

## ESTUDIO CARIOLÓGICO DE LAS LINEAS CELULARES BHK - 21, 135 cl - 7 y PK - 15 EMPLEADAS EN VACUNAS DE USO VETERINARIO

JUAN RENTERÍA F.<sup>1</sup>

JULIÁN ARMADA R.<sup>1</sup>

ELISEO HERNÁNDEZ B.<sup>1</sup>

MARÍA ROLDÁN DE GORDÓN<sup>1</sup>

La gran importancia que tienen los cultivos celulares, radica principalmente en que en ellos es posible efectuar aislamiento primario de virus, investigación bioquímica básica y producción de vacunas entre otras (Fenner y White, 1981). Actualmente un gran número de laboratorios estatales y privados, emplean cultivos celulares en la producción de vacunas contra enfermedades, tales como: Rabia, Cólera Porcino, Moquillo Canino, Encefalitis Equina Venezolana, Panleucopenia Felina, Gastroenteritis transmisible, etc. Esta preferencia para producir vacunas en líneas celulares se debe a las ventajas que brindan, como son: inmunidad específica y duradera, inocuidad, elaboración a gran escala y reducción en costo y manejo, en comparación con la vacuna producida en cultivos primarios, embrión de pollo o en animales susceptibles. Estas líneas celulares destinadas a producir vacunas para uso veterinario, se sujetan regularmente a normas dictadas por el Code of Federal Regulations (CFR); 9, Animals and Animal Products, of Department of Agriculture, U.S.A., 1977 y por Shannon en the American Type Culture Collection, Registry of cell lines, 1972 (ATC). En la práctica es común el empleo de líneas celulares para producir vacuna sólo hasta determinado número de pases, porque se ha informado (Barrett, 1980, Sanford, 1976, Boone, *et al.*, 1979) que las líneas celulares originadas de células diploides de un solo tipo, son capaces de resistir alrededor de

100 subcultivos *in vitro*, conservando su número original diploide de cromosomas. Después de esto hay dos posibilidades, la transformación neoplástica espontánea de las células o la muerte de la línea celular. Por tanto, creemos necesario hacer caso de la propuesta que en 1968 planteó el Comité de la Asociación Internacional de Estandarización Biológica de Cultivo de células, tratando de normalizar los criterios que se siguen para utilizar líneas celulares en la producción de vacuna. Siendo uno de los mayores intereses de este comité el realizar el estudio cariológico a estas líneas, por medio del cual se obtiene el número y morfología de los cromosomas, aceptándose dentro de ciertos límites algunas alteraciones cromosómicas. Sin embargo, esta medida de control para comprobar la estabilidad cromosómica de las poblaciones celulares, sólo se lleva a cabo en las que son destinadas a producción de vacunas de uso humano (García, 1980).

El objetivo del presente trabajo es estudiar el comportamiento cromosómico de las líneas celulares, mediante una técnica cariológica rápida y eficaz, que permita evaluar el desempeño de las poblaciones celulares *in vitro*, destinadas a la producción de vacunas para uso veterinario.

Se realizaron estudios cariológicos a tres líneas celulares BHK-21, 135cl-7 y PK-15, empleadas en la Producción de vacunas; en el Departamento de Investigación en Producción (I.N.I.P.). Para la obtención de laminillas con cromosomas se empleó la técnica desarrollada por los biólogos P. Morales y T. Teresa Vallerino (Comunicación personal). Los pasos a seguir son: Se siembran células en botellas de dilución de leche (Parker, 1967) en una concentración de 300,000 células/ml aproximada-

Recibido para su publicación el 5 de abril de 1983.

<sup>1</sup> Departamento de Investigación en Producción, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, México, D.F., Col. Lomas Altas, C.P. 11950.

mente y a las 24 horas se les agrega colchicina al .004% para detener las mitosis en metafase; tres horas más tarde se provoca una expansión de las células agregándoles una solución hipotónica de KCL al 0.075 M, después a las células se les agrega fijador (metanol :Ac.Acético. 3:1), por último se preparan las laminillas secándolas por calor y se tiñen con Giemsa, se observan al microscopio con el objetivo de inmersión (100X). Se revisaron cien células en metafase (Clausen y Syverton, 1962) y se anotaron en una hoja de registro citológico, el número de mitosis examinadas, las coordenadas, el número de cromosomas por mitosis y las anomalías cromosómicas encontradas (Hsu y Klatt, 1958).

