

EVOLUCION DE LOS CULTIVOS CELULARES

El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX. Reclinhausen en 1866, mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio, pero fue la utilización de bloques de agar con plasma coagulado (soporte y alimento) el inicio del cultivo de células *in vitro* (Freshney, 1987).

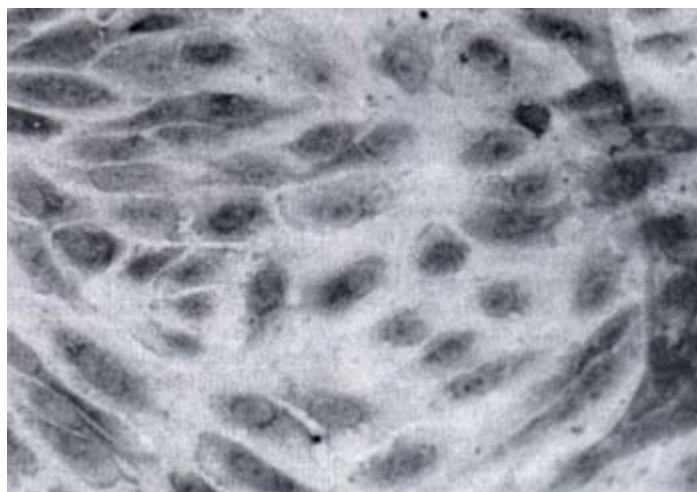
El desarrollo del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Roux (1885) en cultivos de células de embrión de pollo; posteriormente Harrison (1907) cultivó tejido nervioso de rana el cual más adelante fue reemplazada por plasma de pollo (Burrows 1910); posteriormente, Carrel en 1912 aplicó esta técnica para el estudio en animales de sangre caliente.

Una serie de innovaciones como el desarrollo de medios de cultivo (Eagle, 1955), el uso de antibióticos, las técnicas de tripsinización para el pasaje de células (Moscona y Moscona, 1952) y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de células de origen vertebrado.

El empleo de técnicas de fusión celular (Barski, 1960; Littlefield, 1964) estableció las bases de la genética de células somáticas para el análisis de especies animales (incluyendo al hombre); igualmente la técnica de anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975) ha permitido estudios en inmunología y su aplicación a nivel terapéutico.

EN QUE CONSISTE UN LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES

Un laboratorio de cultivo celular debe contar con una infraestructura básica en la cual se disponga de áreas independientes para llevar a cabo la preparación y esterilización de medios y reactivos, un espacio independiente para el proceso de lavado y preparación de material y un área propiamente destinada al trabajo con cultivos celulares.



EL LABORATORIO DE LA REGION

Marcial Acharán N° 587- Urb. Las Quintanas Telef.: 44 208302 Telefax 44 249115 Celular 949930323

Trujillo-Perú

Web: www.microclin.com

e-mail: microclin@microclin.com

Dentro de la infraestructura física básica se debe contar con sistemas de refrigeración y congelación, incubadoras, centrifugas, balanzas, microscopios y cabinas de flujo laminar.

Adicionalmente, se debe disponer de un buen suplemento de material plástico y de vidrio y con sistemas de esterilización apropiados para los diferentes tipos de reactivos y material utilizados.

Desde el punto de vista de los sistemas de esterilización se pueden citar los siguientes:

Calor Húmedo: Mediante el empleo de autoclaves los cuales proporcionan una temperatura de 121°C y una presión de 15 lb. Utilizados para la esterilización de soluciones cuyos componentes no se degradan por éste método, material plástico y de vidrio y equipos de filtración.

Calor Seco: lo constituye el uso de hornos a temperatura de 200°C por espacio de 3 horas. Es empleado para la esterilización de material de vidrio particularmente.

Filtración: A través del uso de equipos con membrana de nitrocelulosa o acetato de celulosa con poro de 0.22 ó 0.1 u de diámetro, mediante la aplicación de presión positiva o negativa. Por éste sistema se esterilizan la mayor parte de los medios de cultivo, suero, solución de antibiótico-antimicótico y suplementos.

CLASES DE CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares son el producto de la colección de células animales de diferentes órganos, colocadas en condiciones especiales propicias para su sobrevivencia y multiplicación, manteniendo para esto todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía en el huésped.

