

Mantenimiento de líneas celulares de animales poiquiloterms

Julio M. Coll

Departamento de Sanidad Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Embajadores 68, 28012 Madrid

Las líneas celulares de animales poiquiloterms se utilizan para diagnóstico viral, producción de virus, diagnóstico toxicológico e investigación. El mantenimiento de stocks de estas líneas se hace a temperaturas de 4-14°C, temperaturas que están por debajo de las temperaturas óptimas de crecimiento (20-28°C). Este procedimiento añade una gran versatilidad y facilidad en el manejo de las líneas. Quizá un método análogo pueda aplicarse también a otras líneas celulares más utilizadas en clínica y cuyo crecimiento óptimo es a 37°C.

Líneas celulares

Se mantienen y producen, actualmente, 4 líneas de peces descritas en la literatura. Las líneas obtenidas de epitelio de carpa (EPC), y de fibroblastos de "Bluegill" (BF) son de temperaturas templadas (26-28°C) con un tiempo de replicación de 1-2 días. Las otras dos líneas se obtuvieron de embrión de salmón del Pacífico (CHSE) y de ovario de trucha arco iris (RTG-2) y son de temperaturas más frías (20°C) con un tiempo de replicación de unos 4 días.

Estas líneas de animales poiquiloterms tienen la capacidad de alargar su ciclo de replicación al disminuir la temperatura sin alteración de su viabilidad. Así las EPC y la BF pueden guardarse a 14°C y las CHSE y RTG-2 pueden guardarse hasta a 4°C, en ambos casos durante meses y sin apenas alteración de su viabilidad.

El hecho de cultivar las células a una temperatura menor de 37°C hace que las contaminaciones de bacterias, hongos o levaduras no sean muy frecuentes y si aparecen puedan combatirse fácilmente con gentamicina (25-50 µg/ml) o fungizona (2.5 µg/ml).

Medios e infraestructura

Son los tradicionales en cultivos celulares, excepto los incubadores de baja temperatura.

En el servicio se emplean dos medios: el RPMI y el MEM. Todas las líneas parecen adaptarse bien a los dos medios excepto la RTG-2

que solo crece bien en MEM. Los investigadores utilizan alícuotas congeladas de L-glutamina, piruvato, gentamicina, fungizona, tripsina y suero comunes; pero cada uno utiliza sus propios medios de cultivo para evitar contaminaciones cruzadas.

Las cabinas, incubadores de baja temperatura y salas de cultivo celular se formolizan durante 48 horas con formol al 20%, trimestralmente. Otras medidas anticontaminación son el uso de la luz ultravioleta en cabinas y salas de cultivo, aire filtrado y presión positiva, limpieza-desinfección periódica y utilización de antibióticos-antimicóticos en los medios solo cuando se hacen experimentos pero no durante el mantenimiento.

Los stocks de material estéril y los medios incompletos están a cargo de una persona, que a su vez lleva el control de la reserva de células congeladas y los stocks a baja temperatura.

Funcionamiento

El sistema funciona en tres escalones: la reserva de células congeladas en dos contenedores independientes de nitrógeno líquido, las células en crecimiento y los stocks a 14 y 4°C. Para congelar las líneas se utilizan densidades de 3-5x10⁶ células/ml, previamente analizadas para detectar la presencia de micoplasmas. Los stocks a baja temperatura consisten en botellas de 75ml para subcultivo y en placas de 24 y de 96 pocillos para uso. El uso que

se da a estas líneas celulares cae dentro de uno de estos 4 apartados: diagnóstico viral, producción de virus, diagnóstico toxicológico o investigación. Cuando se requiere una determinada línea, se pasan del stock de baja temperatura a la temperatura óptima de crecimiento y de ahí a su destino final.

Conclusión

El método de guardar stocks a una temperatura por debajo de la temperatura óptima de crecimiento se aplicó a mielomas de ratón x63/Ag 8.653 (temperatura óptima 37°C). La viabilidad disminuía rápidamente a 4°C en una semana. Sin embargo, están en experimentación temperaturas intermedias con las que podrían obtenerse una mayor viabilidad. Es posible que cada línea celular tenga un óptimo de "temperatura-stock", que existan ciertas líneas de animales no poiquiloterms que puedan guardarse a bajas temperaturas, o que no existan. La versatilidad y facilidad en el manejo que se obtendría de ser cierta esta posibilidad, hacen atractivo el experimento.

