

Cultivo de células en 3D. La nueva dimensión de los cultivos celulares

SERGIO CALVO GARCÍA¹
Universidad de Salamanca
sergiocalvo@usal.es

SUMARIO

En las últimas cuatro décadas miles de laboratorios de todo el mundo han llevado a cabo cultivos *in vitro* de células en 2D. Sin embargo, el cultivo de células en 2D no reproduce la anatomía o fisiología de un tejido. Las células cultivadas en 3D se comportan de manera más parecida a como lo hacen en sus organismos de origen. Actualmente el cultivo celular en 3D está en auge, se está convirtiendo en una técnica esencial en múltiples áreas de la biología celular. El cultivo de células en 3D abre una nueva dimensión² en ensayos de cultivos, mientras que estudios basados en cultivos 2D han demostrado limitaciones significativas.

Palabras clave: cultivo tridimensional, esponjas y geles, microportadores, cultivos *in vitro*.

SUMMARY

The last four decades in thousands of laboratories throughout the world have been conducted *in vitro* cultures of cells in 2D. However, the 2D cell culture does not reproduce the anatomy or physiology of a tissue. 3D cultured cells behave more like they do in their occurring organisms. Currently the 3D cell culture is booming, is becoming an essential

1 Sergio Calvo García es Graduado en Biología por la Universidad de Salamanca.

2 Tyler Jacks and Robert A. Weinberg, "Taking the Study of Cancer Cell Survival to a New Dimension", *Cell*, Vol. 111, December 27 (2002) 923-925.

technique in many areas of cell biology. The 3D cell culture opens a new dimension in culture assays, while 2D culture-based studies have shown significant limitations.

Key words: three-dimensional culture, sponges and gels, microcarriers cultures in vitro.

1. INTRODUCCIÓN

A finales del siglo XIX, los primeros científicos que realizaron cultivos empleando técnicas in vitro para el estudio de fenómenos in vivo, encontraron numerosas dificultades y limitaciones. La primera limitación que encontraron era lograr un medio nutritivo adecuado. Algunos científicos lo resolvieron empleando plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios.

Los avances en este campo, a principios del siglo XX, demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante un subcultivo³. En la segunda década de dicho siglo se estableció el primer cultivo celular, consiguieron disociar las células de embriones de pollo. Pero las dificultades continuaban emergiendo, la aparición de múltiples contaminantes en los cultivos celulares limitaban y dificultaban el uso de estas técnicas. Para resolver este problema desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia. Una de las estrategias utilizadas a partir de los años 40 para mantener las condiciones de esterilidad de los cultivos fue el uso de numerosas aplicaciones tras el aislamiento de antibióticos. A finales de los años 50 se estableció la primera línea celular continua, las células HeLa⁴. Para el mantenimiento de esta línea celular se empleó un medio complejo formado por plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.

Actualmente, todas esas dificultades que antes he nombrado están superadas. Numerosos factores como son los medios de composición definida, la disponibilidad de antibióticos o las instalaciones asépticas, como son las cabinas de flujo laminar o las salas de trabajo y cultivo limpias, contribuyen de forma beneficiosa a la hora de manipular y trabajar con cultivos celulares o con cultivos de tejidos⁵. Una vez superadas dichas dificultades, con el paso del tiempo se nos plantean otros retos. La comunidad científica vive en un continuo avance y le surgen nuevos retos.

En las últimas cuatro décadas miles de laboratorios de todo el mundo han llevado a cabo cultivos in vitro de células en dos dimensiones. El cultivo celular es

³ http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf (25/1/2013).

⁴ <http://es.wikipedia.org/wiki/HeLa> (20/3/2013).

⁵ H.A.Mirón, *Notas técnicas de prevención. Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo.

un proceso mediante el que células provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral, son mantenidas en medios de cultivo con condiciones controladas, es decir, con una composición química definida y en condiciones de temperatura, aireación, pH y humedad adecuadas. Estas condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo celular. Comúnmente el factor más variado es el medio de crecimiento para cultivo celular.

Sin embargo, el cultivo de células en dos dimensiones no reproduce la anatomía o fisiología de un tejido. Para solventar este problema, actualmente se están llevando a cabo en muchos laboratorios las técnicas necesarias para realizar cultivos celulares en 3D. El cultivo celular en 3D está en auge, se está convirtiendo en una técnica esencial en múltiples áreas de la biología celular. Esta nueva técnica de cultivo⁶ constituye un paso imprescindible en campos como la ingeniería tisular o la medicina regenerativa⁷, a la hora de regenerar *in vitro* tejidos u órganos. Además está suscitando un gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos⁸, gracias al aumento significativo de la fiabilidad en los diversos ensayos *in vitro* de compuestos químicos que se llevan a cabo con cultivos en 3D. La fiabilidad de este tipo de ensayos ha aumentado gracias a una mejor replicación de las condiciones fisiológicas.

