

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, EPIDEMIOLOGIA Y MICROBIOLOGIA

Estudio comparativo de dos métodos para conservar células de línea congeladas en nitrógeno líquido

Por:

Dra. CATALINA DURRUTHY*, Téc. MARGARITA GÓMEZ** y Téc. JOSÉ BELTRÁN***

Durruthy, C. y otros. *Estudio comparativo de dos métodos para conservar células de línea congeladas en nitrógeno líquido*. Rev Cub Med 21: 3, 1982.

Se informa el estudio comparativo de cinco líneas celulares de las más utilizadas en nuestros laboratorios de virología, y que se mantienen almacenadas a -190°C (nitrógeno líquido). El trabajo se realizó en dos etapas. La primera fue el estudio morfológico, por coloración de contraste con hematoxilina-eosina, de las células escogidas para el estudio, las cuales se congelaron a la vez en ampulas divididas, unas con el 10% de glicerina y otras con el 10% de DMSO (dimetil-sulfóxido). En la segunda etapa, después de seis meses de almacenamiento a -190°C , se descongelaron y se volvió a repetir la técnica completa de la primera etapa. Solamente las BSC-1 (riñón de mono Grivet) sufrieron alteraciones morfológicas apreciables, las demás, conservaron su morfología normal característica, al utilizar ambos preservativos.

* Responsable del laboratorio de cultivo de tejidos. Sección de virología, INHEM.

** Técnico del laboratorio de cultivo de tejidos. Sección de virología, INHEM.

*** Técnico de la sección de virología, INHEM.

INTRODUCCION

Los cultivos celulares tienen extrema importancia en nuestros días, ya que por sus características biológicas se están usando como sustrato vivo para el crecimiento de microorganismos, principalmente los virus, y como base para estudios morfológicos, fisiológicos y otros.

Por tal motivo, es necesario almacenar las líneas celulares a bajas temperaturas para evitar el riesgo de perder cepas valiosas por contaminación bacteriana, y también reducir el tiempo y el esfuerzo de mantener a 37°C células que no están en uso continuo.

El dato más antiguo que se conoce es el realizado por *Spallanzani* en 1776, que consistía en utilizar la nieve para congelar el fluido seminal de varios animales.¹

La primera información existente en relación con la conservación de células por congelación aparece en el libro de *Parker*,² donde señala que dichos estudios preliminares comenzaron a principios de siglo. Mucho de lo que se conoce sobre congelación y el mejor tipo de almacenamiento celular a bajas temperaturas, han sido descubiertos empíricamente por varios grupos de investigadores.

De 1949 a 1960, se le denomina el "período del glicerol", pues fue el único uso general en aquel tiempo.

Todos los trabajos de *Polge y Smlth*, luego *Lovelock* y más tarde de *Stulberg et al.*, sobre preservación de células epiteliales y fibroplastos, se realizaron al utilizar la glicerina pura, a distintas concentraciones y medios, como preservativo ideal. En 1962, *Merryman* informa que el DMSO, el dimetil sulfóxido, una sustancia química completamente diferente, resulta ser tan efectiva y en algunos casos mejor que la glicerina.^{3 0}

Todavía hay discrepancias sobre cuál es el mejor preservativo, pero es una realidad factible conservar las células viables durante meses y años, almacenándolas en una cámara fría, especialmente con nitrógeno líquido (-190°C).⁷

Este estudio comparativo tiene como objetivo específico, el conocimiento del comportamiento de los preservativos glicerol y DMSO en nuestros sistemas celulares almacenados a -190°C (nitrógeno líquido) y que se emplean en los estudios virológicos de nuestro departamento, y observar si hay algún cambio morfológico de importancia según el producto utilizado.⁸

MATERIALES Y METODOS

Para este estudio, se escogieron cinco líneas celulares de las que más se emplean en nuestros laboratorios de virología:

Fl: amnios humano normal.

Hela: carcinoma del cuello del útero humano.

BSC-1: Riñón de mono verde africano *Grivet* (*Cercopithecus althiops*) LLC-

MK₂: riñón de mono rhesus (*Macaca mulatta*).

RK 13: riñón de conejo.