Se compararon las cien mitosis que se revisaron por cada línea celular con los valores de frecuencia de distribución de los cromosomas de The American Type Culture Collection y son los siguientes:

Línea celular BHK-21 origen riñón de Hamster (*Mesocricetus auratus*)  $2n=44$ . Frecuencia de distribución de los cromosomas en 50 células.

Células	1	1	1	3	2	2	7	32	1
Cromosomas	<hr/>								
	36	38	39	40	41	42	43	44	45

Línea celular 13Scl-7 origen clona de la línea celular BHK-21  $2n=44$ . Frecuencia de distribución de los cromosomas en 50 células (similar a la de la línea BHK-21).

Línea celular PK-15 origen riñón de cerdo (*Sus scrofa*).  $2n=38$ . Frecuencia de distribución en 56 células.

Células	2	1	3	10	6	4	21	4	1	1	3
Cromosomas	<hr/>										
	30	31	33	34	35	36	37	38	53	63	67
Resultados.											

Se encontró la siguiente frecuencia de distribución de cromosomas: Línea celular BHK-21. Frecuencia de distribución en cien células.

Células	2	2	3	10	50	30	2	1
Cromosomas	<hr/>							
	30	33	38	40	42	44	45	66

Línea celular PK-15. Frecuencia de distribución en cien células.

Células	4	5	6	20	10	35	8	3	3	2	2	2
Cromosomas	<hr/>											
	28	30	33	34	35	36	38	50	55	114	95	76

Lo que nos indica que las líneas estudiadas por la técnica citológica ya mencionada se encuentran dentro de los límites establecidos como normales para dichas líneas celulares según The American Type Collection. Los marcadores cromosómicos descritos para la línea BHK-21 (El cromosoma X grande y metacéntrico y 5 pares de cromosomas telocéntricos en el complemento diploide del macho) fueron fácilmente identificados. En el caso de la línea celular PK-15 los marcadores cromosómicos (un cromosoma metacéntrico muy grande y varias combinaciones de cromosomas arriba del número modal). Así como la poliploidía aproximada del 5% fueron observadas.

La importancia que tiene el estudio citológico en las líneas celulares utilizadas para producir vacunas, radica en poder conocer la estabilidad cromosómica del cultivo celular que estamos trabajando, para evitar emplear líneas celulares con alteraciones cromosómicas que pudieran disminuir la capacidad de replicación viral de éstas. El riesgo de estas alteraciones está latente al continuar subcultivando indiscriminadamente una línea celular de origen diploide. Podemos evitar esto si disponemos de técnicas rápidas y sencillas para realizar estudios citológicos.

## Summary

This work showed the chromosome behavior of the cell lines: BHK-21, 13Scl-7 and PK-15, which are employed for the vaccine production for veterinary use. It was found all line cell are in the normal chromosome standars by the American type culture collection.

## Literatura citada

- BARRET, C.J., 1980. A preneoplastic stage in the spontaneous neoplastic transformation of syrian hamster embryo cells in culture. *Cancer Research* 40:91-94.
- BOONE, C.W.; TAKEICHI, N.; EATON, S.A., and PARANJPE, M., 1979. Spontaneous neoplastic transformation in vitro: a form of foreign body (solid surface) tumorigeneis. *Science Wash. D. Col.* 204:177-179.
- CLAUSEN, J.J., and SYVERTON, J.T., 1962. Comparative chromosomal study of thirty-one culture mammalian cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* 28: 117-145.
- Code of Federal Regulations: 9, Animals and animal products, of Department of Agriculture Part. 113-50. USA. 1977.
- FENNER, F., and WHITE, D., 1981. Virología médica. 2ª edición. *La Prensa Médica Mexicana*. Traducción al español por María Luisa Zárate. México 20, D.F.
- GARCÍA, B.A.M., 1980. Aspectos generales sobre cariología. Inst. Nal. de Virología, SSA. Sección Biológica Molecular, Unidad de Investigación Biomédica del CMN. México, D.F.
- HSU, T.C., and KLATT, O., 1958. Mammalian chromosomes in vitro. IX, On genetic polymorphism in cell populations. *J. Nat. Cancer Inst.* 21: 437-473.
- PARKER, R.C., 1967. Métodos de cultivo de los tejidos y las células. Edit. Atika, S.A. Madrid, España.
- SANFORD, K.K., 1976. "Spontaneous" neoplastic transformation of cells in vitro: some facts and theories. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 26:387-408.
- SHANNON, J.E., 1972. The American Type Culture Collection: Registry of animal cell lines. USA.