Las células cultivadas en 3D se comportan de manera más parecida a como lo hacen en sus organismos de origen. La calidad de la información obtenida es mayor en aquellos ensayos en los cuales hay una gran similitud con los organismos de origen. Por lo tanto, la información que nos proporcionan los cultivos de células en 3D es superior a la obtenida en ensayos celulares en 2D (cultivo tradicional).

2. TIPOS DE CULTIVOS CELULARES

Denominamos cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células ‘*in vitro*’, con el objetivo de mantener de manera óptima sus propiedades a nivel fisiológico, bioquímico y genético. Dependiendo de la clasificación utilizada podemos hablar de diferentes tipos de cultivos⁹:

6 Tyler Jacks and Robert A. Weinberg, “Taking the Study of Cancer Cell Survival to a New Dimension”, *Cell*, Vol. 111, December 27 (2002) 923-925.

7 Ruei-Zhen Lin and Hwan-You Chang, “Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research”, *J. Biotechnol* 3 (2008), 1172-1184.

8 Giovanna Mazzoleni, D. Di Lorenzo and N. Steimberg, “Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research?”, *Genes Nutr* 4 (1) (2009).

9 http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf (25/1/2013).

- *Cultivo de órganos*. Se denomina cultivo de órganos cuando se explanta una estructura casi completa sobre una rejilla, es decir, un órgano completo de pequeño tamaño o fragmentos. El órgano está situado en la interfase líquido-gas y se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional¹⁰. Representa una buena réplica de la arquitectura característica del tejido in vivo, porque mantiene los tipos celulares diferenciados. Su principal limitación es que solo las células embrionarias situadas en la periferia pueden proliferar.
- *Explantos primarios*. Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie, quedando en la interfase sólido-líquido, y en la que las células de la periferia pueden proliferar o migrar¹¹.
- *Cultivo celular*. La forma de obtención es a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas¹². Mediante el empleo de métodos enzimáticos o mecánicos se lleva a cabo la disgregación celular. El cultivo celular es el tipo de cultivo más utilizado. Este tipo de cultivo se puede cultivar como una *monocapa adherente* o *en suspensión* en el medio de cultivo¹³.

En el cultivo en monocapa las células crecen adheridas a un soporte sólido, normalmente de plástico. Las células utilizadas en este tipo de cultivo deben cumplir el requisito de anclarse al sustrato. Es el método más utilizado en los laboratorios para la mayoría de células. En el cultivo en suspensión, en el medio de cultivo, las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Las células utilizadas para este tipo de cultivo (células tumorales, hematopoyéticas o células madre) no deben de cumplir el requisito de anclarse al sustrato.

El principal inconveniente es la pérdida de heterogeneidad celular de partida, ya que la población se hace uniforme y homogénea. Además se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular.

A pesar de todo esto las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Las células que forman parte de los cultivos tienen una capacidad de crecimiento alta, siempre bajo unas condiciones de cultivo específicas. Cada cierto tiempo las células necesitan un aporte de medio de cultivo nuevo.

10 <http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf> (4/5/2013).

11 http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf (25/1/2013).

12 http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf (25/1/2013).

13 H.A.Mirón, *Notas técnicas de prevención. Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo.

A continuación están resumidos los pasos que se deben realizar en el laboratorio para cambiar el medio de cultivo en un cultivo celular 2D en monocapa de osteoblastos humanos:

- Retirar el medio de cultivo del frasco.
- Añadir PBS para limpiar los restos celulares y de medio de cultivo.
- Retirar todo el PBS.
- Añadir medio de cultivo nuevo.
- Introducir el frasco en la estufa a 37 °C.

Las células proliferan y la población celular crece; cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene.

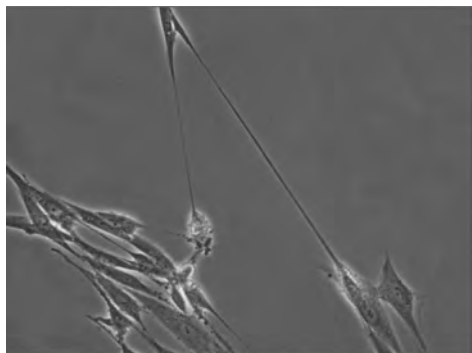
Cuando se alcanza la confluencia en un cultivo, deteniéndose el crecimiento del cultivo, debe pasarse o subcultivarse a una superficie mayor. Al cabo de un tiempo hay que trasplantar las células a un nuevo soporte. Esta operación se denomina subcultivo o pase. Para subcultivar las células a una superficie mayor debemos realizar una serie de pasos.

