

Cultivo celular tridimensional: protocolos y métodos emergentes

Dayana Fausto .¹

Ingeniería en nanotecnología, División de ciencias básicas y aplicadas, Centro Universitario de Tonalá, Universidad de Guadalajara.

Resumen

El presente artículo tiene como objetivo recopilar distintos métodos para la obtención de esferoides, destacando de manera concisa sus ventajas en comparación con los cultivos celulares tradicionales. Los métodos presentan diversas técnicas de elaboración, cuyas implicaciones prácticas permiten seleccionar el enfoque más adecuado según los objetivos de investigación. El método de cultivo en pellet se caracteriza por su simplicidad y eficacia, logrando una alta reproducibilidad en las propiedades de los esferoides. Sin embargo, controlar el microambiente puede presentar cierta complejidad. Por otro lado, el método de gota colgante facilita el mantenimiento de condiciones estandarizadas, aunque requiere especial atención para prevenir la evaporación del medio. Finalmente, el cultivo por agitación es ideal para la producción a gran escala de esferoides, siempre que se utilicen células con suficiente cohesión, de lo contrario, existe el riesgo de apoptosis celular.

Palabras Claves: *Esferoide, cultivo celular 3D, cultivo tradicional, caracterización*

Introducción

Las áreas de investigación médica, biomédica y preclínica están en constante crecimiento y deben enfrentar diversos desafíos, entre ellos el uso de cultivos celulares para obtener datos precisos que impulsen avances científicos. El cultivo celular es una técnica *in vitro* en la cual se realiza el procesamiento de una muestra de tejido con la finalidad de extraer las células que lo conforman, para conseguir un ambiente óptimo en el que las células puedan sobrevivir se requiere agregar un medio que les proporcione nutrientes para posteriormente dividirse. Este proceso de división usualmente ocurre por mitosis (Morales et al., 2019). En el campo de la investigación científica se han obtenido extensos y novedosos métodos para realizar cultivo celular, debido a que con esta técnica es posible el estudio del metabolismo y la fisiología humana, facilitando la evaluación de respuestas ante determinados estímulos de sustancias químicas en condiciones controladas. Al emplear esta técnica es posible investigar el comportamiento de tipos celulares individuales sin la influencia de variaciones sistémicas que podrían surgir durante la homeostasis normal *in vivo* y

conseguir información respecto a la citotoxicidad, genotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis en tipos específicos de células. Otra de sus aplicaciones es el uso en el análisis de los mecanismos de infección de virus y bacterias o para buscar posibles agentes antivirales y antibacterianos al fungir como hospederos (Morales et al., 2019; Philippeos et al. 2012).

Establecer un cultivo celular se logra a partir de suspensiones celulares que posteriormente se transferirán a una superficie sólida, normalmente se puede utilizar la base de una placa o frasco de plástico, con la finalidad de crecer y multiplicar las células (Chen et al., 2020). Este tipo de cultivo se conoce como cultivo celular 2D, las células se adhieren a la base y se encuentran dividiéndose de manera horizontal, formando una capa en dos dimensiones.

Esta técnica es ampliamente utilizada para ensayos de investigación biomédica y preclínica, sin embargo, el crecimiento en diversas áreas tales como nanomedicina, terapia génica, genómica y proteómica, ha significado un aumento en el empleo de

cultivos celulares, de este modo se evidencian nuevos y más complejos requisitos los que se deben evaluar, por lo tanto ha surgido la necesidad de superar las limitaciones de los cultivos celulares tradicionales y desarrollar modelos que permitan obtener una simulación más precisa del ambiente en el que se encuentran las células. Uno de los principales obstáculos que se presentan al emplear el cultivo celular 2D es la pérdida de heterogeneidad celular de partida, esto se debe a que la población celular crece de manera uniforme y homogénea, además se desaparece la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular (Baust et al., 2017; García S., 2013). El cultivo celular tridimensional es el resultado de estos nuevos requisitos, consiste en mimetizar el microambiente en el que se encuentran las células, replicando la morfología y las propiedades bioquímicas que se encuentran en las células en su emplazamiento en el organismo vivo. Al utilizar esta técnica tridimensional se logran conseguir condiciones altamente similares a aquellas en las que se encuentran las células de un organismo vivo. Los modelos en tres dimensiones se denominan esferoides, esferas líquidas, organoides, matrices 3D, cultivos en andamios etcétera (García S., 2013; Meseguer et. al., 2015).

