

LA COLECCIÓN DE LINEAS CELULARES DEL LABORATORIO CONMEMORATIVO GORGAS*

Lic. Gladys Oro**

Se describe la colección de líneas celulares del Laboratorio Conmemorativo Gorgas (LCG). Iniciada hace 22 años, la colección consta de más de 40 líneas celulares, originadas de 15 especies diferentes y preservadas en nitrógeno líquido.

Gracias a los avances obtenidos en las últimas dos décadas, el cultivo de tejido o el cultivo de células se ha convertido en un instrumento valioso de ayuda en diversas áreas de las ciencias biomédicas, tales como en Citología, Histología, Embriología, Fisiología Celular, Patología, Bacteriología, Inmunología, Parasitología, Virología y Oncología. Además tiene una gran aplicación en la agricultura y en la producción de vacunas, tanto de uso veterinario como de uso humano.

Las técnicas de cultivo de tejido han permitido el crecimiento de células "in vitro". Los cultivos de células o de

tejidos tomados directamente de un organismo se denominan cultivos primarios. El subcultivo de un cultivo primario se denomina línea celular. Si esa línea puede ser subcultivada indefinidamente se dice que es una línea continua.

A medida que ha ido aumentando el número de líneas celulares y la utilización de las mismas en las diferentes áreas biomédicas se ha hecho necesaria la preservación de las células, a bajas temperaturas, por medio de técnicas de congelación. Este procedimiento permite mantener una reserva de líneas celulares en varias etapas de su desarrollo antes de que hayan perdido propiedades deseables o que hayan adquirido propiedades indeseables, a través de crisis o de "transformaciones". Además, constituye un seguro contra la pérdida de las células, por contaminación o por accidentes de laboratorio; y ahorra tiempo y esfuerzo que, de otra manera,

* Presentado para publicación en mayo de 1984.

** Jefe del Departamento de Cultivo de Tejido del Laboratorio Conmemorativo Gorgas.

habría que invertir para mantener las líneas de células en cultivo durante períodos en los que no se necesitan.

La preservación de las células por congelación es actualmente un procedimiento de rutina (1), en el cual se utilizan agentes crioprotectores como el glicerol (5-10%) o el dimetil sulfóxido (DMSO) (5-15%) y el suero sanguíneo a una concentración del 2 al 25% en el medio de congelación. La tecnología moderna nos ha provisto de equipo sofisticado, con controles de temperatura para la congelación de las células, que están por su costo fuera del alcance de los laboratorios pequeños. Afortunadamente, existe una variedad de métodos, menos costosos y técnicamente fáciles, que pueden ser utilizados rutinariamente para congelar las líneas celulares (2, 3, 4) y que ofrecen un alto porcentaje de viabilidad celular, aún después de varios años de almacenamiento.

Un ejemplo muy ilustrativo es el método que hemos estado utilizando en el Departamento de Cultivo de Tejido del LCG y con el cual hemos logrado resultados excelentes, porque en nuestra colección existen células congeladas desde hace más de 20 años que todavía conservan un alto porcentaje de viabilidad ($\geq 70\%$). Básicamente, la técnica que usamos consiste en:

1. Preparar una suspensión de células ($\geq 2 \times 10^6$ células/ml) en un medio de crecimiento al que se le ha adicionado 10% de glicerol o DMSO y 20% de suero fetal bovino.
2. Distribuir la suspensión en alícuotas de 1 ml en ampollas que posteriormente son selladas con una antorcha de propano y colocadas en un vaso de polistireno, con una cubierta del mismo material fijada con cinta engomada.
3. Se coloca el recipiente de polistireno en la parte superior de un refrigerador para nitrógeno líquido, en donde el vapor que se forma sobre el nitrógeno líquido congela gradualmente las ampollas. Dos días después, se sumergen las ampollas en el nitrógeno. Una alternativa es la colocación del recipiente con ampollas en un congelador (-70°C) y su inmersión directa al día siguiente en nitrógeno líquido.

La recuperación de las células se logra transfiriendo la ampolla del nitrógeno líquido directamente a un baño de María (37° a 45°C), con agitación constante hasta que se haya descongelado; y luego se pasa el contenido de la ampolla a una botella con medio de crecimiento, para el cultivo de las células. Es aconsejable practicar un cambio de medio al día siguiente, para remover el agente criopreservativo.