A continuación, están resumidos los pasos que se deben realizar en el laboratorio para un pase de células en cultivo celular 2D en monocapa de osteoblastos humanos:

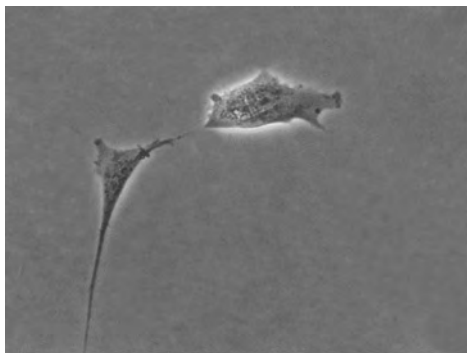
- Quitar el medio de cultivo del frasco.
- Añadir PBS para limpiar los restos celulares y de medio de cultivo.
- Retirar todo el PBS.
- Añadir tripsina, que se encarga de que las células pierdan su adhesión.
- Mantener durante cinco minutos en la estufa a 37 °C.
- Mirar con el microscopio el número de células que se han despegado.
- Golpear para despegar el mayor número de células.
- Neutralizar la tripsina añadiendo medio de cultivo.
- Echar la disolución en un nuevo tubo.
- Igualar los ml de ambos tubos.
- Introducirlos en la centrifugadora, durante cinco minutos, cada uno en un extremo.
- Retirar la tripsina y el medio de cultivo.
- Los osteoblastos se encuentran adheridos a la pared del tubo.

- Añadir medio de cultivo.
- Pipetear repetidas veces para diluir todas las células.
- El volumen que tenemos lo dividimos para repartirlo en diferentes botes de cultivo.

Tras realizar el pase de células, éstas son introducidas en la estufa a 37 °C. A los pocos días vemos como hay un aumento en el número de células.

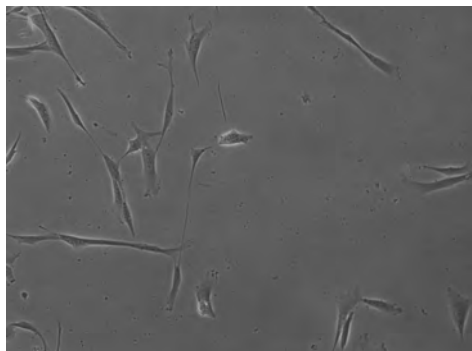


Cultivo de osteoblastos humanos después de realizar un pase de células.

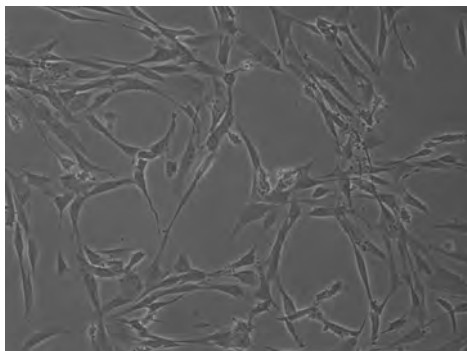


Cultivo de osteoblastos humanos después de realizar un pase de células.

Esta línea celular prolifera y la población crece. Tiene una capacidad de crecimiento alta, siempre bajo unas condiciones de cultivo específicas: Antibiótico (Disolución de penicilina-estreptomicina) + Suero (Suero fetal bovino) + Medio de cultivo.



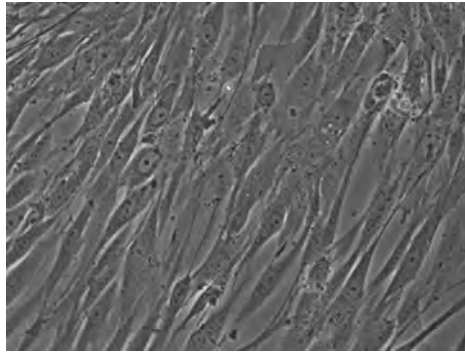
Cultivo de osteoblastos humanos 48 horas después de realizar un pase de células.



Cultivo de osteoblastos humanos 48 horas después de realizar un pase de células.

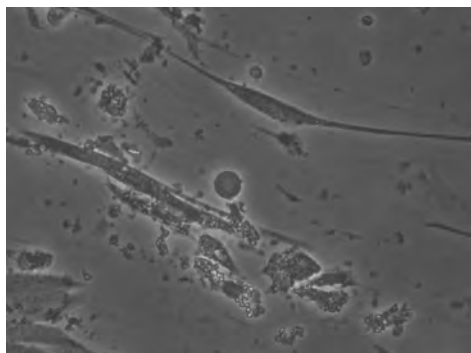
Crece hasta que los límites de unas células contacten con los de otras, momento en el que se alcanza la confluencia, deteniéndose el crecimiento de cultivo debido a fenómenos de inhibición por contacto. Las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación. En este momento, de nuevo, debe pasarse o subcultivarse a una superficie mayor.