Explorar las técnicas que se encuentran a la vanguardia permite obtener un panorama en el que se conozcan los procedimientos que se ven implicados en cada metodología, facilitando a su vez la elección a emplear. Este resumen describe una serie de métodos para la creación de cultivos celulares tridimensionales enfocados en esferoides.

Esferoides

En una suspensión de cultivo celular, las células muestran una tendencia a agregarse y a atravesar un proceso de auto-ensamblaje. Este mecanismo de formación de esferoides se ve influenciado por diversos factores como gradientes de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento en el medio de cultivo celular, así como factores paracrinos celulares. El medio de cultivo celular accede al interior de los esferoides mediante un mecanismo de difusión, el gradiente de difusión ocurre al aumentar el tamaño de los esferoides durante el cultivo, de manera que entre mayor sea el tamaño de los esferoides, se vuelve más

complejo para el medio alcanzar el núcleo (Ryu et al., 2019). Los esferoides son un diseño de cultivo celular tridimensional en el cual se emplea esta tendencia natural de las suspensiones celulares de agregarse para de este modo generar masas multicelulares que presentan una forma esferoidal. En óptimas condiciones es posible cultivar esferoides de cualquier tipo de célula (Meseguer et. al., 2015). Además, tienen aplicación en modelos de tumores, ingeniería de tejidos, investigación científica, terapia de trasplante, entre otros. Actualmente hay distintas técnicas para conseguir el cultivo de esferoides, por ejemplo; cultivo en pellet, superficie líquida, gota colgante, cultivo en agitador, vaso de pared rotatoria, microfluidos y levitación magnética (Ryu et al., 2019).

Métodos de obtención de esferoides.

Método de cultivo en pellet.

El primer paso para realizar esta técnica es iniciar un vial de una línea celular, el cual debe cultivarse con la metodología tradicional o 2D para obtener la cantidad deseada de células. Una vez obtenidas, estas se transfieren a un tubo Falcon.

El objetivo de este método es crear esferoides mediante la concentración de células en un tubo que se somete a centrifugación. Esto facilita el contacto célula-célula, ya que las células interactúan en el fondo del tubo, generando una autoorganización en un microambiente que se asemeja más a las condiciones in vivo. Posteriormente, se retira el sobrenadante y el pellet de células se resuspende añadiendo medio de cultivo celular.

Después, se deben realizar los cálculos necesarios para distribuir la suspensión celular adecuadamente en cada pozo de una placa de 96 pozos, ajustando la concentración celular a una densidad óptima para la formación de esferoides (generalmente entre 10,000 y 1 millón de células por pozo, dependiendo del tamaño deseado de los esferoides y del tipo celular). En cada pozo se formará un esferoide.

Una vez distribuida la suspensión celular en la placa de 96 pozos, esta se coloca en una incubadora a 37°C con un 5% de CO₂. El

proceso de incubación debe durar entre 7 y 14 días, dependiendo de las características que se deseen alcanzar en el cultivo de los esferoides. Es importante mencionar que las células deben ser mantenidas añadiendo nuevo medio de cultivo cada 24-72 horas para proporcionarles los nutrientes necesarios, lo que favorece la interacción continua y promueve la compactación y formación de los esferoides. Durante este tiempo, las células reorganizan su arquitectura para formar un esferoide más definido y funcional, que puede simular mejor las características fisiológicas de los tejidos in vivo.

Los esferoides formados pueden permanecer en la placa para estudios de viabilidad, proliferación o respuesta a fármacos, o bien ser recolectados mediante micropipetas para transferirlos a otras condiciones de cultivo, o para su procesamiento en estudios de microscopía, citometría de flujo o análisis moleculares.