Si se ha usado DMSO es preferible removerlo inmediatamente por centrifugación (a 800 rpm, durante 10 min) o tan pronto como las células se hayan adherido a la superficie de la botella.

La captación de células del LCG se inició en 1962 en el Laboratorio Middle América Research Unit (MARU) ubicado en Ancón, Panamá, con la obtención de 6 líneas celulares continuas, que fueron importadas de los Estados Unidos. Dicha colección se ha ido aumentando gradualmente, a través de los años, hasta incluir líneas celulares tanto de origen vertebrado como de origen invertebrado. Actualmente cons-

ta de más de 40 líneas celulares, derivadas de 15 especies diferentes aproximadamente, e incluye líneas originadas en nuestro propio laboratorio. Esta colección consiste de 1550 ampollas aproximadamente, preservadas en nitrógeno líquido (-196° C) y ha suministrado células a laboratorios en Panamá, Norte, Centro y Sur América, así como en Europa.

El Cuadro No. 1 presenta las diferentes líneas celulares que integran esta colección, el organismo y el tejido de origen, y algunos ejemplos de las múltiples aplicaciones que tienen estas células (5 a 13).

CUADRO No. 1

LINEAS CELULARES PRESERVADAS EN NITRÓGENO LIQUIDO
EN EL LABORATORIO CONMEMORATIVO GORGAS

LINEA CELULAR	ORIGEN	APLICACION
MA-111	CONEJO, RIÑON	ESTUDIOS CON LOS VIRUS DE RUBEOLA, HERPES Y VACCINIA
LLC-RKI	CONEJO, RIÑON	ESTUDIOS CON LOS VIRUS DE RUBEOLA, HERPES Y VACCINIA
BHK-21	"HAMSTER", RIÑON	APTOSA, RABIA Y ARBOVIRUS
Y-1	RATON, TUMOR ADRENAL	HERPES SIMPLEX, VACCINIA, PSEUDORABIA Y ESTOMATITIS VESICULAR (INDIANA)
L-M	RATON, TEJIDO CONECTIVO	VIRUS DE VACCINIA
L-F	RATON, FIBROBLASTOS	ARBOVIRUS
L1210	RATON, LEUCEMIA	ESTUDIOS EN LEUCEMIA E INMUNOLOGIA TUMORAL
MC COY	RATON	CLAMIDIA