Como he explicado anteriormente las células del cultivo en monocapa se dispersan por métodos enzimáticos y se pasan a un nuevo frasco de cultivo. Cuando las células dispersas en el medio del cultivo en suspensión llegan a su confluencia, sencillamente se diluyen en medio fresco, repartiendo el contenido del frasco inicial en varios frascos. Normalmente alcanzan la confluencia cuando el número de células es elevado y los nutrientes son insuficientes.

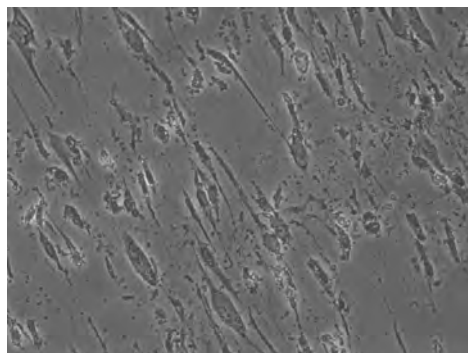


Momento en el que un cultivo de osteoblastos humanos alcanza la confluencia.

Existe un número finito de pases, variable porque depende de la línea celular y de otros factores. A medida que aumenta el número de pases, que las células sufren agresión o que deja de añadirse con frecuencia medio de cultivo, las células desencadenan procesos de envejecimiento celular y posterior muerte de las células que componen el cultivo.



Envejecimiento celular en un cultivo de osteoblastos humanos.



Envejecimiento celular en un cultivo de osteoblastos humanos.

Las líneas celulares tienen una vida finita que puede prolongarse entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar. Sin embargo, existen determinados cultivos celulares que no expresan algún tipo de genes involucrados en el proceso degenerativo. Pueden surgir de forma espontánea, mediante la exposición a radiaciones, o de forma inducida, mediante infección vírica. De esta forma pasa a constituirse ese cultivo como una línea celular inmortal. Estas líneas celulares evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen de forma indefinida. Estas células han sufrido un cambio genotípico, por eso presentan inconvenientes; se caracterizan por ser malignas y genéticamente inestables.

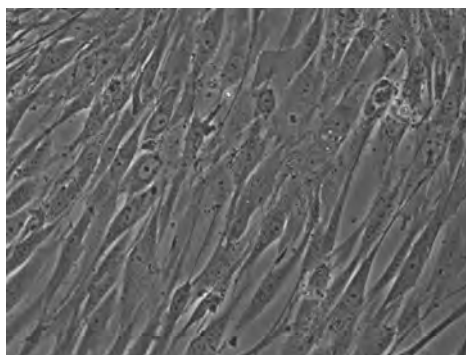
La criopreservación es el proceso en el cual las células son congeladas a baja temperatura en nitrógeno líquido ($< -80\text{ }^{\circ}\text{C}$), para disminuir las funciones vitales de éstas y poder mantenerlas durante periodos largos de tiempo. Podemos congelar las células que forman el cultivo celular en monocapa si queremos conservarlas por largos periodos de tiempo, disminuir los riesgos de contaminación y la probabilidad de pérdida de caracteres deseados por los sucesivos pasajes.

A continuación están resumidos los pasos que debemos realizar en el laboratorio para congelar un cultivo de células 2D en monocapa formado por osteoblastos humanos:

- Quitar el medio de cultivo del frasco.
- Añadir PBS para limpiar los restos celulares y de medio de cultivo.
- Retirar todo el PBS.
- Añadir tripsina. La tripsina es la encargada de que las células pierdan su adhesión.

- Mantener durante cinco minutos en la estufa (37 °C).
- Mirar con el microscopio el número de células que se han despegado.
- Golpear para despegar el mayor número de células.
- Neutralizar la tripsina añadiendo medio de cultivo.
- Echar la disolución en un nuevo tubo.
- Igualar los ml de ambos tubos.
- Introducirlos en la centrifugadora durante cinco minutos, cada uno en un extremo.
- Retirar la tripsina y el medio de cultivo.
- Los osteoblastos se encuentran adheridos en la pared de del tubo.

Añadir la disolución preparada anteriormente (1 ml DMSO + 9 ml Suero bovino). Podemos distinguir dos tipos de criopreservantes: agentes penetrantes y agentes no penetrantes. Los agentes penetrantes actúan desplazando el agua intracelular evitando la formación de cristales de hielo intracelulares, los cuales actuarían a modo de pequeños y afilados cuchillos. El dimetil sulfóxido (DMSO) es un tipo de agente penetrante¹⁴.



Cristales intracelulares que actúan a modo de cuchillos.

- Pipetear repetidas veces para diluir todas las células.
- Cambiamos el volumen final desde el tubo hasta el tubo de congelado.
- Introducir el tubo de congelado en una cámara de congelación a -80°C.
- Después de 24 horas introducimos el tubo en nitrógeno líquido.

14 <http://es.wikipedia.org/wiki/Criopreservación> (14/1/2013).