El método de cultivo en pellet es sencillo y eficaz para generar esferoides homogéneos

de tamaños variables según la cantidad de células iniciales. Una ventaja clave es la capacidad de generar esferoides con relativa rapidez y alta reproducibilidad en términos de tamaño y compactación. Además, permite trabajar con un amplio rango de densidades celulares y es aplicable a diferentes tipos de células, incluidas células madre, células cancerosas y fibroblastos.

Sin embargo, algunas limitaciones incluyen la falta de control sobre el microambiente local, ya que los esferoides pueden variar en su exposición a nutrientes y oxígeno a medida que crecen. Este gradiente de oxígeno y nutrientes puede llevar a la formación de zonas de necrosis en el centro de esferoides grandes, similar a lo que ocurre en tumores sólidos in vivo, lo que puede afectar los resultados en estudios de viabilidad o respuesta a fármacos. Además, la manipulación de los esferoides tras su formación puede ser delicada, ya que su estructura compacta puede desagregarse fácilmente si no se manejan con cuidado.



Figura 1. Protocolo de preparación de esferoides por el método de cultivo en pellet.

Método de la gota colgante

En la formación de esferoides, una de las técnicas más utilizadas es la de "gota colgante". Este enfoque facilita que las células individuales se agreguen y formen esferoides en forma de gotas. Los esferoides obtenidos mediante este método pueden ajustarse a características definidas, como el tamaño, debido al control en el volumen de la gota o en la densidad de la suspensión celular. Esta técnica permite formar esferoides circulares con una distribución de tamaño estrecha, con un coeficiente de variación del 10% al 15%, mientras que los esferoides cultivados en superficies no adherentes presentan un coeficiente de variación del 40% al 60% (Ryu et al., 2019).

El proceso para iniciar esta técnica consiste en partir de un cultivo tradicional. Luego, las células se preparan en suspensión y se diluyen con medio de cultivo para alcanzar la densidad celular deseada. Posteriormente, la suspensión celular se transfiere a los pozos de una bandeja o placa de cultivo, a la cual se le coloca una tapa para luego invertirla boca abajo. Cada gota, de aproximadamente 20-50 μL , contiene un número definido de células suspendidas en medio de cultivo. De esta manera, las gotas de suspensión celular se mantienen adheridas a la superficie debido a la tensión superficial, mientras que la gravedad contribuye a formar la estructura en forma de gota (Ryu et al., 2019). La placa con las gotas colgantes se incubaba en un ambiente controlado a 37°C con un 5% de CO_2 .

Artículos

Una vez alcanzado el tamaño o el estado de compactación deseado, los esferoides se pueden recolectar cuidadosamente utilizando micropipetas, evitando dañar su estructura celular.

El método de gota colgante ofrece varias ventajas, entre ellas: la simplicidad del procedimiento, la homogeneidad en el tamaño de los esferoides producidos, y la capacidad de mantener condiciones estandarizadas sin necesidad de aditivos o

materiales complejos. No obstante, es importante controlar cuidadosamente las condiciones de incubación y el volumen de las gotas, ya que una evaporación significativa del medio puede afectar la viabilidad y el desarrollo de los esferoides. Además, esta técnica es más adecuada para experimentos a pequeña escala, debido a la limitada cantidad de esferoides que se pueden generar simultáneamente en una placa estándar.

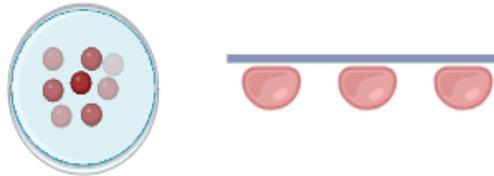


Figura 2. Del lado izquierdo, perspectiva superior de la tapadera de un disco Petri con gotas colgantes de esferoides. Del lado derecho, perspectiva lateral de las gotas colgantes de esferoides.

Método de cultivo celular por agitación.