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), y así han sido aisladas recientemente de un órgano determinado o si provienen de células que han sufrido modificación.

De acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada pueden crecer formando monocapa o en suspensión respectivamente, lo que está muy asociado con el tipo de célula de la cual derivan: por lo general las células provenientes de órganos, crecen en monocapa; igualmente existen células que pueden crecer indistintamente tanto en monocapa como en suspensión, ejemplo son las células HeLa que son células transformadas derivadas de cultivos en monocapa.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado, reciben el nombre de Cultivo Primario; cuando éste cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, reciben el nombre de **Líneas Celulares**.

EL LABORATORIO DE LA REGION

Marcial Acharán N° 587- Urb. Las Quintanas Telef.: 44 208302 Telefax 44 249115 Celular 949930323

Trujillo-Perú

Web: www.microclin.com

e-mail: microclin@microclin.com

CULTIVOS EN MONOCAPA

Las células exhiben una variedad de "comportamientos sociales", lo que hace que su multiplicación sea inhibida cuando establecen contacto entre sí, permitiendo la formación de una monocapa que cubrirá la correspondiente superficie de crecimiento. Las células provenientes de cultivos primarios son las que mejor crecen en ésta condición, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide normal.

Los recipientes para el cultivo de células estacionarias son cajas de Petri, frascos para el cultivo de tejido (T-25, T-75), entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado y su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina.

Cuando se requiere la producción de éste tipo de cultivo en una escala mayor, se debe incrementar el área de la superficie de crecimiento, siendo ideal utilizar botellas en rotación (roller). Mediante éste sistema, las células pueden crecer en toda la parte interna de la pared de la botella, usando un aparato que permite la rotación del roller a una baja velocidad; de esta forma un roller de 1 litro que requiere 100 ml de medio, confiere una superficie de crecimiento de 500 cm².

Otra forma de aumentar el número de células adherentes por volumen de frasco, es utilizando microperlas (microportadores), que son compuestos en base a dextranos o a vidrio, las que flotan cuando se emplean en cultivos con agitación, lo que le da una mayor disponibilidad de superficie para el crecimiento celular: con 100 ml de medio de cultivo, se logra una superficie de 0.24 m². La relación superficie-volumen para los rollers es de 0.2-0.7, mientras que para los microportadores es de 122-153.

Existen otras consideraciones que influyen en la utilización de sistemas en monocapa a pesar de las ventajas que tienen los cultivos en suspensión, entre las que están la flexibilidad para desarrollar cultivos primarios o de líneas heteroploides, la facilidad para la remoción del medio gastado antes de infectar las células y la alta concentración que se obtiene del producto, como en el caso del virus de la Fiebre Aftosa.

CULTIVOS EN SUSPENSION

Las Líneas celulares que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies, tienen la propiedad de crecer de manera estacionaria o en suspensión después de un período de adaptación.

Existe evidencia experimental que los sistemas en suspensión también requieren de matrices que son macromoléculas, que sirven de protectores a la superficie celular; éstas macromoléculas se encuentran en el suero, el cual contribuye igualmente con el medio de cultivo, proporcionando un sistema balanceado de nutrientes. Dentro de éstas matrices está el Methocel, esencial para el crecimiento de cultivos en suspensión.

EL LABORATORIO DE LA REGION

Marcial Acharán N° 587- Urb. Las Quintanas Telef.: 44 208302 Telefax 44 249115 Celular 949930323

Trujillo-Perú

Web: www.microclin.com

e-mail: microclin@microclin.com

Aunque el cultivo estacionario es ideal cuando se busca la elaboración de productos extracelulares, el cultivo en suspensión es deseable cuando los productos son intracelulares o cuando se presentan problemas con la capacidad de anclaje de un determinado tipo de célula.

El proceso de cultivo continuo ofrece factores económicos decisivos (utilización de mejores equipos, reducida manipulación) cuando se trata de producir cultivos a una mayor escala de operación.

CULTIVOS PRIMARIOS

Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$), su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto.

El estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural, por lo que en aislamientos primarios de cepas virales éstas tienen mayor sensibilidad que una Línea Celular ya establecida. Igualmente para la producción de vacunas los cultivos primarios son recomendables por tener una baja probabilidad de que se transformen en malignos.

