

INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR

El cultivo de tejidos ha sido considerado durante mucho tiempo como una **mezcla de ciencia y arte**. Inicialmente fue considerada como una técnica particularmente difícil de aprender. Sin embargo, hoy en día estas dificultades están superadas gracias a factores como los medios de composición definida, la disponibilidad de antibióticos, las instalaciones asépticas (salas de cultivo limpias, cabinas de flujo laminar, incubadores estériles, etc), dispositivos de cultivo (botellas con tapones filtrantes, placas de Petri ventiladas, etc).

1.- Introducción histórica

El cultivo de tejidos se desarrolló **a partir de los últimos años del siglo XIX** como una continuación de las técnicas de la embriología. En el año 1885, Wilhem Roux mantuvo células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. Se considera al zoólogo americano R. G. Harrison como el iniciador de los cultivos de tejidos animales. En 1907, Harrison fue el primer científico que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. Pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por expansión a partir del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada.

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era **lograr un medio nutritivo adecuado**. Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.

Burrows y Carrel demostraron que **la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivos**. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.

Rous y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para **disociar las células** de embriones de pollo, estableciendo **el primer cultivo celular**. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en **condiciones de asepsia** que aún hoy día se utilizan.

En 1913 Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años. Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado **frasco de Carrel**.

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros **antibióticos**, se desarrollaron numerosas aplicaciones.

En 1948, Earle y col. aislaron células de la **línea celular L** y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo de tejidos. Demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser **alimentada con los nutrientes correctos**.

En 1952, Gry y col. establecen la primera línea celular humana, las **células HeLa**. El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.

En 1954, Rita Levi-Montalcini y col. establecen que el factor de crecimiento nervioso estimula el **crecimiento de los axones en tejidos en cultivo**. Este trabajo supuso el Premio Nobel para Levi-Montalcini en 1986.

En 1955, Eagle realiza la primera investigación sistemática de los **requerimientos nutritivos** de las células en cultivo.

En 1961, Hayflick y Moorhead establecieron que **la duración de los cultivos de fibroblastos era finita**: podían mantener estos cultivos durante 12 pases. No consiguieron establecer líneas estables.

En 1965, Ham introduce **el primer medio definido libre de suero** capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente.

En 1969, Augusti-Tocco y Sato establecen **la primera línea celular estable** de neuroblastoma aislando clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables. Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas.

En 1975, Kohler y Milstein establecen la primera línea celular productora de **anticuerpos monoclonales**. El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nobel.

En la década de 1980 se empiezan a conocer los mecanismos de la transformación.

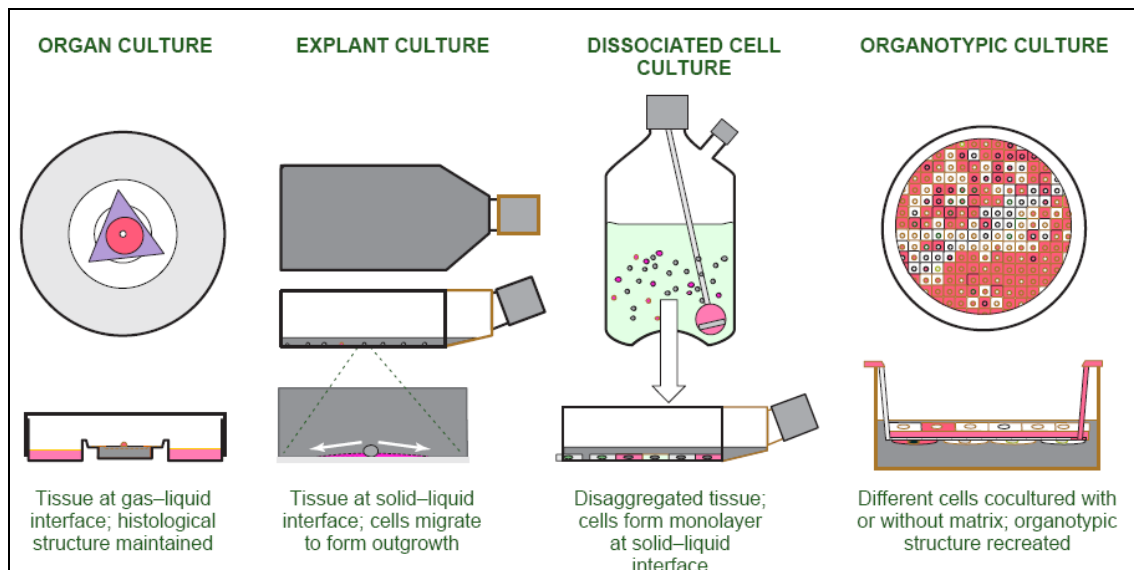
En la década de 1990 empezaron a producirse medicamentos a escala industrial en biorreactores. Se desarrolla la biotecnología.