Los cultivos celulares tienen una serie de ventajas. En un cultivo se pueden controlar los factores físico-químicos y fisiológicos. Además muchas líneas celulares cuentan con medios definidos, es decir, medios en los cuales se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman y la concentración en la que se encuentran. Pero no siempre es así, en muchas líneas no se han llegado a establecer medios definidos. En estos casos se trata de medios que se suplementan con soluciones complejas, por ejemplo, suero o extractos de embrión, etc.

Las células que forman los cultivos pertenecen a líneas celulares continuas. Estas líneas celulares son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Gracias a la existencia de estas líneas celulares continuas se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, de esta forma se supera el problema de heterogeneidad de las muestras, que está asociado al uso de animales de experimentación. Además el cultivo celular *in vitro* es una alternativa para reemplazar en muchas ocasiones al ensayo 'in vivo', así se reduce el número de ensayos en los cuales se emplean animales.

En cuanto a las desventajas del cultivo celular podemos destacar que son incapaces de crecer sin una mezcla de nutrientes que simule el plasma o el fluido intersticial; que su manipulación necesita el mantenimiento de las condiciones de asepsia en todo momento; o que muchas de las líneas celulares continuas son inestables. La única manera de evitar este último problema es emplear líneas estables que se resiembran a partir de un stock congelado.

Además no debemos olvidar que un cultivo celular es un disgregado celular de un tejido de origen. Al disgregar el tejido de origen se pierde la organización espacial tridimensional característica del tejido y se pierden las interacciones entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular. También carece de los componentes sistémicos de regulación, como son los sistemas endocrino y nervioso.

Estamos de acuerdo en que los cultivos celulares tienen además de éstas, otras muchas ventajas e inconvenientes, las cuales no están aquí recogidas. Toda esta serie de ventajas e inconvenientes son igual de relevantes a la hora de analizar esta técnica, pero voy a destacar una por encima del resto. Cuando he mencionado las diferentes desventajas, he recogido entre ellas que se pierde la organización espacial tridimensional propia del tejido. Para resolver este problema surgen los cultivos celulares en 3D. Este tipo de cultivo sí reproduce la anatomía o fisiología de un tejido. Los cultivos celulares en 3D permiten que las células se comporten de la manera en que lo harían en sus órganos o tejidos de origen.

3. CULTIVOS CELULARES EN 3D

El cultivo celular en 3D está en auge, se está convirtiendo en una técnica esencial en múltiples áreas de la biología celular. Esta nueva técnica de cultivo constituye un paso imprescindible en campos como la ingeniería tisular, medicina regenerativa¹⁵ o desarrollo de nuevos fármacos¹⁶.

Las células cultivadas en 3D se comportan de manera más parecida a como lo hacen en sus organismos de origen. La calidad y cantidad de información obtenida es mayor en aquellos ensayos en los cuales se utilizan técnicas de cultivo de células en 3D, porque hay una gran similitud con los organismos de origen. La importancia del cultivo tridimensional reside en que las células se encuentran en un sistema que mantiene la integridad de un órgano, de forma que las interacciones entre células están garantizadas.

Las células cultivadas en ambientes 3D muestran diferencias, en comparación con las células cultivadas en ambientes 2D, en metabolismo, diferenciación, expresión de genes y proteínas, proliferación, viabilidad y respuesta a diferentes estímulos.

La aparición de los cultivos en tres dimensiones requiere experiencia multidisciplinar y un enfoque multidisciplinario. Los científicos deben diseñar andamios para que apoyen y se organicen correctamente las células. Las condiciones de cultivo serán estrictamente controladas mediante el uso de biorreactores¹⁷. Éstos mantendrán el control de nutrientes y el intercambio de productos de desecho. Si utilizamos en cultivos 3D las condiciones de cultivo estáticas que convencionalmente se aplican en 2D tradicionales, se obtienen resultados pobres¹⁸. El motivo es muy sencillo, aquellas células situadas en la superficie exterior están en contacto con el medio de cultivo, y por tanto, tienen acceso directo al oxígeno y a los nutrientes. Aquellas situadas en el interior del sustrato, a varios milímetros, no tienen acceso a los nutrientes y al oxígeno. Suelen morir relativamente pronto, debido a una insuficiencia de nutrientes.

Una forma de solucionar este problema es aplicando perfusión al medio de cultivo a través del sustrato. El uso de esta técnica garantiza una distribución adecuada de nutrientes en todo el cultivo. De esta forma, también se consigue eliminar

15 Ruei-Zhen Lin and Hwan-You Chang, "Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research", *J. Biotechnol* 3 (2008), 1172-1184.

16 Giovanna Mazzoleni, D. Di Lorenzo and N. Steimberg. "Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research?", *Genes Nutr* 4 (1) (2009).

17 I.Martín, D.Wendt and M.Heberer, "The role of bioreactors in tissue engineering", *Trends in Biotechnology*, Volume 22, Issue 2 (February 2004) 80-86.