LINEA CELULAR	ORIGEN	APLICACION
S-180	RATON, SARCOMA	QUIMIOTERAPIA DE CANCER
PK-15	CERDO, RIÑON	COLERA PORCINA, AFTOSA, EXANTEMA VESICULAR DE VIRUS PORCINO, FIEBRE PORCINA AFRICANA, SUSCEPTIBLE A ESTOMATITIS VESICULAR (INDIANA), VACCINIA, REOVIRUS, ADENOVIRUS COXSACKIE, VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE
MDCK (NBL-2)	PERRO, RIÑON	ESTOMATITIS VESICULAR, HEPATITIS INFECCIOSA CANINA, VACCINIA, COXSACKIE, ADENOVIRUS, INFLUENZA
E. DERM	CABALLO, DERMIS	HERPES SIMPLEX, REOVIRUS, VACCINIA, ESTOMATITIS VESICULAR (INDIANA)
FRK	CABALLO, RIÑON PETAL	ARBOVIRUS
GML-CHK-2	MONO PEREZOSO, RIÑON	ARBOVIRUS
FRh-L-5	MONO RHEBUS, PULMON	ARBOVIRUS
LLC-MK2	MONO RHEBUS, RIÑON	ARBOVIRUS
MA-104	MONO RHEBUS, RIÑON EMBRIONARIO	ARBOVIRUS
MA-134	MONO VERDE AFRICANO, RIÑON EMBRIONARIO	ARBOVIRUS
BS-C-1	MONO VERDE AFRICANO RIÑON	POLIO, SV-40, ESTOMATITIS VESICULAR
VERO	MONO VERDE AFRICANO RIÑON	ARBOVIRUS, SV-40, SV-5, SARAMPION, RUBEOLA, POLIO
RU-1	HUMANO, PULMON PETAL	ARBOVIRUS
FT	HUMANO, AMIGDALAS	HERPES, CITOMEGALOVIRUS
WI-38	HUMANO, PULMON EMBRIONARIO	VACUNAS HUMANAS, AISLAMIENTO DE CITOMEGALOVIRUS, RINOVIRUS, SUSCEPTIBLE A POLIO, HERPES SIMPLE, PSEUDORABIA, ESTOMATITIS VESICULAR (INDIANA)
HELA	HUMANO, CANCER CERVICAL	POLIO, ADENOVIRUS
HEP-2 (MARCADORRES HELA)	HUMANO, CANCER LARINGE	ARBOVIRUS, SARAMPION, VIRUS RESPIRATORIOS, ESTUDIOS DE PRODUCCION DE TUMOR EN RATAS, HAMSTER, RATONES, ETC.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	APLICACION
<u>KB</u> (MARCA DORES HE LA)	HUMANO, CANCER ORAL	QUIMIOTERAPIA DE CANCER, TUMORGENICIDAD, ESTU- DIOS VIROLOGICOS
MA-160 (MARCADO- RES HELA)	HUMANO, PROSTATA, HIPERPLASIA BENIGNA	INMUNOLOGIA TUMORAL
33H	HUMANO, MONONUCLEO- SIS INFECCIOSA	ESTUDIOS EN LINFOMAS E IN- MUNOLOGIA TUMORAL
P3J	HUMANO, LINFOMA DE BURKITT	ESTUDIOS EN LINFOMAS E IN- MUNOLOGIA TUMORAL
PIR	HUMANO, LINFOMA DE BURKITT	ESTUDIOS EN LINFOMAS E IN- MUNOLOGIA TUMORAL
RAJI	HUMANO, LINFOMA DE BURKITT	ESTUDIOS EN LINFOMAS E IN- MUNOLOGIA TUMORAL
RPMI-41	HUMANO, SARCOMA OS- TEOGENICO	ESTUDIOS EN INMUNOLOGIA TUMORAL
RPMI-1788	HUMANO, LEUCOCITOS NORMAL	SUSCEPTIBLE A POLIO Y A ESTOMATITIS VESICULAR
RPMI-6410	HUMANO, LEUCEMIA	ESTUDIOS EN LEUCEMIA Y EN INMUNOLOGIA TUMORAL
RPMI-8226	HUMANO, MIELOMA	SUSCEPTIBLE A ESTOMATITIS VESICULAR (INDIANA), HER- PES SIMPLEX Y VACCINIA VI- RUS; ESTUDIOS EN LINFOMAS E INMUNOLOGIA TUMORAL
C3-44	HUMANO, LEUCEMIA (CELULAS T)	ESTUDIOS IN VITRO SOBRE MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES DE TRANSPOR- TACION NEOPLASICA EN CE- LULAS HUMANAS
C10/MJ2	HUMANO, LINFOMA (CELULAS T)	ESTUDIOS SOBRE ETIOLOGIA DE LEUCEMIA Y LINFOMA
C91/PL	HUMANO, LINFOMA DIFUSO, MIXTO	ESTUDIOS IN VITRO SOBRE MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES DE TRANSPOR- TACION NEOPLASICA EN CE- LULAS HUMANAS
<u>AEDES AEGYPTI</u>	MOSQUITO, LARVA	ARBOVIRUS
<u>AEDES ALBOPIC- TUS</u>	MOSQUITO, LARVA	ARBOVIRUS
<u>AEDES ALBOPIC- TUS 36</u>	MOSQUITO, CLONO C6/36 DE <u>AE. ALBO- PICTUS</u> (SINGH'S)	DENGUE, FIEBRE AMARILLA
<u>AEDES PSEUDOS- CUTELLARIS</u>	MOSQUITO, LARVA	ARBOVIRUS (DENGUE, FIE- BRE AMARILLA, ETC)
GML-HE-12	MOSQUITO, HG. <u>EQUINUS</u> LARVA	ARBOVIRUS
P-P-9	FLEBOTOMO, LARVAS	ARBOVIRUS

Debido a que algunas líneas celulares pierden susceptibilidad o cambian su patrón de crecimiento, se ha adoptado la medida de llevar las líneas en cultivo continuo por un máximo de 4 a 5 meses solamente. Al término de este período se retira una nueva ampolla de la reserva congelada en nitrógeno líquido y se pone a crecer en botellas. Generalmente, las células están listas para ser subcultivadas en un período de 7 a 10 días.

