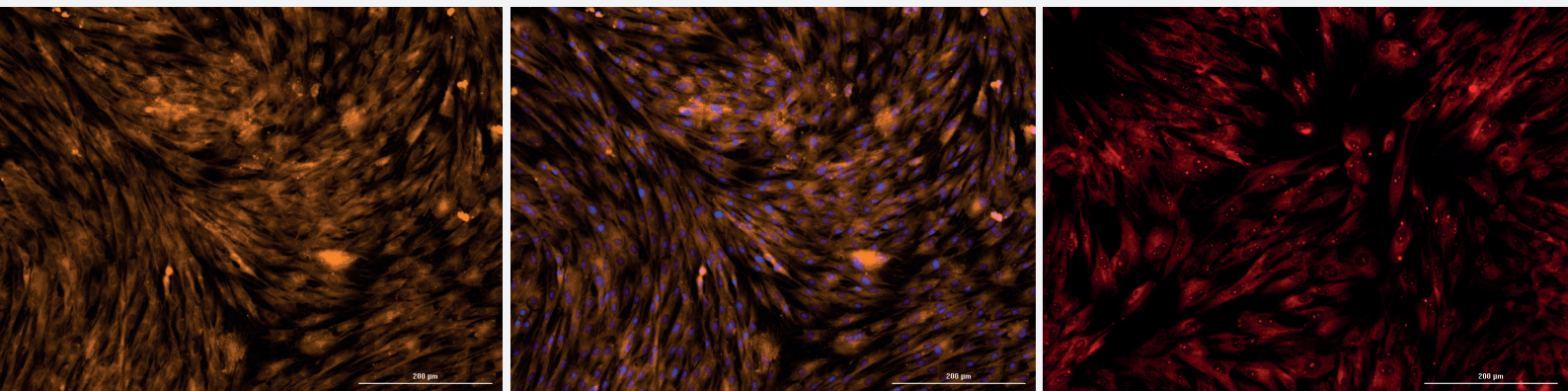




CUESTIONES A CONSIDERAR DURANTE **EL CULTIVO DE CÉLULAS**

Desde su descubrimiento en 1960 por Ernest McCulloch y James Till, las células madre han sido objeto de infinidad de estudios generando controversia entre los miembros de la comunidad científica y en la sociedad en general. No obstante, el cultivo y estudio de células madre ha sido el responsable de grandes avances en la medicina, dejando la puerta abierta a un sinfín de aplicaciones por descubrir.

Iria Echevarria, Directora científica y de proyectos del laboratorio, IMERETI

AL HABLAR DE CÉLULAS MADRE ES IMPORTANTE CONOCER QUE NO SE TRATA DE UN ÚNICO TIPO DE CÉLULAS

sino que este término engloba a una serie de células que tienen la capacidad de modificar su fenotipo, para dar lugar a otra célula con distinta funcionalidad. En primer lugar, debemos diferenciar las células madre por su potencial de dar lugar a otros linajes celulares. Las células madre embrionarias (ESCs), estas son el resultado de la formación de un cigoto y son consideradas como pluripotentes. Estas células pueden dar lugar a todas las células del embrión, pero no a los tejidos extraembrionarios.

Descendiendo en su potencial de diferenciación podemos encontrar el linaje multipotente que comprende las células madre mesenquimales (MSCs) y las células madre hematopoiéticas (HSCs), ambas pudiendo ser encontradas en individuos adultos. Las células madre provenientes del mesénquima están localizadas en distintas proporciones en tejidos tales como la médula ósea, la grasa, la pulpa dental o el cordón umbilical. Estas células pueden diferenciarse en tejidos como

hueso, cartílago o grasa entre otros. Por otro lado, las HSCs son capaces de dar lugar a los diferentes tipos celulares que componen la sangre.

