

ESTABLECIMIENTO DE UN NUEVO SISTEMA DE CULTIVO DE CELULAS EN CAPAS PERFUNDIDAS. I. DISEÑO Y PRINCIPIOS OPERATIVOS

George F. Mann ¹

Se describe en este artículo el concepto, plan y principios operativos de un nuevo sistema de cultivo celular en capas perfundidas. Este procedimiento puede ser útil en numerosos campos de investigación y en la producción de vacunas en gran escala y otras sustancias celulares.

Introducción

Los sistemas del cultivo celular desempeñan una función cada vez mayor en las investigaciones, el diagnóstico virológico y la producción y ensayo de sustancias biológicas. En la actualidad se producen alrededor de unas 20 vacunas antivirales para uso humano y animal que se ensayan en gran escala en cultivos tisulares.

Hasta fecha reciente el tamaño de los lotes de vacuna en la fase de producción estaba limitado por el uso de órganos de animales potencialmente infectados. En estas condiciones la pérdida y el costo son considerablemente altos, y el tipo de sistema de cultivo utilizado de poca importancia económica.

El desarrollo de células diploides normales y su aplicación en la producción de vacunas (1-3), resolvió las primeras dificultades relacionadas con la fuente celular. En la actualidad puede garantizarse la ausencia de agentes adventicios en las reservas de células congeladas, y el tamaño del lote es, en potencia, ilimitado. En este sistema los costos se relacionan directamente con la medida y eficacia en que el sistema de cultivo utilizado es de importancia primordial.

Los métodos usuales de cultivo en capas monocelulares utilizando botellas inmóviles o sistemas rotatorios resultan difíciles de adaptar a los trabajos en gran escala. Debido

a que la superficie de las botellas es pequeña, se necesita manipular gran número de ellas, lo que requiere de instalaciones grandes, y ocasiona un elevado costo y pérdidas durante el proceso que resultan inaceptables.

Recientemente se han descrito métodos en los cuales el volumen celular por área unitaria en frascos de cultivos normales puede aumentarse muy por encima de lo normal. Con la perfusión el medio de crecimiento (4) o repetidos cambios de medio (5) se ha obtenido una cantidad de células en monoestratos 16 veces mayor que lo normal con muchos tipos celulares incluyendo las diploides.

En la actualidad se ha ideado un nuevo sistema de cultivo basado en el método de perfusión. Este sistema satisface las necesidades de investigación y permite la producción de cultivos celulares y vacunas antivirales en gran escala, sin precedente.

