ISBN 970-27-1045-6

# "EXPANSIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DEL LINFOMA MURINO T L5178-Y CONTROLANDO EL MOMENTO DE CAMBIO DE ESTADO"

**Orozco Hernández Erika Gabriela[1]., Peregrina Sandoval Jorge[1]., Flores Torales Edgardo[1]., Orozco Barocio Arturo[1]., Del Toro Arreola Susana[2].**

1 Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, U de G.
2 Centro Universitario de Ciencias de la Salud, U de G.

## Antecedentes

La inmunología tumoral estudia las propiedades antigénicas de las células malignas, alteraciones y mecanismos inmunológicos que estos inducen en el huésped. Los antígenos tumorales son el reflejo de alteraciones heredables que acompañan a las transformación maligna y que pueden involucrar la biosíntesis de una molécula nueva por la alteración de su estructura. Las evidencias señalan un origen clonal en la mayoría de los tumores y durante la progresión tumoral se producen alteraciones heredables que al acumularse se traducen en sub-clonas con propiedades diferentes.

El linfoma murino L5178-Y es una línea tumoral de origen espontáneo que se originó en 1958 en un ratón macho DBA/2. Se conserva por transplantes seriado intraperitoneal a ratones con haplotipo $H2^{d/d}$ que son compatibles. La inestabilidad genética de las células malignas y los procesos de selección que suceden durante el desarrollo de los tumores, inducen variantes a partir de la clona original. Así, se han reportado sub-clonas del linfoma murino L5178-Y que presentan mucha variación. Por lo anterior se ha utilizado técnicas de expansión mediante cultivos *in vitro*, evitando así la generación de clonas diferentes.

Un cultivo celular es un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas**.** Permiten un control preciso y fino del medio ambiente. Ya que en un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de $O_2$, $CO_2$, tensión superficial...), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular,...).

La criopreservación es el proceso de congelar muestras para reducir su actividad metabólica y mantenerlas a temperaturas reducidas durante tiempos prolongados, preservando al mismo tiempo su viabilidad. La congelación de una suspensión celular tal como células tumorales, implica esencialmente un cambio de fase, es decir la transformación de un sistema líquido en otro sólido. Durante este proceso tiene lugar dos fenómenos que pueden ocasionar daño celular irreversible: la deshidratación osmótica y la formación intracelular de cristales de hielo. A temperaturas menores de -5ºC, las células y su medio circundante permanecen descongelados debido al superenfriamiento y la presión del punto de congelación por los solutos que se encuentran dentro y fuera de la célula. Entre los -5ºC y -15ºC, empieza la formación del hielo en el líquido extracelular, debido a que existe un mayor intercambio de calor con el medio circundante y alcanza más

rápidamente el equilibrio térmico con la fuente de enfriamiento (tren de congelación), mientras que el contenido de las células permanece descongelado. Hay que tener en cuenta que en cualquier solución existen Centros de nucleación que actúan como indicadores a partir de los cuales comienzan a formarse los cristales de hielo. Sin embargo, el interior de las células permanece líquido, pues la probabilidad de que se formen centros de nucleación es mínima y porque la membrana plasmática actúa como barrera, impidiendo el crecimiento del hielo dentro de la célula. El agua superenfriada en las células poseen por definición un potencial químico más alto que el del agua en la solución externa parcialmente congelada y en respuesta a esta diferencia de potencial, el agua sale de la célula y se congela en el exterior (Fig.1).

