por meses o años. Hasta el momento se evidenciaban

grandes esfuerzos para crear un entorno in vitro adecuado para la propagación de las células, y más aún de aquellas provenientes de origen tumoral, fundamentales para los estudios de los diferentes tipos de cáncer. Estos cultivos son insumo fundamental para determinar el tratamiento que posiblemente puedan ser la solución a la enfermedad, o que aporte en el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes.

Figura 2. Eventos históricos claves para el desarrollo de la técnica de cultivo de células animales

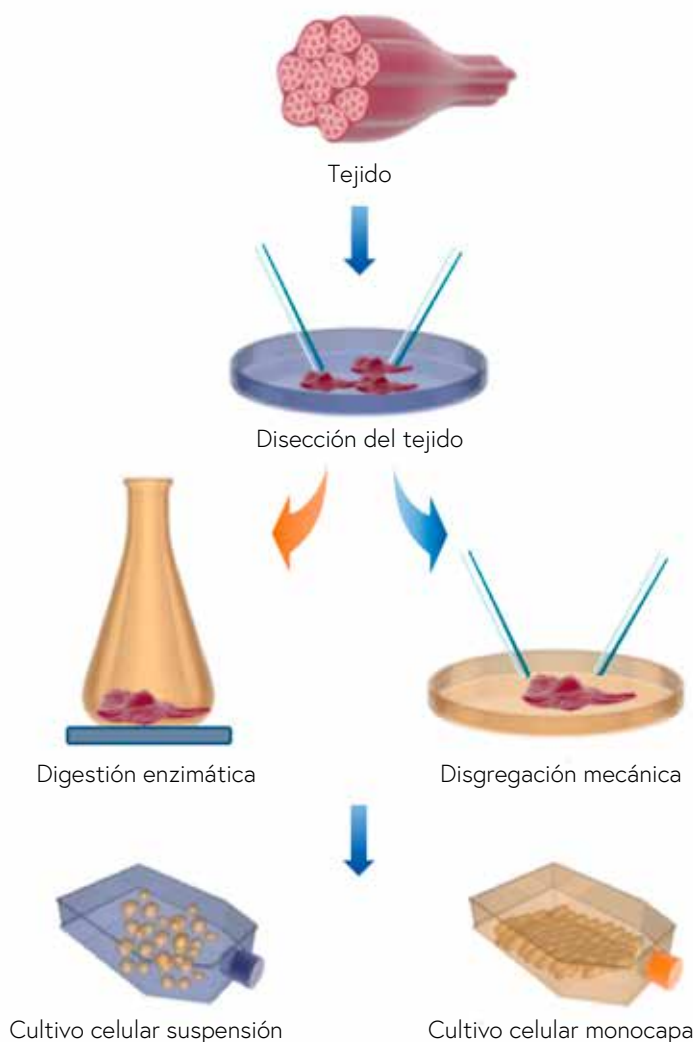


Durante la década de los setenta se establecieron más de una docena de nuevas líneas celulares provenientes de diferentes tumores, como sarcomas, melanomas, carcinomas y tumores cerebrales, mediante la utilización de técnicas de separación celular como los explantes y la tripsinización. A partir de estos avances se favoreció y amplió la investigación para el tratamiento de esta grave enfermedad.

Desde 1960, y gracias a la generación de cultivos celulares como modelo de investigación, se utilizaron técnicas de fusión celular para realizar estudios genéticos que permitieran analizar diferencias entre especies animales, estudios realizados por Barski, Sorieul y Cornefet

(1960) que también incluían a los seres humanos. En relación con el cultivo de células provenientes de insectos, uno de los grandes investigadores fue Schneider, quien en 1972 estableció el cultivo de células provenientes de *Drosophila melanogaster* que sobrevivieron durante más de un año (Schneider, 1972) en un medio de cultivo que emulaba los componentes de la hemolinfa (sangre) de los insectos. A mediados de los setenta, Köhler y Milstein (1975) implementaron la producción de anticuerpos monoclonales en líneas celulares. El desarrollo de esta técnica abrió una nueva posibilidad para la utilización de este tipo de cultivos en estudios de índole inmunológica.