En 1998 se produce cartílago mediante ingeniería de tejidos y en 2003 se experimenta el auge de esta nueva disciplina.

En 2007 se reprograman células adultas para convertirlas en células pluripotenciales inducidas.

2.- Tipos de cultivo celular

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el **mantenimiento de las células 'in vitro'**, **manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas**. Se distinguen **cuatro tipos de cultivo celular**.



2.1.- Cultivo de órganos

Se coloca el órgano sobre una rejilla situada en la interfase líquido-gas de un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos. Este tipo de cultivo permite mantener, al menos en parte, la **arquitectura** característica del tejido "*in vivo*". Se conservan las interacciones histológicas y, gracias a ello, este tipo de cultivo permite **mantener los tipos celulares diferenciados**, por lo que representan una buena réplica del tejido de origen. Sin embargo, **no crecen mucho** (la proliferación celular se limita a las células embrionarias de la periferia) y **no se pueden propagar**. Se necesita un nuevo explante para cada experimento lo que supone mucho más trabajo y una limitada reproducibilidad de la muestra. Cuantificar es difícil y la cantidad de material que se puede cultivar es reducida.

2.2- Explantes primarios

Se coloca un **fragmento de tejido o de órgano** en la interfase sólido-líquido de un soporte de vidrio o de plástico. Las células se adhieren a la superficie y **las células de la periferia del explante pueden migrar y proliferar** por la superficie del soporte.

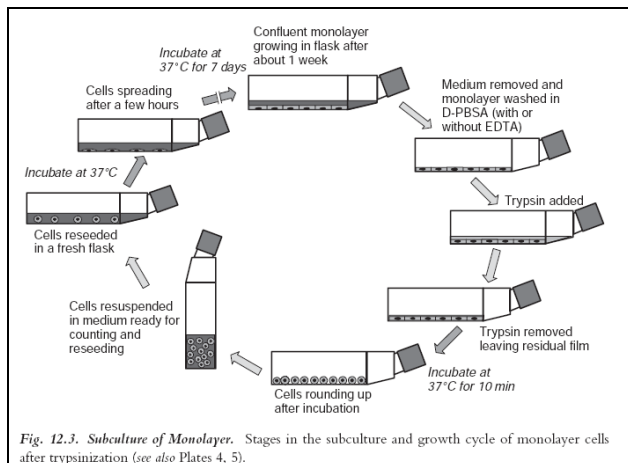
2.3.- Cultivo celular primario

Es el tipo de cultivo más utilizado. Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La **disgregación celular** se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de **proliferar** y la población celular crece notablemente. 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. Por eso, al cabo de un tiempo hay que transplantar las células a un nuevo soporte. Esta operación se denomina **subcultivo** o **pase**.

Existen dos tipos de cultivo celular primario:

- Cultivos en **monocapa**: las células crecen **adheridas sobre un soporte sólido** (plástico o vidrio). El anclaje al sustrato es un prerequisite para la proliferación celular. Es el método utilizado para la mayoría de las células excepto para las hematopoyéticas.
- Cultivos **en suspensión**: las células se encuentran **dispersas en el medio de cultivo**. Su crecimiento no depende del anclaje. Este tipo de cultivo se restringe a las células hematopoyéticas, células madre, líneas celulares transformadas y células tumorales. Alcanzan la confluencia cuando el número de células es grande y los nutrientes son insuficientes.