El trabajo se realizó en dos etapas, de la manera siguiente:

1. Por cada línea celular, de las descritas anteriormente, se sembraron dos frascos de Roux y dos tubos de Leighton, utilizando como medios de crecimiento Parker (199) o Eagle basal con Parker (199) 1:1, ambos con el 10% de suero de ternero inactivado a 56°C, 30 min. y 100 v/ml de penicilina-estreptomicina. Todo incubado a 37°C, 3-4 días. Un frasco de Roux se congeló y descongeló varias veces para la prueba de des- pistaje de micoplasmas, como técnica de rutina. El otro frasco de Roux se sometió a la técnica clásica de "versemización", con una solución tripsinaversene 1:1, para el desprendimiento celular, que después de centrifugadas a 800-900 RPM (5 min.) y decantadas, se resuspendió el compacto celular en medio de crecimiento, y la suspensión de células se distribuyó en ampulas con el 10% de glicerina pura estéril y a partes iguales, otras con DMSO también al 10%. Todas las ampulas se marcaron, se enfriaron a 4°C por 20 horas y se colocaron directamente a -70°C (congelador eléctrico) en una caja de poliespuma durante una semana, y finalmente, se situaron en el termo de nitrógeno líquido.

Los dos tubos de Leighton se decantaron y se fijaron con un fijador de Bouin. Las células fueron decoloradas con alcohol al 70% y coloreada con hematoxilina-eosina (coloración de contraste); luego fueron montadas en porta objetos con bálsamo de Canadá. Finalmente retratadas en diapositivas para su comparación posterior.

2. Después de mantener las líneas celulares, descritas anteriormente, congeladas en nitrógeno líquido, como mínimo seis meses, se procedió a la descongelación, al someter las ampulas a -70°C por 72 horas, y luego directamente a un "baño de María" a 37°C 2-3 segundos. Se abrieron, con suma asepsia y se sembraron en Jumbos de cultivo, que luego de formar una capa monocelular, se subcultivaron hasta obtener dos frascos de Roux y dos tubos de Leighton, incubados a 37°C de 3-4 días. Después se volvió a repetir todo el trabajo realizado y descrito en la etapa No. 1.⁹⁻¹⁰

RESULTADOS

En la primera etapa del trabajo –cinco líneas celulares escogidas para este estudio comparativo– las técnicas se desarrollaron sin dificultad, y en las diapositivas de las coloraciones con hematoxilina-eosina, todas las células presentaban sus morfologías características (epiteliales y fibroblastos) de acuerdo con las referencias de la "American Type Culture Collection".

En la segunda etapa, experimentamos problemas con los congeladores eléctricos de -70°C y al final del trabajo, tuvimos que mantener las ampulas en hielo seco por 72 horas antes de descongelarlas. De todas las líneas celulares estudiadas y comparadas, sólo las BSC-1 (riñón de mono

Grivet) sufrieron alteraciones morfológicas apreciables, tanto las de glicerina como las de DMSO. Las demás conservaron su morfología normal característica.

DISCUSION

El almacenamiento de células heteroploides y otros sistemas celulares a -190°C , al utilizar como refrigerante el nitrógeno líquido, tiene muchas ventajas, y actualmente se considera como el más conveniente por su bajo costo, temperatura constante y termos especiales que no requieren electricidad, y además fácil de manipular y de transportar.

Pero de los preservativos utilizados, no hay una aceptación general de cuál es el mejor, si el DMSO o el glicerol. Se espera que los resultados a largo plazo dirán el lugar de cada uno para cada tipo de célula o sistema celular específico.

No hay una teoría que explique ampliamente el mecanismo de la preservación celular a bajas temperaturas (subcero). Los diversos métodos para la preparación de células para su congelación y descongelación posterior, tienen sus propios problemas particulares, pues siempre la célula sufre daño o "choque térmico" en la congelación y descongelación de las mismas.

El estudio combinado de todos estos métodos y problemas nos permitirán una información más completa y detallada para resolverlos satisfactoriamente.

ESTADO COMPARATIVO

Morfología normal de las células de línea antes de la congelación en nitrógeno líquido

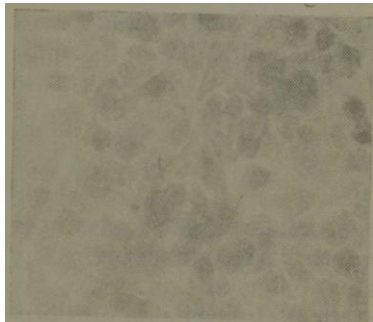


Figura 1
Células FL.

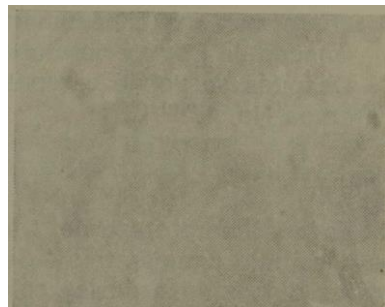


Figura 2
Células HELA.