Figura 3. Esquema general de la metodología para la obtención de un cultivo celular primario en suspensión o en monocapa



Durante las décadas de los ochenta y noventa, los cultivos de células fueron comúnmente utilizados para diferentes estudios como: fisiología de los insectos, biología del desarrollo, patologías y biología molecular, estudios de identificación genética, aislamiento de mutantes y multiplicación *in vitro* de virus (Kuno et al., 1985), co-cultivos para estudios de parasitología y preparación de antígenos (figura 2).

Un acercamiento a la clasificación de los cultivos celulares

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo con su capacidad de adherirse a la superficie de una caja de cultivo, formando lo que se ha denominado una monocapa, porque crece una célula seguida de otra y de otra más, en una sola capa, o en suspensión, cuando

no se adhieren a ninguna superficie, sino que permanecen dispersas en el medio de cultivo, característica asociada con el tipo de tejido del cual provienen.

Por lo general, las células obtenidas a partir de órganos crecen en monocapa y las provenientes de la sangre continúan en suspensión. También existen células que pueden crecer indistintamente, tanto en monocapa como en suspensión, por ejemplo, las células HeLa. Además de la manera en que crecen las células, en monocapa o en suspensión, se encuentra una clasificación dependiente de si se trata de un cultivo obtenido directamente del tejido u órgano, o si ya ha tenido subcultivos, mediante disgregación mecánica (por desprendimiento físico) o enzimática (con tripsina), a lo que se denomina *pases*, o si ya se trata de células con crecimiento continuo e indefinido. Es así que, teniendo en cuenta lo antes descrito, se distinguen tres tipos principales de cultivos celulares:

- Cultivos primarios: cuando las células han sido obtenidas a partir de órganos o tejidos de un ser vivo. Para obtener este tipo de cultivo se utilizan sustancias químicas o cortes mecánicos con bisturí (digestión enzimática y disgregación mecánica, figura 3); las células están vivas y pueden ser transferidas a un recipiente para formar un cultivo secundario.
- Cultivos secundarios: las células crecen en monocapa y manifiestan



tan características propias de su origen. Por ejemplo, los fibroblastos (células que producen fibras) generarán colágeno; células del sistema nervioso responden a un impulso eléctrico; los macrófagos (células de defensa del sistema inmune) fagocitan microorganismos.

- Líneas celulares: constituido por aquellas células que están en capacidad de sobrevivir, proliferar y crecer indefinidamente, fruto de procesos de cambio en su genoma y adaptación a un medio de cultivo artificial.

Algunas aplicaciones y perspectivas

Los cultivos celulares han sido empleados por la industria farmacéutica para producir proteínas recombinantes con características similares a las producidas por los humanos.

Desde enero de 2008 hasta junio de 2011, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés Food and Drug Administration) aprobó 18 proteínas recombinantes fabricadas en células y animales, lo que ha significado mayor producción y, por ende, mayores beneficios económicos para la industria biofarmacéutica.

En la práctica médica, el uso de cultivos celulares para el reemplazo de tejidos naturales como piel, hueso, cartílagos tiene una amplia utilidad, sobre todo cuando provienen del mismo paciente (células autólogas) que no producen un rechazo inmunológico; un ejemplo de ello es la reparación de tejido óseo a partir de células de crecimiento autólogo donde se han observado procesos de reparación del tejido, de acuerdo con los resultados de varias investigaciones realizadas (Ye, Das, Triffitt y Cui, 2006)

Otra de las aplicaciones corresponde al uso de cultivos celulares para la producción de vacunas, el cual ha crecido debido a la facilidad de producción con respecto a los métodos convencionales como el uso de huevos de gallinas ya fecundados. Ejemplo de ello son las células *vero* (células de riñón), ampliamente usadas, que demuestran su gran utilidad para la producción de estos compuestos a gran escala. Los estudios de Ehrlich et al. (2008), en células *vero* infectadas con el virus completo de la influenza humana H5N1 (cepa patogénica de la gripe aviar), mostraron su utilidad para

producir una vacuna útil para este tipo de virus pandémico.