El método de cultivo en agitación consiste en formar esferoides utilizando frascos biorreactores de agitación. El principio es evitar que las células que se encuentran en suspensión se asienten, esto se logra al mantener una agitación constante que causará colisiones entre las células (Achilli et al., 2012). Al iniciar esta técnica de cultivo se requiere añadir una suspensión uniforme de células en el frasco biorreactor, el entorno fluido y la transferencia de masa en el matraz se controlan mediante fuerzas convectivas generadas por un impulsor o una barra de agitación magnética. Mantener una agitación constante es importante, sin embargo, es necesario señalar que si se aplica una

agitación a alta velocidad se provocará daño celular en los esferoides, pero si se aplica una baja velocidad de agitación, esto causará que los esferoides se asienten. El tamaño de los esferoides resultantes se encuentra influenciado por el tamaño del contenedor del biorreactor (Ryu et al., 2019). Este método permite la producción de grandes cantidades de esferoides, además se ha utilizado en una variedad de células primarias, líneas celulares y mezcla de dos tipos celulares, generando esferoides heterotípicos. No obstante, debido a las fuerzas convectivas, el uso de este método puede no resultar óptimo para células que manifiestan baja cohesión o células adherentes que pueden sufrir apoptosis al encontrarse en suspensión (Achilli et al., 2012).



Figura 3. Método de cultivo celular por agitación en un matraz agitador.

Conclusiones

Este artículo ha recopilado diversas metodologías para la producción de esferoides, destacando las ventajas que ofrecen los cultivos celulares 3D frente a los tradicionales, principalmente en su capacidad para imitar microambientes similares a los de un organismo vivo. Los resultados indican que, aunque el cultivo en pellet es relativamente sencillo y reproduce de forma eficiente las propiedades de los esferoides, presenta desafíos en el control del microambiente local. Esto se debe a que los gradientes de oxígeno y nutrientes no siempre alcanzan todas las zonas internas del esferoide, lo que puede ocasionar necrosis.

El método de gota colgante, por su parte, garantiza una mayor homogeneidad en el tamaño de los esferoides y no requiere aditivos o materiales complejos, sin embargo, las condiciones de incubación son más rigurosas, ya que la evaporación del medio puede comprometer la viabilidad celular, lo que lo hace más adecuado para la producción a pequeña escala. En cuanto al cultivo por agitación, este se perfila como una opción prometedora para la producción a gran escala, siempre que las células empleadas mantengan una cohesión adecuada para evitar la apoptosis.

A pesar de que cada uno de estos métodos presenta ciertas limitaciones, su optimización puede mejorar significativamente el desarrollo de modelos celulares tridimensionales, con aplicaciones en diversas áreas científicas. Futuras investigaciones podrían enfocarse en superar las limitaciones asociadas con el control del microambiente, la reproducibilidad y la escalabilidad de estos sistemas. En conclusión, este trabajo proporciona una base para la selección de metodologías adecuadas en estudios que requieran esferoides, lo que podría tener un impacto en la investigación biomédica y en el desarrollo de terapias innovadoras.

Referencias

- Morales-Sánchez J., Ulloa-Fernández A., Castro-Piedra, S., Centeno-Cerdas, C., & Calvo-Castro, L. A. (2019). Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina. *Revista Tecnología En Marcha*, 32(9), Pág 56–65. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4628>
- Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A., & Mitry, R. R. (2012). Introduction to cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 806, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_1
- Chen, Q., & Wang, Y. (2020). The application of three-dimensional cell culture in clinical medicine. *Biotechnology Letters*, 42(11), 2071-2082.
- Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, Price P, Reid YA, Simione F. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017 Sep;53(8):669-672. doi: 10.1007/s11626-017-0177-7. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28808859.
- García, S. C. (2013). Cultivo de células en 3D: la nueva dimensión de los cultivos celulares. *Cuadernos del Tomás*, (5), 215-232.
- Meseguer, J., Esteban Abad, M. D. L. Á., Mulero Méndez, V. F., Cuesta Peñafiel, A., & Sepulcre Cortés, M. P. (2015). Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. *Eubacteria*, nº34, 2015.
- Ryu, N. E., Lee, S. H., & Park, H. (2019). Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells*, 8(12), 1620.
- Štampar, M., Žabkar, S., Filipič, M., & Žegura, B. (2022). HepG2 spheroids as a biosensor-like cell-based system for (geno) toxicity assessment. *Chemosphere*, 291, 132805.
- Achilli, T. M., Meyer, J., & Morgan, J. R. (2012). Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert opinion on biological therapy*, 12(10), 1347-1360.
- Figuras creadas en <https://BioRender.com>