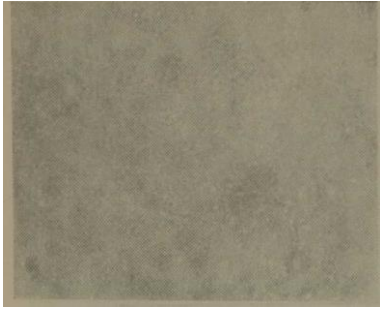


Figura 3 Células
BSC-1.

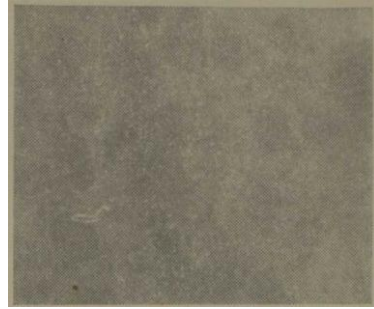
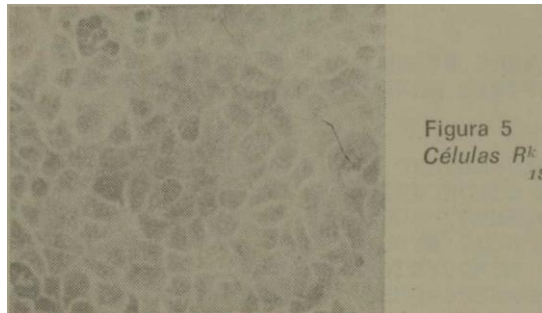


Figura 4
Células LLC-MK.



Morfología de las células de línea después de la congelación en nitrógeno líquido

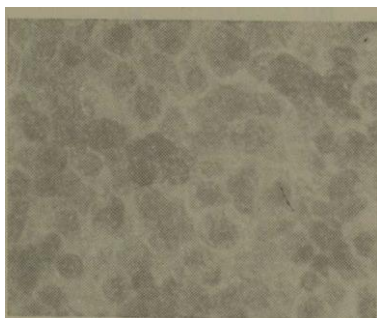


Figura 6
Células FL.

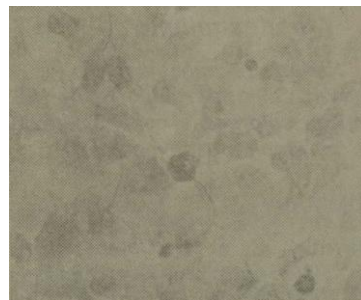


Figura 7
Células FIELA.

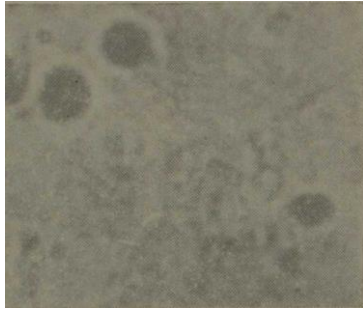
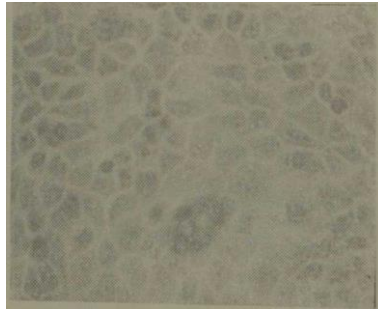


Figura 8
Células BSC-1.



Figura 9
Células LLC-MK₂



Agradecimiento

Nuestro reconocimiento a los compañeros del Laboratorio de iconopaiografía del INHEM, Juan R. Silverio y Julio C. de Villiers, por facilitar las diapositivas de las láminas morfológicas coloreadas con hematoxilina-eosina, y a Fidela Lavín por realizar todo el trabajo de mecanografía y montaje.

SUMMARY

Durruthy, C. et al. *Comparative study of two methods to preserve Une cells freezed into liquid nitrogen.* Rev Cub Med 21: 3, 1982.

Comparative study of five cells lines of the most used in our virology laboratories, keep stored at -190°C (liquid nitrogen) is reported. Work was performed in two phases. First phase was the morphologic study, by hematoxylin-eosin contrast staining. of colis selected for the study, which were freezed at one time into divided ampules, ones with 10% glycerine and the others with 10% DMSO (dimethyl-sulfoxide). At the second phase, after being six months stored at -190°C , the cells were deicod and first phase complete technique was again performed. Only BSC-1 (kidney of Grivet monkey) suffered significant morphological alterations, the others, preserve normal morphological character istic, using both preservatives.

RESUME

Durruthy, C. et al. *Etude comparative de deux méthodes pour la conservation de cellules d'une lignée, congelées en azote liquide*. Rev Cub Med 21: 3, 1982.