Referencias

- Adolfo, Z.R. and Coll, J.M. (1988) "Cloning of myelomas and hybridomas in fibrin clots". J. Immunol. Methods, 114: 213-217.
- Basurco, B. y Coll, J.M. (1989) "Variabilidad del virus de la septicemia hemorrágica viral de la trucha". Med. Vet. 8, 425-430.
- Coll, J.M. (1989) "Formación de los glóbulos rojos de la sangre". Mundo Científico, 9: 300-307.
- Coll, J.M. and Ingram, V.M. (1978) "Stimulation of heme accumulation and erythroid colony formation in cultures of chick bone marrow cells by chicken plasma". L. Cell Biol., 78: 184-190.
- Iturralde, M.N. y Coll, J.M. (1984) "Cultivo de células animales". Med. Clin., 82: 273-280.

Agenda



★ 29-31 AGOSTO: "Second International Conference on the release of Genetically Engineering Micro-organisms". Nottingham (U.K.). * Meetings Secretary, Society for General Microbiology, 62 London Road, Reading RG1 5AS (U.K.).

★ SEPTIEMBRE: "Molecular Biology And Biochemistry of Archaeobacteria". Sicilia (Italia). * Dr. P. Cammarano, Dept. di Biopartologia Umana, Sezione di Biologia Cellulare, University di Roma, Policlinico Umberto I, Viale Regina Elena 324, 00161 Roma (Italia).

★ 2-7 SEPTIEMBRE: "7th European Conference on Cell and Molecular Biology of Ciliates". Toledo. *Rosario Gil. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Velázquez 144. 28005 Madrid.

★ 4-5 SEPTIEMBRE: "Symposium Anual de la Sociedad de Bioquímica: Bioquímica y Biotecnología de Archaeobacterias. Edinburgo (U.K.). *The Meeting Officers. The Biochemical Society. 59 Portland Place. London. W1N 3AJ.

★ 9-11 SEPTIEMBRE: "5th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases". Oslo (Noruega). * 5th ECCMID, Congress Conference, POB 7609 Skillebekk, N-0205 Oslo 2, (Norway). Tel.: 472 56 19 30.

★ 9-13 SEPTIEMBRE: "IX International Symposium Biohydrometallurgy 91". Troia (Portugal). *Dr. J.C. Duarte. Lneti. Queluz de Baixo, 2745 Queluz (Portugal).

★ 10-12 SEPTIEMBRE: "Conference on Microbiology in the Oil Industry and Lubrication". Budapest (Hungria). *Hungarian Chemical Society, H-1061 Budapest, Anker Koz 1 (Hungria). Tel.: (36) 1 142 7343.

Noticias de compañías



□ **Florigene** (Holanda), ha recibido la aprobación del Ministerio Holandés de Protección Ambiental para realizar las pruebas de campo de un crisantemo transgénico con diferente color. Florigene colabora con **DNA Plant Technology** y la Universidad Libre de Amsterdam en este proyecto, en el que mediante el bloqueo genético del pigmento de la flor del crisantemo se obtienen flores blancas en vez de rosas.

□ **Ajinomoto** pretende comenzar las pruebas clínicas de su interleuquina-6 recombinante este mismo año.

□ El bioinsecticida *Cutlass* de

Ecogen ha sido aprobado por el Departamento de Alimentos y Agricultura del Estado de California, convirtiéndose así en el primer producto alterado genéticamente que se aprueba como insecticida.

□ La Agencia de Meteorología y Protección Ambiental de Arabia Saudita ha elegido a la compañía **Environmental Remediation Inc.** para disolver el petróleo liberado en la aguas del Golfo Pérsico durante la reciente guerra. **Environmental** está preparando en la actualidad los protocolos de utilización de sus productos para adaptarlos específicamente a la problemática de la zona del Golfo.

PUBLICIDAD EN BIOTECNOLOGIA

Blanco y Negro

1 página	50.000 pts + 12 % IVA
1/2 página	35.000 pts + 12 % IVA
1/3 página	25.000 pts + 12 % IVA
1/4 página	20.000 pts + 12 % IVA

2 números consecutivos: 15% descuento

6 números consecutivos: 30% descuento

Color (1 página)

6 números	310.000 pts + 12% IVA
-----------	-----------------------

En contraportada se aumentará la tarifa en un 20%