Dentro de las desventajas está la de una mayor probabilidad de presentar virus adventicios o latentes, lo que implica el desarrollo de la adecuada tecnología para el control de calidad.

DESARROLLOS TECNOLOGICOS LOGRADOS

La implementación de los cultivos celulares en la Línea de Microbiología y Epidemiología del postgrado de la Facultad estuvo determinado por la necesidad de adelantar estudios sobre las enfermedades virales relacionadas con la reproducción bovina, era evidente la ausencia de información de campo, y la poca disponibilidad de procedimientos diagnósticos disponibles para los asesores y los productores.

Como una respuesta a lo anterior se buscaron nuevas alternativas que ofrecieran ventajas comparativas, para la mejor replicación de los agentes virales (DVB, IBR, Leucosis), por su eficiencia en la producción de cosechas, o su empleo en pruebas diagnósticas, se iniciaron trabajos en el desarrollo de metodologías para establecer cultivos primarios de diferentes origen.

Dentro de este proceso se pueden mencionar inicialmente el cultivo primario de riñón fetal bovino (Ramírez y col, 1994; Parra y col, 1994; Góngora y col, 1995; Vera y col, 1997), dicho cultivo se normalizó y se empleó como substrato para pruebas de seroneutralización en DVB, se observaron algunos limitantes tales como, el reducido número de pasajes permitidos por el subcultivo, así como la dificultad para conservarlo bajo condiciones de congelación.

Como consecuencia de lo anterior se buscaron otras opciones entre ellas la utilización del testículo, el pulmón y el cornete bovino, los cuales ofrecen la posibilidad de un número mayor de pasajes (quince para testículo y treinta para pulmón y cornete) y la posibilidad de congelación,

EL LABORATORIO DE LA REGION

Marcial Acharán N° 587- Urb. Las Quintanas Telef.: 44 208302 Telefax 44 249115 Celular 949930323

Trujillo-Perú

Web: www.microclin.com

e-mail: microclin@microclin.com

pero, con el inconveniente para el cornete y pulmón (dado el origen de los tejidos) de presentar la posibilidad de contaminación bacteriana inicial (Mendigaña y col, 1994; Jaime y col, 1996; Vera y col, 1997).

En general cualquiera de los cultivos mencionados anteriormente, presenta un inconveniente mayor, el cual está representado por la alta incidencia de contaminación con virus adventicios, particularmente con el de la DBV (Ramírez y col, 1994; Vera y col, 1997). Para solucionar esta limitante se intentó con éxito, la normalización del cultivo de células de córnea bovina (Ramírez y col, 1997). Para solucionar esta limitante se intentó con éxito, la normalización del cultivo de células de córnea bovina (Ramírez y col, 1997), obteniéndose un sustrato de buena calidad con mínima contaminación por virus adventicios. Actualmente se están realizando las pruebas de viabilidad a temperaturas de congelación y su potencial en cuanto a números de pasajes.

Para obviar algunas dificultades en el trabajo con el virus de la leucosis bovina, relacionadas con la frecuente contaminación de la línea FLK (sustrato biológico para la producción del antígeno) por virus adventicios, se normalizó el cultivo primario de células endoteliales de aorta bovina, que posteriormente fue infectado mediante cocultivos con linfocitos provenientes de un bovino con linfocitosis persistente. La infección fue comprobada por medio de la producción de antígeno viral, y la visualización de sincitios a partir de células infectadas. La susceptibilidad y permisividad de dicho cultivo a la infección por el virus de la leucosis, constituye un nuevo modelo celular para el diagnóstico y el estudio de la biología y la patología de la leucosis; probablemente se pueda emplear en el estudio de otros retrovirus de importancia en salud humana (Barreto y col, 1996).

El papel del suero, especialmente fetal bovino en el establecimiento y mantenimiento de líneas y cultivos celulares, es fundamental; cuando estos se han establecido en medios libres de suero, el crecimiento celular requiere, la suplementación con hormonas y otros factores de crecimiento que están involucrados en transporte de nutrientes, mantenimiento de balance de energía celular, control de síntesis de macromoléculas y factores que estimulan la formación del producto deseado.

LINEAS CELULARES

Las Líneas Celulares continuas están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo.

Este tipo de cultivo tiene la característica de ser aneuploides, de no tener inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida. El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación.