Monolayer	Suspension
Culture requirements	
Cyclic maintenance	Steady state
Trypsin passage	Dilution
Limited by surface area	Volume (gas exchange)
Growth properties	
Contact inhibition	Homogeneous suspension
Cell interaction	
Diffusion boundary	
Useful for	
Cytology	Bulk production
Mitotic shake-off	Batch harvesting
<i>In situ</i> extractions	
Continuous product harvesting	
Applicable to	
Most cell types, including primaries	Only transformed cells

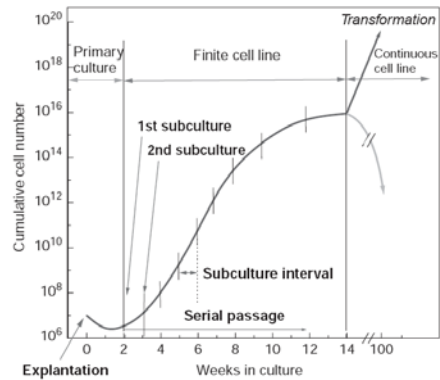
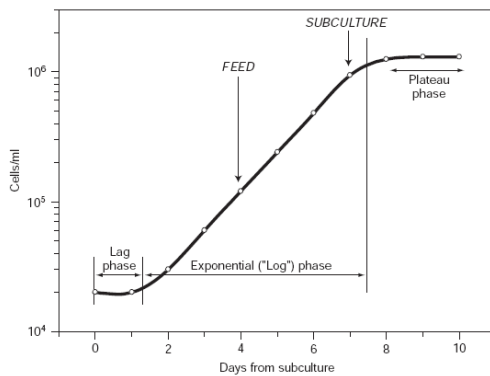


Subcultivos y líneas celulares

Las células del cultivo primario en monocapa se dispersan por métodos enzimáticos y se pasan a un nuevo frasco de cultivo. En el caso de células en suspensión, sencillamente se diluyen en medio fresco. Los sucesivos cultivos así formados se denominan una **línea celular**. La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica que:

- **aumenta el número de células** obtenidas
- **acaban predominando uno o dos tipos celulares**: los que tienen mayor tasa de crecimiento
- la población celular se hace **uniforme y homogénea**
- **sus características se conservan** durante las sucesivas generaciones y, si se conservan en nitrógeno líquido, de forma indefinida

Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar 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 (supuestamente por el acortamiento de los telómeros) y mueren. Sin embargo, algunas células (como las de roedores y las tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a **líneas celulares continuas**, que crecen indefinidamente. Estas células pueden surgir de forma **espontánea** (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o **inducida** (infección vírica o transfección de ADN) y son el resultado de un cambio genotípico denominado **transformación**.



Las células transformadas se caracterizan porque:

- Son **inmortales**: crecen indefinidamente
- Su **crecimiento es aberrante**: se pierde la inhibición por contacto, la limitación de la densidad celular durante la proliferación y la dependencia del anclaje
- Son **malignas**: invaden tejidos y dan lugar al crecimiento de tumores
- Son **genéticamente inestables**: son heteroploides (varía el número de cromosomas) y presentan aberraciones cromosómicas

En 1952 se obtuvo la primera línea celular continua humana. Son las denominadas **células HeLa**, células extraídas a partir de un tumor de cuello del útero de una paciente afroamericana que se llamaba Henrietta Lacks.

2.4.- Cultivos histotípicos y organotípicos

Los **cultivos histotípicos** son cultivos de **un solo tipo celular** que consigue alcanzar una **elevada densidad** celular (tal y como ocurre en los tejidos). Los **cultivos organotípicos** constan de **varios tipos celulares** que interactúan entre sí de una forma que intenta parecerse lo más posible a la original. El objetivo final de este tipo de cultivos es 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 nueva disciplina denominada **ingeniería de tejidos**.

Category	Organ culture	Explant	Cell culture	Organotypic culture
Source	Embryonic organs, adult tissue fragments	Tissue fragments	Disaggregated tissue, primary culture, propagated cell line	Primary culture or cell lines
Effort	High	Moderate	Low	Moderate
Characterization	Easy, by histology	Cytology and markers	Biochemical, molecular, immunological, and cytological assays	Histology, confocal microscopy, or MRI
Histology	Informative	Difficult	Not applicable	Informative
Biochemical differentiation	Possible	Heterogeneous	Lost, but may be reinduced	Often re-expressed
Propagation	Not possible	Possible from outgrowth	Standard procedure	Only after dissociation
Replicate sampling, reproducibility, homogeneity	High intersample variation	High intersample variation	Low intersample variation	Low intersample variation
Quantitation	Difficult	Difficult	Easy; many techniques available	May require image analysis

3.- Biología de las células en cultivo

Al establecer un cultivo celular **se seleccionan las células** que van a crecer en función de numerosos criterios: sólo formarán parte del cultivo aquellas células que sean capaces de superar el proceso de disgregación, de adherirse al sustrato y de proliferar (bien en forma de monocapa, bien en suspensión).