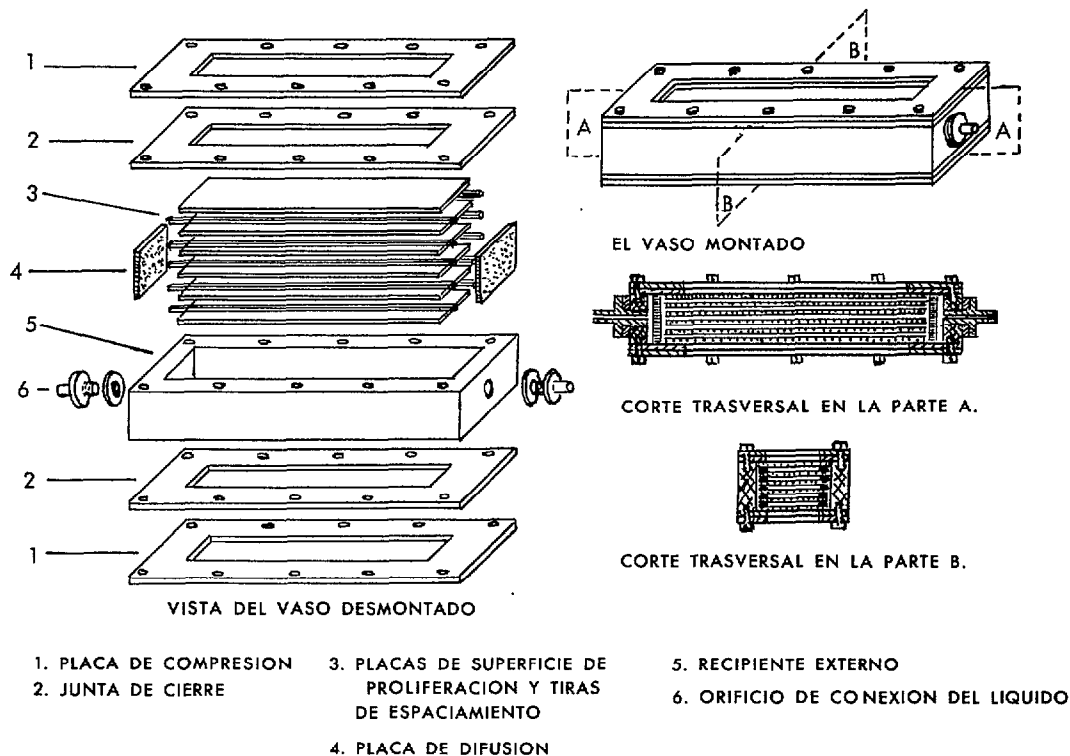
Diseño

El nuevo sistema consiste esencialmente en dos o más placas de material de superficie de cultivo, separadas unas de otras y colocadas dentro de un recipiente herméticamente cerrado provisto de orificios para la conexión de líquidos.

En el ejemplo mostrado en la figura 1, las placas transparentes rectangulares están colocadas superpuestas y separadas entre sí

¹ Científico, Zona II de la OPS.

FIGURA 1—Diseño de un recipiente típico de cultivo.



a lo largo de los cuatro bordes por tiras de material para espaciadas. Las placas y las tiras espaciadoras se colocan en una caja provista de orificios contiguos a los lados de la pila de láminas desprovistas de tiras espaciadoras. La caja se cierra con las placas y juntas de compresión de la parte superior e inferior que ejercen presión sobre la pila de láminas transparentes. Las placas y juntas de compresión se recortan en el centro para permitir la inspección de las placas y canales exteriores. Se puede insertar una capa de material poroso, perforado o ranurado junto a los orificios de conexión para garantizar la distribución uniforme de líquido entre las placas.

Los materiales utilizados para la fabricación de este sistema de cultivo en particular deben ser esencialmente no tóxicos para las células y los métodos de lavado y esterilización deben ser adecuados. El

material deberá ser de la mejor calidad que permita la adsorción y el crecimiento de las células en toda su superficie. Se prefiere para este propósito materiales transparentes con buenas propiedades ópticas.

El cuadro 1 enumera algunos materiales apropiados.

Este diseño básico es sumamente flexible y puede utilizarse para fabricar recipientes con áreas de superficie de cultivo de 10 cm² a 10 m², y que tengan una gran variedad de aplicaciones. La capacidad y la longitud del recorrido del líquido puede también variar dentro de grandes límites. El cuadro 2 presenta en detalle las características de un típico recipiente de cultivo.

Principios operativos

El objetivo fundamental consiste en nutrir a las células adsorbidas en una superficie apropiada con un flujo controlado del medio

CUADRO 1—Materiales aceptables para la fabricación del recipiente.

Propósito	Materiales
Placas de superficie de proliferación	Vidrio, policarbonato, polipropileno, polistireno, nylon.
Espaciamiento de la superficie de proliferación	P.T.F.E., policarbonato, polipropileno, nylon, hule natural o sintético, titanio, acero inoxidable, vidrio, aleaciones metálicas.
Recipiente, láminas de compresión, orificios de conexión del líquido	Polipropileno, nylon, titanio, acero inoxidable, aleaciones metálicas.
Juntas de cierre hermético	Hule natural o sintético, sólo o combinado con P.T.F.E., nylon o película de polipropileno.
Placas de difusión	P.T.F.E., policarbonato, polipropileno, polistireno, nylon, acero inoxidable, titanio, vidrio.

de cultivo y conociendo el pH y las tensiones gaseosas conocidos. A continuación se indica el procedimiento para esta operación:

1. Monte y esterilice el recipiente de cultivo y el equipo auxiliar.

2. Equilibre la temperatura del vaso al grado óptimo para la proliferación celular.

3. Conecte el vaso a un depósito que contenga un inóculo celular en suspensión en un volumen de medio equivalente a la capacidad del recipiente.

4. Transfiera la suspensión al recipiente desplazando hacia arriba todo el aire. Cierre herméticamente y deje que las células se sedimenten y se adsorban en uno o ambos lados de las placas de superficie de cultivo, en la forma requerida.