18 D.Wendt, S.A.Riboldi, M.Cioffi and I.Martin, "Potential and Bottlenecks of Bioreactors in 3D Cell Culture and Tissue Manufacturing" *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 21 (2009).

de forma eficiente los productos de desecho de naturaleza metabólica generados por las células. Esta técnica es eficiente incluso en cultivos 3D en los cuales el sustrato es de varios centímetros de tamaño. Los cultivos en 3D permiten analizar las características de desarrollo y diferenciación de distintos tipos de células. Además nos permiten analizar la interacción entre células.

Son muchas las ventajas que aportan los cultivos en 3D, pero también presentan carencias. Las células cultivadas con técnicas de 3D no tienen tendencia a proliferar, normalmente mantienen su diferenciación e interacción intercelular. Esta es la razón por la cual este modelo no se utiliza para estudiar los factores que intervienen en procesos de emigración o proliferación celular.

En los últimos años, el auge de esta nueva técnica de cultivo ha propiciado que el número de prototipos diseñados mediante ordenador para la fabricación de andamios se dispare¹⁹. Los prototipos diseñados suelen ser estructuras que poseen una geometría ordenada. Las propiedades del material y las características que forman estas estructuras son especialmente importantes en la relación entre las células y el andamio. De ellas depende la adhesión celular y la proliferación de las células. Los materiales de los andamios deben de ser biocompatibles e inducir el biorreconocimiento molecular de las células.

La distribución de los poros en los andamios, el área superficial expuesta y la porosidad también desempeñan un papel relevante en la relación entre las células y el andamio. La cantidad y distribución de los poros influyen de manera determinante en la penetración de las células dentro del volumen del andamio²⁰.

Actualmente son muchos los tipos celulares cultivados con éxito mediante esta técnica (regeneración de hueso, vasos sanguíneos, cartílago o tráquea). Pero la adopción de este tipo de cultivo como metodología estándar en los laboratorios ha estado limitada por la falta de instrumental específico en este campo.

4. CLASIFICACIÓN DE LOS CULTIVOS TRIDIMENSIONALES

Según las tecnologías empleadas podemos clasificar los cultivos tridimensionales²¹ en *primarios*, cuando el fragmento que se cultiva procede directamente sin

19 Jungwoo Lee, Meghan J. Cuddihy, and Nicholas A. Kotov, "Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art.", *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14 (1) (2008) 61-86.

20 Bradley A. Justice, Nadia A. Badr and Robin A. Felder, "3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays", *Drug Discovery Today*. Volume XIV Elsevier, Numbers 1/2 (January 2009).

21 P. Gil-Loyzaga, *Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa*, Madrid 2011, Capítulo 8: cultivos celulares tridimensionales.

modificación de un animal pluricelular, y *secundarios*, cuando se parte de células que ya han sido cultivadas previamente y son reorganizadas sobre una malla tridimensional que sirve de estroma.

4.1. CULTIVOS TRIDIMENSIONALES PRIMARIOS

Cuando hablamos de cultivos tridimensionales primarios nos estamos refiriendo principalmente al cultivo de órganos. Aunque no debemos pasar por alto, que existen problemas de nomenclatura entre la literatura francesa y el ámbito científico anglosajón. Estas diferencias en la nomenclatura son aclaradas posteriormente en el presente artículo. En los cultivos tridimensionales primarios se separa un fragmento tisular de un órgano vivo. Esta acción supone la pérdida de función del sistema vascular, ya que las células se encuentran rodeadas por capilares sanguíneos que garantizan la nutrición de cada una de ellas. El espesor del fragmento orgánico está limitado por la difusión de nutrientes del medio a través de ese tejido. Evidentemente, el espesor depende de la densidad del órgano que queremos estudiar, de su grado de compactación, el hígado por ejemplo es muy compacto. Hay otros órganos como el pulmón, que posee cavidades naturales, el espesor del fragmento orgánico utilizado en un estudio podrá ser mayor. Si la difusión de nutrientes no pasa a través de todo el tejido, este presentará degeneraciones necróticas en su centro.

Normalmente no se administra oxígeno adicional, porque no facilita el cultivo, por el contrario supone la aparición de diferentes alteraciones en el órgano que estamos cultivando. El cultivo de este tipo de tejidos se realiza en la estufa con aire ambiente. El anclaje del tejido también es importante, porque dependen directamente del anclaje para mantener su estructura tridimensional. Su estudio se realiza mediante técnicas histológicas de tinción como Hematoxilina-eosina, PAS o tricrómicos, técnicas de hibridación in situ, microscopía óptica o electrónica, etc.