El **crecimiento en monocapa** significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma inician la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir, no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras.

El **crecimiento en suspensión** es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato porque son independientes del anclaje. Es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores. Es de destacar que en todo tejido existe una fracción o tipo celular que es capaz de crecer en suspensión. A pesar de que su origen no está claro se cree que se trata de células madre ("*stem cells*") indiferenciadas.

Cuando crecen en cultivo se establece una nueva selección: **aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento**. Así pues, hay que considerar al cultivo como un **ente dinámico** en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a que estén sometidos. En general, cuando se alcanza la confluencia, las células detienen su crecimiento, aunque pueden existir tipos celulares neoplásicos que siguen duplicándose hasta desplazar a los otros tipos celulares del cultivo.

Al alcanzar la **confluencia** es cuando muchas líneas celulares **expresan sus aspectos más característicos**. Es en este estado cuando su morfología y fisiología son **más parecidas a su estado original**. Es también el momento en el que **se detiene el crecimiento** y se hace necesario dividir, replaquear o propagar las células.

A partir del tercer replaqueo, **el cultivo se estabiliza y homogeneiza**: el tipo celular de mayor tasa de crecimiento ha ocupado completamente el cultivo, desplazando a los otros tipos celulares. En general, si no se establecen condiciones selectivas, las células del tejido conjuntivo (especialmente los fibroblastos) serán las seleccionadas. Para evitar que las células más especializadas del cultivo se vean desplazadas de éste por los fibroblastos o por otras células de rápido crecimiento se han establecido protocolos detallados de medios selectivos.

En los cultivos primarios, las células crecen durante un **cierto número de pases** que depende, sobre todo, del tipo celular y de las condiciones de cultivo. Así, los hepatocitos de adultos sólo se mantienen como cultivo primario, las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) permanecen en cultivo de 3 a 9 pases y los fibroblastos dérmicos humanos pueden superar los 20 pases. Sin embargo, al final todas ellas entran en una **fase de senescencia** en la que se acumulan numerosas anomalías y se pierden las funciones especializadas, lo que conduce a la **muerte** del cultivo.

Sólo ocasionalmente puede mantenerse un cultivo primario durante más generaciones de las esperadas. Ello es debido a la aparición en el cultivo de células inmortales. Estas células forman **líneas estables** o cultivos celulares permanentes. En la mayoría de los casos se desconoce la razón de la aparición de **células inmortales** pero se ve favorecida por infecciones virales y por tratamientos con mutágenos, lo que podría estar relacionado con la **pérdida, espontánea o inducida, de las vías de control de la división celular**. La capacidad de un cultivo celular primario para establecerse como línea estable está relacionada directamente con su variabilidad genética. Las líneas celulares que nunca se establecen como estables se mantienen euploides, como es el caso de fibroblastos humanos, fibroblastos de pollo y la glia humana. Las líneas que, con frecuencia, se convierten en aneuploides son las que suelen transformarse en líneas celulares estables, como es el caso de las células epidérmicas. En general, una línea celular estable será tanto más fácil de establecer o cultivar cuanto más indiferenciada esté, con las excepciones de las líneas tumorales de células diferenciadas.