Más recientemente, investigaciones realizadas por el grupo de Hoeksema et al. (2018), sobre células *vero* modificadas genéticamente, las presentan como una alternativa para mejorar la producción de vacunas contra el polio y el rotavirus.

Zapata Lesmes, Cárdenas Castro y Bello (2005) realizaron un estudio en cultivos celulares de un insecto vector del parásito *Leishmania*, para determinar la relación entre parásitos y sus insectos vectores, dentro de un campo de amplio interés para países tropicales como Colombia en busca del abordaje *in vitro* de estudios de enfermedades transmitidas por vectores.

Conclusiones

El desarrollo biotecnológico que han tenido los cultivos celulares los convierte en un sistema viable, económico y eficiente para realizar diferentes tipos de investigación básica y aplicada, sin el uso de animales de experimentación.

Dentro de las ventajas se encuentran: son de fácil mantenimiento; requieren poco espacio físico; son excelentes para el desarrollo de vacunas, investigaciones en ingeniería de tejidos, reproducción de virus y preparación de antivirales, para la producción en masa de proteínas, impulsando de manera importante los estudios en biología molecular.

Por lo tanto, las líneas celulares derivadas de animales están siendo

preferidas sobre las bacterias y las levaduras para el desarrollo de productos recombinantes, convirtiendo a esta tecnología en una herramienta de vanguardia para la investigación de procesos biológicos, médicos y biofarmacéuticos.

Bibliografía

- Barski, G., Sorieul, S. y Cornefert, F. (1960). Production dans des cultures invitro de deux souches cellulaires en association, de cellules de caractere hybride. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences*, 251(17), 1825-1827.
- Carrel, A. (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. *Journal of Experimental Medicine*, 15(5), 516-528.
- Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122(3168), 501-504.
- Earle, W. R., Schilling, E. L., Stark, T. H., Straus, N. P., Brown, M. F. y Shelton, E. (1943). Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 4(2), 165-212.
- Ehrlich, H. J., Müller, M., Oh, H. M. L., Tambayah, P. A., Joukhadar, C., Montomoli, E., et al. (2008). A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *New England Journal of Medicine*, 358(24), 2573-2584. DOI: 10.1056/NEJMoa073121
- Enders, J. F., Weller, T. H. y Robbins, F. C. (1949). Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science*, 109(2822), 85-87.
- Gey, G. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, 12, 264-265.
- Glaser, R. W. y Chapman, J. W. (1912). Studies on the wilt disease, or "flacheria" of the Gypsy Moth. *Science*, 36(920), 219-224.
- Goldschmidt, R. y Kaiser Wilhelm Institut für Biologie, B. (1915). Some experiments on spermatogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1(4), 220.
- Harrison, R. G., Greenman, M. J., Mall, F. P. y Jackson, C. M. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, 1(5), 116-128.
- Hoeksema, F., Karpilow, J., Luitjens, A., Lagerwerf, F., Havenga, M., Groothuizen, M., et al. (2018). Enhancing viral vaccine production using engineered knockout vero cell lines-A second look. *Vaccine*, 36(16), 2093-2103. DOI: 10.1016/J.VACCINE.2018.03.010
- Keilová, H. (1948). The effect of streptomycin on tissue cultures. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 4(12), 483-484.
- Köhler, G. y Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495-497.
- Kuno, G., Gubler, D. J., Velez, M. y Oliver, A. (1985). Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bulletin of the World Health Organization*, 63(2), 279-286.
- Rous, P. y Jones, F. S. (1916). A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. *Journal of Experimental Medicine*, 23(4), 549-555.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 27(2), 353-365.
- Ye, H., Das, D. B., Triffitt, J. T. y Cui, Z. (2006). Modelling nutrient transport in hollow fibre membrane bioreactors for growing three-dimensional bone tissue. *Journal of Membrane Science*, 272(1-2), 169-178. DOI: 10.1016/J.MEMSCI.2005.07.04
- Zapata Lesmes, A. C., Cárdenas Castro, E. C. y Bello, F. (2005). Characterization of cell cultures derived from *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) and their susceptibility to infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Medical Science Monitor*, 11(12), BR457-BR464.