Il est rapporté l'étude comparative de cinq lignées cellulaires des plus utilisées dans nos laboratoires de virologie, et qui sont stockées à -190°C (azote liquide). Le travail a comporté deux étapes. La première a consisté en l'étude morphologique, par coloration de contraste avec hématoxyline-éosine, des cellules choisies pour l'étude, lesquelles ont été congelées en même temps en ampoules divisées, les unes avec 10% de glycérine et d'autres avec 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde). Dans la deuxième étape, après six mois de stockage à -190°C , elles ont été dégelées et il a été répété la technique complète de la première étape. Seulement les BSC-1 (rein de singe Grivet) ont subi des altérations morphologiques significatives; le reste a conservé sa morphologie normale caractéristique. lors d'utiliser les deux préservateurs.

PE3KME

Hyppya, K. h jcp. CpaBHHTQJiiHoe accjiejiO BaHae .imyx MSTOJIB - XpaHeHÜH

3aMOpOXOHHHX JCQHSÍHHX KJieTOK B 2ffl, HKOM 830T8. Rev Cub Med 211 3, 1982.

B HacTomneü paóTe coómaeTon rrDOBe^eHim

cpaBimTejr&Horo hc- cJiejiDBamiH nflTa KJieTO'mHX jihhelí, kotophq naiqe Bcero Kcnojii>3y-
iotoh b Hamefi jiaóopaTopafi B-Hpojior&H, a KOTopac xpaHSTCH npH tsm neparye - 190°C Ib
m^KOM a 3 0 T e) . Haraa paóOTa ripoBozpuiaCB bT jíBa 3Tana. Hepsali 3Tarr 3aiuisHajiCH b
M0p\$0Ji0rn^eckOM HccjiejuoBa HM C nOMOUJIED OKpaCKH KOHTpaCTQ
r8MaTOKCaJinHa-303flHOM KJISTOK7 B3HTHX JÜIH H3y^eHM, KOTOpte óbLJm
3aMOpOS6HH 0^H0Bp8M8HH0 B ppanejienHHX aimyjiax, ooth C 10% ivnmapHEOM h apyae c
10 ©ICO IflaMaTHjr-cyjii>{()0KCH0}» Ha btodom srane, nocuie necTH m6ciei3b - xpaHerom
npa TeMnepaType b-19ü°C, rastre 6ujw pa3MopoateHH e - M6T0JI ótui noBTopeH corjiacHO
nepBOMy 3Tarry» Tojibko KJieTKH BSC-I (noHKa 00831x3301 Grivet) anejín sHa^iHTSJiBHHS
Mop\$ojiorMeckHe na pymemw, ocTajrBHHe Me iuiqtkh coxpaHm cbob HopMajn>Hy» Mop\$0-
jioraio, xapaKTePHyxi hm, npa Hcn0jn>30BaHaa oóeHx KOHcepBaTopoB.

BIBLIOGRAFIA

1. Animal Tissue Culture. Advances in Technique. Sub-zero cell storage. Butterworths. London, 1972
2. Parker, R.C. Métodos de cultivo de los tejidos y las células. 3a. ed. en español. Madrid, 1967.
3. Porterfield, J.S.; M.S. Ashword-Smith. Preservation of cells in tissue culture by glycerol and dimethyl sulfoxide. Nature 193: 548, 1962.
4. Lovelock, J.E. Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. Proc R Soc Med 47: 60, 1954.
5. Stulberg, C.S. et al. Quantitative and qualitative preservation of cell-strain character- istics. Nati Cáncer Inst Monogr 7: 17, 1962.
6. Merryman, H. T. Preservation of living cells. Fed Proc 22: 81, 1963.
7. Gruñe, A. E. et al. Preservation of cell culture by freezing in liquid nitrogen vapor. Proc Soc Exp Biol Med 116: 462, 1964.
8. Nagington, J.; R. I. Greaves. Preservation of tissue culture cells with liquid nitrogen. Nature 194: 993, 1962.
9. Durruthy, C.; M. Cornelias. Manual práctico sobre desarrollo y aplicación de técnicas de cultivos de células de línea y primarias. INHEM. La Habana, 1976.
10. Fedoseev, A. P.; C. Durruthy; P. Mas Lago. Aislamiento de los micoplasmas a partir de los cultivos de tejidos. Bol Hig Epid 12: 1, 1974.

Ora. Catalina Durruthy instituto Nacional de Higiene Loidemiologia y Microbiología infanta 1158 Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 11 de agosto de 1981.

Aprobado: 12 de septiembre de 1981.

R.C.M.
MAYO-JUNIO, 1982

00Q