Una transformación puede inducirse fisiológicamente (interacción celular, polaridad) a través de hormonas como la hidrocortisona o utilizando inductores no fisiológicos como el DMS.

EL LABORATORIO DE LA REGION

Marcial Acharán N° 587- Urb. Las Quintanas Telef.: 44 208302 Telefax 44 249115 Celular 949930323

Trujillo-Perú

Web: www.microclin.com

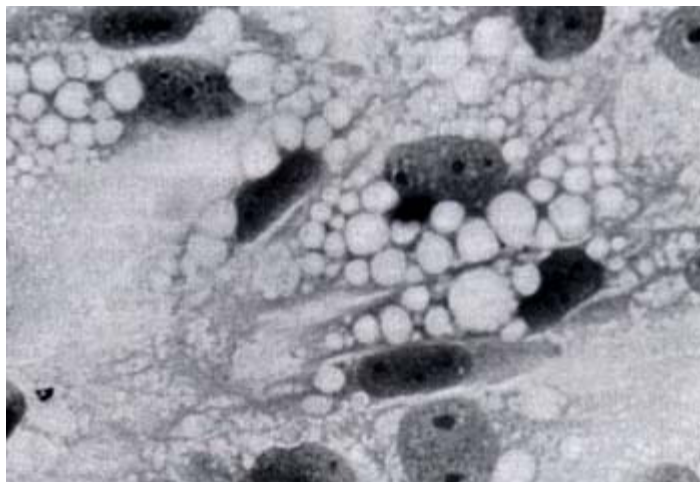
e-mail: microclin@microclin.com

CULTIVOS TRIDIMENSIONALES

Son aquellos que buscan mantener la característica o arquitectura del tejido *in vivo*. Los sistemas tridimensionales permiten estudiar la proliferación y morfología epitelial y su interacción con otras células como son las del tejido conectivo; igualmente con ellos se puede evaluar el efecto de sustancias que pueden influenciar en tales interacciones intercelulares. Actualmente se producen Kits dérmicos comerciales con base en cultivos, que permiten evaluar la citotoxicidad de componentes químicos presentes en lociones, preservativos, detergentes, perfumes, shampoos y solventes entre otros.

Los intentos de producción de éste tipo de cultivo van desde el uso de telaraña (Harrison, 1914), pasando por el crecimiento de explantes en esponja de celulosa, (Leighton, 1951), así como la utilización de fibras de sílica (Curtis y Varde, 1964) o de mallas de colágeno hidratado (Elsdale y Bard, 1972).

El método desarrollado por Bergenholtz (1977) es uno de los que mayor información han dado en cuanto a visualización de morfología celular. Mediante éste sistema, se colocan trocitos de superficie epitelial sobre una membrana de Millipore, sistema que se deposita sobre una plataforma y ésta en una caja de Petri con medio de cultivo.



EFFECTO CITOPATICO DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN CULTIVO PRIMARIO DE TESTICULO BOVINO. 10X

SUPLEMENTACION DE LOS MEDIOS CON SUERO

El papel de suero, especialmente fetal bovino en el establecimiento y mantenimiento de líneas y cultivos celulares, es fundamental; cuando estos se han establecido en medios libres de suero, el crecimiento celular requiere, la suplementación con hormonas y otros factores de crecimiento que están involucradas en transporte de nutrientes, mantenimiento de balance de energía celular, control de síntesis de macromoléculas y factores que estimulan la formación del producto deseado. Muchos de los factores suplementados son purificados del mismo suero, lo cual hace que cultivos a gran escala con medio libre de suero no sean rentables.

EL LABORATORIO DE LA REGION

Marcial Acharán N° 587- Urb. Las Quintanas Telef.: 44 208302 Telefax 44 249115 Celular 949930323

Trujillo-Perú

Web: www.microclin.com

e-mail: microclin@microclin.com

Uno de los inconvenientes que presentan los laboratorios de investigación y diagnóstico es el del alto porcentaje de cultivos contaminados por el virus de la DVB. Como consecuencia de la infección intrauterina de los bovinos donantes del suero, las líneas celulares y los cultivos primarios se pueden contaminar con el virus cuando son suplementados con el suero contaminado (Vera y col, 1992). El porcentaje de contaminación del suero fetal comercial oscila entre el 10y el 70% (Raetting y col, 1955; Vera y col, 1992; Vera y col, 1997).