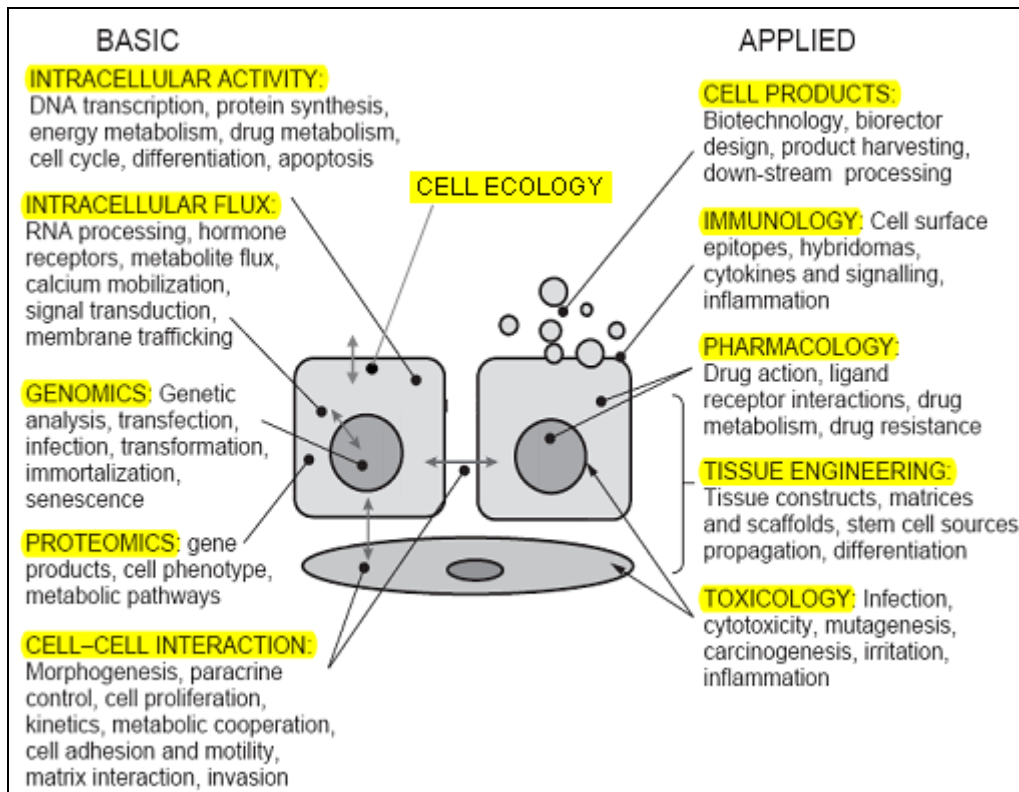
Los cultivos primarios de muchos tipos celulares son posibles porque las células **pierden algunas de sus propiedades diferenciadas**, entre ellas la incapacidad de dividirse. Esta pérdida de algunas de sus propiedades características puede deberse a desdiferenciación o a desadaptación. La **desdiferenciación** implica una pérdida **irreversible** de una propiedad diferencial del tipo celular. Por ejemplo, un hepatocito en cultivo puede perder algunas enzimas (como la arginasa o las aminotransferasas), o ser incapaz de almacenar glucógeno o de sintetizar las proteínas del suero. En la **desadaptación**, la pérdida no es irreversible ya que se debe a la ausencia de algún tipo de señal (hormonal, nerviosa, etc.) y que basta con recuperar esa señal para que la característica se vuelva a expresar. Por ejemplo, cuando crecen sobre una matriz de colágeno, los hepatocitos de rata pueden volver a expresar la enzima tirosina aminotransferasa en presencia de ciertas hormonas (insulina e hidrocortisona).

4.- Aplicaciones del cultivo celular

Los cultivos celulares se utilizan tanto en la investigación básica como en la aplicada. En la **investigación básica**, permiten estudiar fenómenos complejos como, por ejemplo:

- **la actividad intracelular:** transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, ciclo celular, diferenciación, apoptosis, etc.
- **el flujo intracelular de biomoléculas:** procesamiento del ARN, el movimiento del ARN desde el núcleo hacia el citoplasma, el movimiento de las proteínas hacia diversos orgánulos, el ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos, etc.
- **genómica y proteómica:** análisis genético, infección, transformación celular, immortalización, senescencia, expresión génica, rutas metabólicas, etc.
- **ecología celular:** el estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular y de su diferenciación, el estudio de las necesidades nutricionales, la cinética de la población celular, etc.

- **las interacciones celulares:** morfogénesis, proliferación celular, adhesión celular, interacciones con la matriz, invasión celular, etc.



En la **investigación aplicada**, las técnicas de cultivo celular utilizan en áreas tan diversas como:

- **Virología:** Cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas, etc.
- **Biología:** producción industrial de fármacos en biorreactores (interferón, insulina, hormona de crecimiento, etc.)
- **Inmunología.** Producción de anticuerpos monoclonales, señalización, fenómenos de inflamación.
- **Farmacología:** Efecto de diversos fármacos, interacciones con el receptor, fenómenos de resistencia, etc.
- **Ingeniería de tejidos.** Producción de tejidos artificiales (piel, cartílagos) para el tratamiento de grandes quemados, injertos o autotransplantes, desdiferenciación y diferenciación inducida, etc.
- **Toxicología:** citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis, etc.