El cultivo y mantenimiento de estas células varía en su complejidad en función del tipo de célula cultivada y el propósito del cultivo. Iniciar el cultivo de células adquiridas comercialmente, y previa caracterización, resulta más sencillo pero costoso que obtenerlas del tejido de origen. La extracción de las células de tejidos como la grasa o el cordón umbilical, requiere un procesamiento comúnmente enzimático, para disgregar el tejido y aislar únicamente las células de interés. Este proceso ha de realizarse con cuidado extremo con el fin de evitar posibles infecciones de tejidos que podrían no ser estériles, por lo que el uso de antibióticos es recomendable en este proceso. El aislamiento de MSCs de la médula ósea, resulta algo más sencillo dado que la sangre es un tejido naturalmente estéril, compuesto por células no adherentes, de manera que las únicas células que encontremos adheridas a los frascos de cultivo serán aquellas consideradas como MSCs.

La caracterización de las células es un proceso fundamental si se desea asegurar la identidad de las células en cultivo. Del mismo modo, al inicio del cultivo, es vital prestar atención a posibles rasgos de infección bacteriana o fúngica en el cultivo para evitar la propagación de esta. La presencia de contaminantes en el medio puede ser detectada mediante observación visual bajo el objetivo x40 del microscopio en el caso de presencia de bacterias, y a menor magnificación en el caso de hongos. Su presencia puede ser detectada por lo general entre 1 y 3 días tras ser contaminado. Habitualmente la presencia de contaminantes es una señal para desechar las células, no obstante, y si la infección es leve y el valor del cultivo elevado, aumentar la dosis de antibióticos presentes en el medio de cultivo podría contener la infección, sin embargo, este procedimiento no es recomendable debido a la gran cantidad de riesgos asociados.

Generalmente las células madre pueden ser cultivadas con lo que se conoce como un medio basal, que está compuesto por los nutrientes más básicos que las células requieren para su funcionamiento. Uno de los medios más comunes empleados es el conocido como Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con glucosa alta, piruvato de sodio y L-Glutamina, componentes necesarios para la expansión celular. La adición al medio de suero fetal bovino fomenta el rápido crecimiento de las células, sin embargo, ciertos cultivos se benefician de la ausencia de este componente, en especial para diferenciar las células hacia determinados fenotipos. El uso de suero en los cultivos suele introducir limitaciones, especialmente en el cultivo GMP. Debido a su procedencia animal, es fundamental elegir sueros cualificados para la fabricación bajo GMP, que comúnmente provienen de Australia, y más recientemente Estados Unidos. Otro requerimiento es la necesidad de experimentar con el lote de suero, para asegurar el correcto crecimiento de las células y la adecuada funcionalidad. Por último, suele ser necesaria la demostración de la ausencia de

trazas y otros componentes pertenecientes al medio de cultivo previa liberación de un producto celular fabricado bajo normativa GMP.

Es común durante el primer o segundo pase de cultivo, el conservar la presencia de antibióticos y/o antimicóticos para asegurar la esterilidad del cultivo. No obstante, el uso de este tipo de reactivos afecta a la funcionalidad de las células por lo que es recomendable retirarlos del medio, una vez asegurada la esterilidad tras el aislamiento. Otra serie de cultivos, como el caso de las ESCs, requiere el cultivo libre de antibióticos desde el inicio, debido a los efectos nocivos que estos causan durante el

proceso de diferenciación celular.

Cuando el cultivo celular se realiza con el fin de emplear las células por su capacidad de diferenciación, es importante limitar el número de divisiones celulares. Con el aumento del número de duplicaciones, las células madre, a menudo, pierden parte del potencial de diferenciación y su fenotipo puede verse alterado, como ha sido demostrado por análisis de los marcadores de membrana con citometría de flujo. A pesar de la gran variedad de opiniones entre la comunidad científica, es común el limitar la expansión de las células hasta un pase 4-5 para evitar la merma en la multipotencialidad.

Los cultivos celulares destinados a terapias celulares bajo estándares de fabricación GMP, requieren una serie de controles adicionales que garanticen, entre otros aspectos: la estabilidad genética de las células, la identidad celular, la presencia de endotoxinas, micoplasma o trazas de reactivos y la viabilidad celular del producto liberado.

Todos estos elementos hacen del cultivo de células madre un proceso variable, en estrecha dependencia del origen celular y de la futura aplicación de las células en cultivo. La selección del método de aislamiento, medio de cultivo o pase, entre otros, será clave para garantizar el mantenimiento de la potencia de las células y por tanto, de su efecto terapéutico ●



'La caracterización de las células es un proceso fundamental si se desea asegurar la identidad de las células en cultivo'