Los eventos físicos subsecuentes en la célula dependen de la velocidad de enfriamiento, y si este es suficientemente lento, la célula es capaz de perder agua rápidamente por exosmosis y mantiene un equilibrio con el medio extracelular, deshidratándose parcialmente pero sin congelarse. Si el descenso de temperatura continúa, el porcentaje de pérdida de agua al ser muy elevado podría dañar la membrana celular, desapareciendo de este modo la barrera contra la formación de cristales de hielo, y la célula se congela. En el momento de cambio de estado, se produce una liberación de calor que es resultado de la diferencia de entalpía del líquido y la entalpía del sólido, este proceso daña a las células si no es controlado. Si aumenta la velocidad de congelación, el calor latente es liberado de los primeros fenómenos de nucleación será insuficiente para compensar el frío y comenzarán a formarse nuevos núcleos. Si la velocidad de congelación es muy rápida, el agua intracelular no tiene tiempo de salir y la célula no pierde agua suficiente como para mantener el equilibrio osmótico. En este caso su interior se sobreenfría de manera acentuada y es posible la formación del hielo intracelular, produciéndose un daño fundamentalmente mecánico (Fig.2).

Los agentes crioprotectores modifican la nonicidad de la célula haciendo posible el uso de velocidades lentas de enfriamiento. Los crioprotectores retrasan la elevación de la fracción molar de la solución de NaCl y por lo tanto el stress osmótico de la célula es menor. Por otro lado, reducen la capacidad de las moléculas de agua libre para formar centros de nucleación durante la congelación. El mejor grado de protección para los sistemas celulares de mamíferos se ha conseguido utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol a concentraciones entre el 5 y 10 % (v/v), normalmente con velocidades de enfriamiento de 1 a 5° C/min. y velocidades de descongelamiento de 100° C/min. se consiguen recuperaciones celulares del 50 al 95%.

**Planteamiento del problema**

La sublínea del linfoma murino L5178-Y se originó de una línea de tumor de origen tímico espontáneo. Se mantiene vivo mediante transplantes cada 15 días en cepas de ratones compatibles al haplotipo del linfoma. Debido a esto pueden ocurrir mutaciones en las células y cambios en su estructura. Por ello, se ha pensado en expandir la línea tumoral *in vitro* y utilizar la técnica de la criopreservación controlando el momento de cambio de estado para mantener este tumor sin cambios, así evitaríamos sesgos que las mutaciones puedan ocasionar en los resultados de las investigaciones realizadas a partir de esta línea tumoral.

**Hipótesis:**

Mediante la técnica de la criopreservación controlando el momento de cambio de estado el linfoma murino L5178-Y se puede mantener vivo y viable con potencial de infección durante un tiempo indefinido.

**Objetivo general**

Expandir y criopreservar controlando el momento de cambio de estado el linfoma murino L5178-Y.

**Objetivos particulares**

1. Expandir la clona tumoral del linfoma.
2. Estandarizar y validar la técnica de la criopreservación controlando el momento de cambio de estado en el linfoma murino L5178-Y.

**Material y métodos**

**Obtención de las células tumorales del linfoma murino L5178-Y**

- Se rasura con una navaja el abdomen del ratón donador afectado con el linfoma en donde va a ser la punción.
- Se asea el área mediante la aplicación de benzal al 70%.
- Se punciona con una jeringa de insulina a nivel de peritoneo, teniendo la precaución de no perforar vísceras y se extrae la mayor cantidad de células tumorales posibles.
- Las células extraídas se reciben en 10ml. de PBS (búfer de fosfatos salinos) para ser lavadas tres veces. El lavado se hace homogeneizando las células en PBS y centrifugando durante 8-10 min. A 1500 rpm, retirando posteriormente el sobrenadante por decantación para resuspenderlas nuevamente en RPMI 1640.
- Una vez lavadas las células se ajustan mediante la utilización de una cámara de neubauer a 1.0 x $10^6$ células / ml. en medio de RPMI 1640 suplementado con 20 % de suero bovino fetal.

**Expansión de la clona**

- En cajas para cultivo se agregan de 5 a 8 ml. de medio RPMI 1640 suplementado con 20% de suero bovino fetal mas 1.0 x $10^6$ células / ml.
- Se deja en la incubadora de 24 a 48 hrs. Con una temperatura de 37ϒ C y 5% de $CO_2$
- Cuando el color del medio en la caja inicie a virar a amarillo se divide en dos cajas para cultivo nuevas para que sigan creciendo las células.
- Se cuantifica la viabilidad mediante la incorporación de un colorante vital.