4.2. CULTIVOS TRIDIMENSIONALES SECUNDARIOS

Dentro de los cultivos tridimensionales secundarios nos encontramos dos tipos de cultivos. Por un lado tenemos los cultivos organotípicos²². Estos tipos de cultivo se caracterizan porque constan de varios tipos celulares que interactúan entre sí

22 P. Gil-Loyzaga, *Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa*, Madrid 2011, Capítulo 8: cultivos celulares tridimensionales.

de una forma que intenta ser lo más similar posible a la original. Este tipo de cultivos persigue la creación “in vitro” de tejidos u órganos completamente funcionales que puedan ser utilizados en injertos o en trasplantes. Los cultivos organotípicos constituyen la base de una disciplina denominada ingeniería de tejidos.

El segundo tipo de cultivo tridimensional secundario son los cultivos histotípicos. Estos cultivos están formados por un solo tipo celular que consigue alcanzar una elevada densidad celular. Las células son reagrupadas para recrear una estructura tridimensional parecida al tejido original, este tipo de cultivo se asemeja mucho a lo que realmente ocurre en los tejidos.

Existe un problema de nomenclatura entre la literatura francesa y el ámbito científico anglosajón. Los científicos franceses entienden por cultivo organotípico al cultivo de órganos, sin embargo en el ámbito científico anglosajón entienden por cultivo organotípico a la reasociación artificial de células, procedentes de distintas líneas celulares, que se integran en una malla artificial, es decir, cultivo es un cultivo celular tridimensional secundario. Mientras que el cultivo de órganos es un cultivo celular tridimensional primario. Por otro lado, ambas tendencias coinciden en la definición de cultivo histotípico.

La utilización de una amplia gama de matrices naturales o artificiales nos permite desarrollar técnicas de cultivos tridimensionales secundarios. Dichas matrices nos permiten reorganizar la estructura del tejido, o recrear otra de naturaleza artificial. Normalmente se basan en una matriz de colágeno, en una esponja de celulosa o en una gelatina a base de colágeno reabsorbible, denominada “gelfoam”²³. En otras ocasiones se utilizan andamios o matrices tridimensionales, formadas por polímeros artificiales, como son las fibras sintéticas, sobre las cuales son explantadas células.

5. TECNOLOGÍAS UTILIZADAS EN EL CULTIVO DE CÉLULAS EN 3D

En el presente artículo son explicadas dos de las tecnologías utilizadas actualmente en el cultivo de células en 3D²⁴: esponjas y geles, y microportadores.

23 R. Rohanzadeh, M. V. Swain and R. S. Mason, “Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. XIX, Issue 3 (2008) 1173-1182.

24 Bradley A. Justice, Nadia A. Badr and Robin A. Felder, “3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays”, *Drug Discovery Today*. Volume XIV Elsevier, Numbers ½ (January 2009).

a) Esponjas y geles

Los geles que se utilizan comúnmente son el colágeno, la gelatina, y la laminina. El usuario puede verter los geles en el matraz de cultivo o en la placa de ensayo. Esponjas, tales como AlgiMatrixTM²⁵, son generalmente geles liofilizados con grandes poros. Los poros que forman estos geles actúan como microambientes celulares. Además, los geles y esponjas utilizan moléculas ECM purificadas y biopolímeros para recrear señales in vivo en las células. En el mercado podemos encontrar diferentes empresas especializadas en la fabricación de geles y esponjas, por ejemplo: MatrigelTM de BD Biosciences, Extracel TM de Biociencias Glycosan y AlgiMatrixTM de Invitrogen.

Matrigel TM es una membrana basal reconstituida, es decir, una mezcla de proteínas de matriz extracelular. Es producida y secretada por las células de sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), desarrollado en ratones y es especialmente adecuado para el cultivo de células epiteliales. El aislamiento de los componentes de la membrana basal²⁶ y su caracterización²⁷ han permitido identificar los componentes mayoritarios de estas membranas, principalmente proteínas estructurales: colágeno tipo IV, laminina y sulfato de heparina.

Extracel TM es un producto de cultivo celular en 3D que combina ácido hialurónico, gelatina y el agente reticulante diacrilato de polietilenglicol (PEGDA)²⁸.

AlgiMatrixTM es una esponja hecha de gel de alginato liofilizado. El alginato es obtenido de un alga marrón y se caracteriza por ser un azúcar polimérico. La intención de AlgiMatrixTM es conseguir que las células invadan los poros, y que mediante el aporte de ECM endógeno las células secreten componentes y se asemejen a la morfología, estructura y comportamiento que tienen y adoptan in vivo.

b) Microportadores

Los microportadores son pequeñas esferas. Normalmente su diámetro no supera los 500 micrómetros. Pero cuenta con un área de superficie de hasta 500 cm² / g, en los microportadores puede cultivarse un gran número de células en un

25 [http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and_Services/Applications/Cell-Culture/3D-Cell-Culture/3D_CellCulture_Misc/AlgiMatrix.html\(6/5/2013\)](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and_Services/Applications/Cell-Culture/3D-Cell-Culture/3D_CellCulture_Misc/AlgiMatrix.html(6/5/2013)).