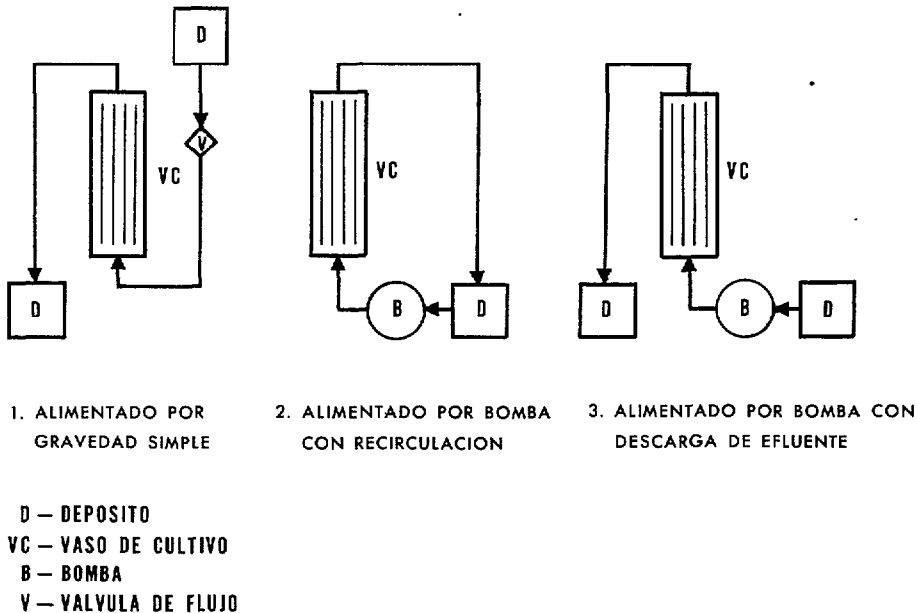
5. Conecte el recipiente a un depósito de medio de cultivo con un pH y tensión gaseosa controlados:

6. Proceda a la perfusión del medio por todo el recipiente a un ritmo controlado que permita lograr la densidad celular deseada. Esta operación se puede efectuar mediante la perfusión del medio a un ritmo fijo, suficiente para ofrecer la máxima densidad celular y su recirculación por el depósito del medio de cultivo, o bien por perfusión a un ritmo creciente en relación con la densidad celular calculada o la actividad metabólica observada, desechando el medio utilizado en un depósito colector. En el primer método se puede regular fácilmente el pH y la tensión gaseosa y relacionar la densidad celular final con el volumen del medio utilizado. En el segundo método, se produce un gradiente del pH, la tensión gaseosa y el nutriente a través del recorrido del líquido. El método seleccionado dependerá de la aplicación.

CUADRO 2—Características de un modelo típico de recipiente.

Dimensiones totales	:—45 x 16 x 12 cm
Desplazamiento total	:—8.6 litros
Peso total	:—11 kg
Número de placas de superficie de proliferación	:—66
Dimensiones de las placas	:—40 x 12 x 0.08 cm
Dimensiones del material de espaciamento	:—42 x 1 x 0.08 cm
Area total de la superficie de proliferación	:—5.2 m ²
Capacidad total del recipiente	:—2.28 litros
Capacidad por unidad de superficie de proliferación	:—0.04 ml/cm ²
Longitud del recorrido del líquido	:—40 cm
Area de superficie de proliferación por unidad de peso total	:—4.7 cm ² /g
Area de superficie de proliferación por unidad de desplazamiento total	:—6.2 cm ² /ml
Eficacia del cierre	:—Hermético para el gas y el líquido a baja presión.

FIGURA 2—Posibles disposiciones sencillas para la utilización del recipiente de cultivo.



El aparato que acompaña a este procedimiento puede ser simple o complejo según la aplicación. Cuando se trata de un procedimiento simple tal vez se requieran solamente dos depósitos, algún tubo flexible y una pinza de rosca. En otros casos puede lograrse un elevado grado de control y elaboración automatizados utilizando equipo estándar. La figura 2 presenta un diagrama de algunos procedimientos posibles.

Puesto que estos recipientes no contienen fase gaseosa libre es indispensable controlar las tensiones gaseosas, particularmente las del oxígeno y el bióxido de carbono en el exterior (en el depósito del medio o en la conducción del recipiente).

Todas las operaciones se llevan a cabo esencialmente utilizando un sistema cerrado, ofreciendo así el mínimo riesgo de contaminación bacteriana.

La proliferación celular u otros efectos pueden vigilarse microscópicamente observando las cámaras exteriores del recipiente, y se pueden efectuar estudios virológicos en muestras obtenidas de las conducciones de

entrada y salida. Los recipientes pueden disponerse en serie o de forma paralela para prolongar el tiempo de residencia u obtener réplicas de cultivo, respectivamente.