5.- Ventajas e inconvenientes de los cultivos celulares

Como **ventajas** podemos citar:

a) Permiten un control preciso y fino del medio ambiente

En un cultivo se pueden controlar las condiciones físico-químicas (pH, temperatura, presión osmótica, presión parcial de O₂ y CO₂), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.). Para algunas líneas celulares se han establecido **medios definidos**. Un medio definido es aquél en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman y su concentración exacta. Para establecer un medio definido hay que conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Sin embargo en el caso de muchas líneas celulares, estas necesidades no se conocen. En estos casos se utilizan medios que se suplementan con disoluciones complejas (suero, extractos de embrión, etc.) que contienen factores hormonales y nutritivos imprescindibles para el cultivo pero cuya naturaleza se desconoce.

b) Caracterización y homogeneidad de la muestra

Una muestra de tejido es siempre heterogénea. Sin embargo, al cabo de uno o dos pases, las líneas celulares cultivadas son **homogéneas**, es decir, su morfología y su composición son uniformes. La presión selectiva de las condiciones de cultivo da lugar a un cultivo homogéneo del tipo celular más vigoroso. A partir de ese momento se pueden obtener réplicas idénticas en cada subcultivo y las características de la línea celular se conservan durante varias generaciones o de forma indefinida si la línea celular se conserva en nitrógeno líquido. Esto facilita mucho el tratamiento estadístico de los resultados.

c) Economía

En los cultivos celulares se emplean disoluciones con una **concentración mucho menor** que en el caso del animal completo. Además, se garantiza el **acceso directo** de la sustancia a las células **sin que se diluya** y **sin que sufra ningún tipo de modificación metabólica**. El coste de los ensayos clínicos se reduce considerablemente y se puede hacer un mayor número de pruebas. También se reducen los costes relacionados con la fabricación del posible nuevo medicamento: en lugar de fabricar cantidades del orden del gramo (para el estudio en animales) basta con que se sinteticen unos pocos miligramos.

d) Cuestiones éticas

La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo '*in vivo*' pero es una alternativa válida en muchas situaciones. Para obtener un cultivo celular primario es posible que haya que sacrificar algún animal, pero con ellos se pueden ensayar un elevado número de condiciones experimentales que, en otras circunstancias, supondrían el sacrificio de decenas o cientos de animales de experimentación.

TABLE 1.2. Advantages of Tissue Culture

Category	Advantages
Physicochemical environment	Control of pH, temperature, osmolality, dissolved gases
Physiological conditions	Control of hormone & nutrient concentrations
Microenvironment	Regulation of matrix, cell-cell interaction, gaseous diffusion
Cell line homogeneity	Availability of selective media; cell cloning
Characterization	Easily performed cytology, DNA profiling, immunostaining
Preservation	Stocks stored in liquid nitrogen
Validation & accreditation	Origin, history, purity authenticated and recorded
Replicates and variability	Easy quantitation and minimal statistical analysis
Reagent saving	Reduced volumes, direct access to cells, lower cost
Control of $C \times T$	Ability to define dose, concentration, time
Mechanization	Available with microtitration and robotics
Scale	Number of replicates can be increased substantially
Time saving	Assay time reduced, at least, by an order of magnitude
Reduction of animal use	Cytotoxicity & screening of pharmaceuticals, cosmetics, etc.

Los cultivos celulares también pueden suponer algunas **desventajas**:

a) Técnica sensible

El **crecimiento** de las células animales se tiene que realizar en **estrictas condiciones de asepsia** porque su crecimiento es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas, etc.). Además, las células animales son incapaces de mantenerse vivas en ausencia de la compleja mezcla de nutrientes presente en el plasma o en el fluido intersticial. Todo esto condiciona en gran medida el instrumental requerido y el grado de preparación del personal encargado de los cultivos.

b) Cantidad y coste

Producir 1 gramo de células en cultivo cuesta 10 veces menos que obtenerlas a partir del tejido de un animal. En un laboratorio normal se pueden conseguir hasta 10 gramos de células sin que se resienta mucho el presupuesto de investigación. Para producir hasta 100 gramos de células hay que incrementar tanto el instrumental como el personal. Para producir cantidades mayores se necesitan instalaciones de tipo industrial.

c) Inestabilidad

Muchas líneas celulares continuas son inestables y adoptan una **dotación cromosómica aneuploide**, lo que afecta tanto a su velocidad de crecimiento como a su capacidad para diferenciarse. Es posible, por tanto, encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que se resiembran cada determinado tiempo o después de un determinado número de generaciones a partir de un stock congelado.