26 Kleinman, H.K. et al., "Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma", *Biochemistry* 21(1982), 6188-6193.

27 Kleinman, H.K. et al., "Basement membrane complexes with biological activity", *Biochemistry* 28 (1986), 312-318.

28 Shu, X.Z. et al., "Synthesis and evaluation of injectable, in situ crosslinkable synthetic extracellular matrices for tissue engineering", *J. Biomed. Mater. Res. A* 15 (2006), 902-912.

volumen realmente pequeño. Esta nueva tecnología está atrayendo a nuevos usuarios del campo de la ingeniería tisular y de los biomateriales²⁹.

En un estudio, en el cual se cultivó condrocitos primarios en microportadores se observó que éstos se expanden de forma eficiente en las pequeñas esferas y además, conservan características esenciales para la implantación³⁰.

6. CONCLUSIÓN

El cultivo de células en 3D se está convirtiendo en una técnica esencial en múltiples áreas de investigación como son la ingeniería tisular, medicina regenerativa o desarrollo de nuevos fármacos. Este tipo de cultivo de células abre una nueva dimensión en los ensayos de cultivos, ya que las células se comportan de manera más parecida a como lo hacen en sus organismos de origen. La información obtenida es de mejor calidad cuando se realizan ensayos con cultivos celulares en 3D.

Ya existen varias tecnologías que son utilizadas en el cultivo de células en 3D, por ejemplo: esponjas y geles y microportadores. Los geles que se utilizan comúnmente son el colágeno, la gelatina, y la laminina. Esponjas, tales como AlgimatrixTM, son generalmente geles liofilizados con grandes poros. Los microportadores son pequeñas esferas en las cuales puede cultivarse un gran número de células en un volumen realmente pequeño. Las tecnologías de cultivo celular en 3D han revolucionado nuestro entendimiento del comportamiento celular, tanto en cultivos *in vitro*, como en ensayos *in vivo*. Pero actualmente la adopción de este tipo de cultivo como metodología estándar en los laboratorios es escasa debido a problemas de consistencia, coste y falta de instrumental.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bradley A. Justice, Nadia A. Badr and Robin A. Felder, "3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays", *Drug Discovery Today*. Volume XIV Elsevier, Numbers ½ (January 2009).

29 Bradley A. Justice, Nadia A. Badr and Robin A. Felder, "3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays", *Drug Discovery Today*. Volume 14 Elsevier, Numbers ½ (January 2009).

30 Malda, J. et al., "Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation" *Tissue Engineering* 9 (2003), 939-948.

- D.Wendt, S.A.Riboldi, M.Cioffi and I.Martin, "Potential and Bottlenecks of Bioreactors in 3D Cell Culture and Tissue Manufacturing" *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 21 (2009).
- Giovanna Mazzoleni, D. Di Lorenzo and N. Steimberg. "Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research?", *Genes Nutr* 4 (1) (2009).
- H.A.Mirón, *Notas técnicas de prevención. Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo.
<http://es.wikipedia.org/wiki/Criopreservación> (14/1/2013).
<http://es.wikipedia.org/wiki/HeLa> (20/3/2013).
<http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf> (4/5/2013).
http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf (25/1/2013).
http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and_Services/Applications/Cell-Culture/3D-Cell-Culture/3D_CellCulture_Misc/AlgiMatrix.html(6/5/2013).
- I.Martín, D.Wendt and M.Heberer, "The role of bioreactors in tissue engineering", *Trends in Biotechnology*, Volume XXII, Issue 2 (February 2004) 80–86.
- Jungwoo Lee, Meghan J. Cuddihy, and Nicholas A. Kotov, "Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art.", *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14 (1) (2008) 61-86.
- Kleinman, H.K. et al., "Basement membrane complexes with biological activity", *Biochemistry* 28 (1986), 312–318.
- Kleinman, H.K. et al., "Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma", *Biochemistry* 21(1982), 6188–6193.
- Malda, J. et al., "Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation" *Tissue Engineering* 9 (2003), 939–948.
- P, Gil-Loyzaga, *Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa.*, Madrid 2011, Capítulo 8: cultivos celulares tridimensionales.
- R. Rohanzadeh, M. V. Swain and R. S. Mason, "Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. XIX, Issue 3 (2008) 1173-1182.
- Ruei-Zhen Lin and Hwan-You Chang, "Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research", *J. Biotechnol* 3 (2008), 1172–1184.
- Shu, X.Z. et al., "Synthesis and evaluation of injectable, in situ crosslinkable synthetic extracellular matrices for tissue engineering", *J. Biomed. Mater. Res. A* 15 (2006), 902–912.
- Tyler Jacks and Robert A. Weinberg, "Taking the Study of Cancer Cell Survival to a New Dimension", *Cell*, Vol. CXI, December 27 (2002).