Después de la fase de proliferación celular, se pueden cultivar de manera análoga virus, interferón u otras sustancias celulares o bien, se pueden eliminar las células para ofrecer un inóculo celular para otros recipientes de cultivo.

Resumen

Se describe el diseño y los principios operativos de un nuevo sistema para la proliferación de células en capas perfundidas. El sistema de cultivo consiste en láminas de material de superficie de proliferación colocadas en un recipiente herméticamente cerrado provisto de orificios de conexión apropiados. La flexibilidad del diseño permite la fabricación de recipientes de distinta área de superficie de proliferación, capacidad y otras características. En este procedimiento, las células se adsorben en las super-

ficies de proliferación y se nutren con un flujo de medio de cultivo a una velocidad, tensión gaseosa y pH controlados.

La aplicación de este sistema a los tra-

bajos de investigación y a la producción de vacunas antivirales es objeto de estudio y, en una fecha posterior, se informará al respecto. □

REFERENCIAS

- (1) Hayflick, L. "History of the development of human diploid cell strains". En *Proceedings, Symposium on the Characterization and Uses of Human Diploid Cell Strains*. Opatija, Yugoslavia, páginas 37-54, 1963.
- (2) Hayflick, L. "A comparison of primary monkey kidney, heteroploid cell lines and human diploid cell strains for human virus vaccine preparation". *Amer Rev Resp Dis* 88:387-393, 1963.
- (3) O'Reilly, K. J. y Whittaker, A. M. "The development of feline cell lines for the growth of feline infectious enteritis (panleucopenia) virus". *J Hyg Camb* 67:115-124, 1969.
- (4) Kruse, P. F. y Mediema, E. "Production and characterization of multiple-layered populations of animals cells". *J Cell Biol* 27: 273-279, 1965.
- (5) Bard, J. y Elsdale, T. "Specific growth regulation in early subcultures of human diploid fibroblasts". En *Ciba Symposium on Growth Control in Cell Cultures*; págs. 187-197, 1971.

A new system for cell cultivation in perfused layered cultures: I. Design and operating principles (Summary)

The design and operating principles of a new system for cultivating cells in perfused layered cultures are described. The culture vessel consists of plates of growth surface material arranged within a sealed container provided with suitable connection ports. Design flexibility permits construction of vessels that differ greatly in growth surface area, capacity, and other specific features. In this apparatus, cells

are adsorbed on the growth surfaces and nourished by a flow of growth medium that has a controlled rate of flow, gas tension, and pH.

Application of this system to research work and production of virus vaccines is now being investigated and will be reported upon at a later date.

Estabelecimento de um novo sistema de cultura de células em capas perfundidas. I. Projeto e princípios operacionais (Resumo)

Descrevem-se o projeto e os princípios operacionais de um novo sistema de proliferação de células em capas perfundidas. As placas de cultura consistem em lâminas de material, providas de superfície de proliferação; tais placas são colocadas em recipiente hermeticamente fechado, munidos de orifícios de conexão apropriados. A flexibilidade do projeto permite a fabricação de placas de diferentes

superfícies de proliferação, capacidades e outras características. Nesse processo, as células são absorvidas pela superfície e alimentadas com um fluxo de meio de cultura, cuja velocidade, tensão gasosa e pH são controlados.

A utilização desse sistema nos trabalhos de pesquisa e na produção de vacinas de vírus é ainda objeto de estudo e posteriormente serão prestadas informações sobre o assunto.

Mise au point d'un nouveau système de culture de cellules en couches perfusées. I. Type et mode d'opération (Résumé)

L'auteur décrit le type et le mode d'opération d'un nouveau système destiné à la culture de cellules en couches perfusées. Les réci-

pients consistent en plaques de matière de culture en surface placées dans un récipient hermétiquement fermé et pourvu d'orifices de

raccord appropriés. L'adaptabilité de ce système permet la fabrication de récipients qui peuvent varier largement en ce qui concerne la surface de culture, la capacité et autres caractéristiques. Avec cette méthode, les cellules sont adsorbées par les surfaces de culture et alimentées par un écoulement du milieu de

culture à une vitesse, une tension gazeuse et un pH contrôlés.

L'application de ce système aux travaux de recherche et la production de vaccins viraux font actuellement l'objet d'études dont les résultats seront communiqués ultérieurement.