Actualmente, el Departamento de Cultivo de Tejido del LCG mantiene 8 líneas celulares en cultivo continuo (Vero, McGoy, FT, GML-CHK-2, GML-HE-12, Hep-2, MDCK y P-P-9) para uso en sus programas de investigación. Entre las últimas adquisiciones se encuentran las líneas de linfocitos C3-44, C10/MJ2 y C91/PL, que fueron obtenidas del Institu-

to Nacional del Cáncer (Bethesda, Maryland) y que actualmente están siendo utilizadas en diferentes laboratorios de investigación en estudios sobre leucemia y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (14, 16).

Nuestro propósito es continuar aumentando esta colección para que sirva como un instrumento básico en la realización de proyectos de investigación científica.

SUMMARY

This paper describes the frozen cell culture collection at the Gorgas Memorial Laboratory. The collection was initiated more than 20 years ago and consists of over 40 different cell lines of 15 different species and a total of more than 1500 ampules preserved in liquid nitrogen.

BIBLIOGRAFIA

1. Shannon JE, Macy, ML: Freezing, storage and recovery of cell stocks and tissue cultures methods and applications, ed por Kruses PF, Patterson Jr MK, New York, Academic Press, 1973, pp 712-718
2. Waymouth C, Varnum DS: Simple freezing procedure for storage in serum-free media of cultured and tumor cells of mouse. Procedure 76165, TCA Manual 1: 311-313, 1976
3. Schroy CB, Todd P: A simple method for freezing and thawing cultured cells. Procedure 76035, TCA Manual 1: 309-310, 1976
4. Bertolini L: Preservation of cells in monolayer culture by freezing in situ. Procedure 76199, TCA Manual 1: 487-488, 1976
5. Pope JH, Horne MK, Wetters EJ: Significance of a complement-fixing antigen associated with herpes-like virus and detected in the Raji cell line. Nature 222: 166-167, 1969
6. Tobita K, Sugiura A, Ecomoto C, Furuyama M: Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. Med Microbiol Immunol 162: 9-14, 1975

7. Rota TR: *Chlamydia trachomatis* in cell culture. II. Susceptibility of seven established mammalian cell types *in vitro*. Adaptation of Trachoma organisms to McCoy and BHK - 21 cells. *In Vitro* 13: 280-292, 1977
8. Lennette EH, Schmidt NJ: *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial infections*, 5a, New York, APHA, 1979, pp. 6570
9. Varma MGR, Pudney M, Leake CJ: Cell lines from larvae of *Aedes (Stegomyia) malayensis* (Colles) and *Aedes (S.) pseudoscutellaris* (Theobald) and their infection with some arboviruses. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 68: 374-382, 1974
10. Deubel V, Digoutte JP: Morphogenesis of yellow fever virus in *Aedes aegypti* cultured cells. I. Isolation of different cellular clones and the study of their susceptibility to infection with the virus. *Am J Trop Med Hyg* 30: 1060-1070, 1981
11. Tesh RB: A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *Am J Trop Med Hyg* 28: 1053-1059, 1979
12. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Vélez M, Oliver A: Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 33: 158-165, 1984
13. Oro G: Establishment of a mosquito cell line from *Haemagogus equinus* larvae. *In Vitro* 20: 153-156, 1984
14. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Surroff M, Miyoshi I, Blayney D, Golde D, Gallo RC: A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218: 571-573, 1982
15. Popovic M, Sarin PS, Robert-Surroff M, Kalyanaraman VS, Mann D, Minowada J, Gallo RC: Isolation and transmission of human retrovirus (Human T-cell leukemia virus). *Science* 219: 856-859, 1983
16. Schupbach J, Sarngadharan MG, Gallo RC: Antigens on HTLV infected cells recognized by leukemia and AIDS sera are related to HTLV viral glycoprotein. *Science* 224: 607-609, 1984