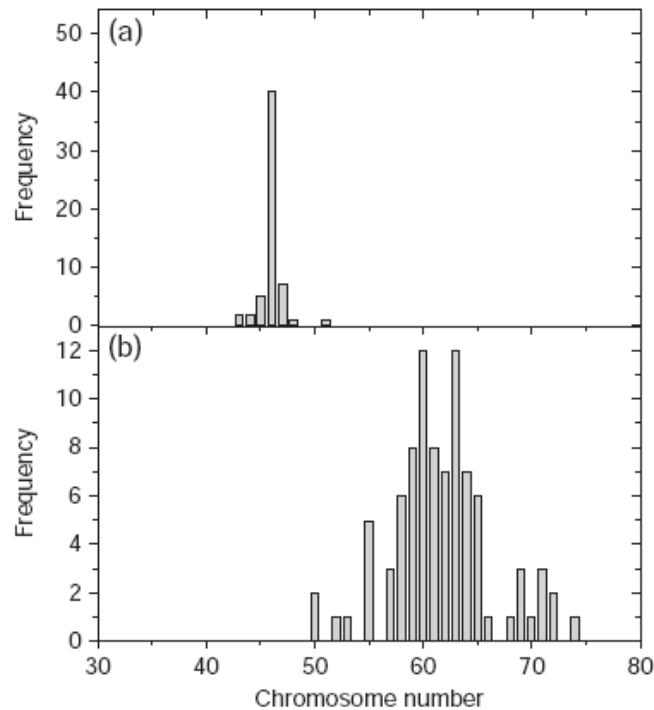


Fig. 2.10. Chromosome Numbers of Finite and Continuous Cell Lines. (a) A normal human glial cell line. (b) A continuous cell line from human metastatic melanoma.

d) Desdiferenciación e identificación de las células

Al propagarse la línea celular, las células **pierden las características fenotípicas** propias del tejido de procedencia. Este fenómeno se denomina desdiferenciación y, entre otras, cosas se hacen móviles e inician su proliferación. La relación entre las células cultivadas y las células originales del tejido puede perderse. En este caso **se necesitan marcadores estables que permitan identificar la procedencia de las células**. En algunos casos es posible revertir la desdiferenciación, bien por medio de hormonas, bien mediante compuestos químicos (ésteres de forbol), pero no está claro si el estado rediferenciado es equivalente al estado de diferenciación “*in vivo*”.

e) Validez del modelo '*in vitro*'

En realidad, un cultivo celular es un disgregado celular de un tejido y se diferencia de éste en que:

- **se ha perdido la organización espacial tridimensional** propia del tejido ya que éstas se propagan en dos dimensiones.
- **se han perdido las interacciones** entre los distintos tipos celulares y entre las células y la matriz extracelular. Además, al formarse una línea celular sólo se conservan uno o dos tipos celulares (los que proliferan a mayor velocidad).
- **carece de los componentes sistémicos implicados en la regulación** de la homeostasis “*in vivo*”, especialmente los sistemas nervioso y endocrino.

- La **presión parcial de O₂ es reducida**, ya que no hay un transportador de oxígeno como la hemoglobina. Por tanto, la energía se obtiene principalmente a través de la glicolisis, ya que el ciclo de Krebs juega un papel muy reducido.

Por tanto, hemos de ser precavidos en cuanto a la validez de los resultados obtenidos “*in vitro*” porque pueden diferir de lo que pueda observarse “*in vivo*”.

Category	Examples
Necessary expertise	Sterile handling Avoidance of chemical contamination Detection of microbial contamination Awareness and detection of mis-identification
Environmental control	Isolation and cleanliness of workplace Incubation, pH control Containment and disposal of biohazards
Quantity and cost	Capital equipment for scale-up Medium, serum Disposable plastics
Genetic instability Phenotypic instability	Heterogeneity, variability Dedifferentiation Adaptation Selective overgrowth
Identification of cell type	Markers not always expressed Histology difficult to recreate and atypical Geometry and microenvironment changes cytology