Las células afectadas, alteran su eficiencia en la replicación, y en la producción demetabolitos específicos. Como una alternativa para prevenir este problema se ha optado por la radiación de los lotes de suero; en nuestro laboratorio se han evaluado otros métodos de inactivación, a través del uso de sustancias tales como el BEI (etilenimina binaria), la cual ofrece ventajas comparativas (Ramírez y col, 1994), pero demanda estudios adicionales para determinar el efecto en el tiempo, sobre la calidad de las células como sustrato biológico en pruebas diagnósticas y especialmente en el aislamiento de agentes virales.

Sin embargo, además de buscar soluciones para el producto final, se han desarrollado también métodos y técnicas para la detección de animales inmunotolerantes persistentemente infectados con el virus de la DVB (Jaime y col, 1996; Vera y col, 1997), usando cultivo de células polimorfonucleares y técnicas de inmunoperoxidasa indirecta, se identificaron en nuestro medio animales inmunotolerantes. La importancia de lo anterior radica en que estos animales diseminan la enfermedad en forma constante.



Figura 3. Monocapa obtenida a partir de explante de córnea bovina. 10X.

EL LABORATORIO DE LA REGION

Marcial Acharán N° 587- Urb. Las Quintanas Telef.: 44 208302 Telefax 44 249115 Celular 949930323

Trujillo-Perú

Web: www.microclin.com

e-mail: microclin@microclin.com

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bergeholtz, A., Halimus, G., Hanstrom, m. anat. Rec. 189, 4.42.1977.
2. Burrows, M.T. J.A.V.M.A. 55. 20-57. 1910.
3. Carrel, A. J.J. Exp. Med. 15, 516-528.1912.
4. Curtis, A.S.G., Varde, N.J. Nat. Cancer. Inst. 33,15-23.1964.
5. Elsdale, T., Tolbert, W.R. Scientific American. 54, 626-637.1972.
6. Freshney, R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technics. Alan, R. Ciss. Inc. New York. 1987.
7. Góngora, A, Villamil, L.C. Vera, V., Parra, JL., Ramírez, G., López, G. Aislamiento de un herpes virus bovino tipo-1 (HVB-1) de secreción nasal y esmegma prepucial en un toro reproductor. Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Vol XLIII. No. 1.pp 43-48. 1995.
8. Harrison, R.G. Proc. Soc, Exp. Biol. 4, 140-143. 1907.
9. Harrison, R.G. J. Exp. Zool. 17, 521-544. 1914.
10. Jaime, J., Villamil, L.C., Vera, V., Ramírez, G. infección persistente con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en hatos lecheros de la Sabana de Bogotá. Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Vol XLIV. No. 1 pp 46-54.1996.
11. Köler, G., Milstain, C. continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefine specificity. Nature. 256, 495-497. 1975.
12. Leighton, J.J. Nat. Cancer. Inst. 12,545-560. 1951.
13. Littlefield, J. W. Science. 145, 709-710. 1964.
14. Mendigaña, C., Vera, V., Villamil, L.C., Jaime, J. Caracterización proteica de cepas colombianas citopáticas y no citopáticas del virus de la Diarrea Viral Bovina. Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Vol XLII. No. 1 pp 52-58. 1994.
15. Moscona, A.A, Moscona, M.M. J. Anat. 86,287-290. 1952.
16. Morgan, S.J.; Darling, D.C. cultivo de células animales. Editorial Acribia. 1993.
17. Parulekar, S., Hassel, T., Tripathi, S. Recent development in vertebrate cell culture technology. In: Wang, J., Frienlander, M. Academic Press. USA. Pp 145-211. 1992.
18. Pollard, J.: Walker, J. Animal cell culture. In: Methodos In Molecular Biology. Fd. Pollard J. And Walker H. in Humana Press, New Jersey, Vol 5. 1990.
19. Parra, J.L., Vera, V., Villamil, L.C., Ramírez, G. Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en explotaciones lecheras de la Sabana de Bogotá. Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Vol XLIII. No 1. Pp 29-45. 1994.

EL LABORATORIO DE LA REGION

Marcial Acharán N° 587- Urb. Las Quintanas Telef.: 44 208302 Telefax 44 249115 Celular 949930323

Trujillo-Perú

Web: www.microclin.com

e-mail: microclin@microclin.com