**Criopreservación**

- Primeramente se prepara una solución criopreservadora a partir de RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, estando frío el medio y en agitación se agrega 20% de dimetil sulfóxido (DMSO) cuidando que no se precipiten proteínas.
- Mantener la solución criopreservadora en hielo.
- Verter un volumen igual de células tumorales lentamente a la solución criopreservadora agitando suavemente para obtener una suspensión de células en una solución al 10% de DMSO.
- Dejar enfriar las células con la solución criopreservadora en hielo durante 10 min.
- Se coloca la solución criopreservadora con células en fracciones en tubos criobiales.

**Congelamiento de las células en Nitrógeno liquido**

- Una vez que se colocan las células con solución criopreservadora en los tubos criobiales, se mantienen sumergidos en hielo frapé durante 15 min.
- Los criobiales se pasan por un tren de congelamiento (hielo frapé, hielo frapé con acetona, hielo seco, hielo seco con acetona, nitrógeno liquido), controlando el descenso de temperatura con la ayuda de un termómetro digital. Cuando los criobiales se encuentran en el hielo seco y la temperatura de las células es igual a -15ºC, se pasan rápidamente a nitrógeno líquido durante 1min. Y después se regresan al hielo seco para continuar el orden del tren de congelación.
- Por último se procede a almacenar las muestras en el tanque con Nitrógeno liquido cuidando que todos los criobiales queden sumergidos en este.

**Validación del potencial oncogénico de la línea criopreservada mediante transplante en ratones sanos**

Una vez criopreservadas las células tumorales en nitrógeno líquido se toman alícuotas para transplantarlas en ratones sanos a diferentes tiempos (15 días, 30 días, 3 meses, 6 meses y un año después)

**Revelancia social**

Se tiene conocimiento de que varios centros universitarios de la universidad de Guadalajara como el CUCS y el CUCBA realizan constantemente investigaciones basándose en el linfoma murino L5178-Y, pero no pueden partir de una línea criopreservada ya que no se ha trabajado en ello. Por eso, el motivo de este proyecto es criopreservar el linfoma murino L5178-Y para que futuras investigaciones orientadas al linfoma, puedan utilizar esta línea criopreservada. Esto va a asegurar que los resultados finales de la investigación no tengan sesgo con respecto a la inestabilidad de las células o a cambios morfológicos que sean producto de mutaciones por los constantes transplantes entre ratones cada 15 días. El impacto que va a tener este proyecto esta dirigido al campo

de investigación científica, en donde se están efectuando diversos estudios sobre la respuesta inmune en los tumores y los efectos de los factores ambientales que suprimen la inmunidad y que inducen el desarrollo tumoral.

## Resultados

Después de efectuar la expansión, la criopreservación y los dos primeros transplantes, el primero a los quince días y el segundo a los treinta días después de la criopreservación de la línea tumoral T L5178-Y a dos ratones sanos respectivamente, se observó el desarrollo del tumor en los diferentes tiempos.
Posteriormente, utilizando otra alícuota de células criopreservadas, se procedió a contar células vivas en la cámara de Neubaguer para obtener viavilidad. Esto nos dio como resultado un 90% de viavilidad, ya que solamente no pudo sobrevivir el 10% de las células criopreservadas.

## Conclusiones

La técnica y los reactivos utilizados en este proyecto fueron idóneos en la expansión y criopreservación de estas células tumorales, ya que en la viavilidad obtuvimos un 90% de células vivas, las cuales no perdieron sus funciones fisiológicas normales después de su descongelación, ya que los ratones que fueron transplantados con estas células desarrollaron los tumores cancerígenos en el mismo tiempo en que se desarrolla el tumor cuando se transplanta directamente de un ratón enfermo.
Por otro lado este proyecto tendrá motivaciones éticas, ya que la investigación biomédica supone el sacrificio de muchos animales de investigación utilizados para mantener este tumor con vida. Por lo cual la criopreservación es una alternativa válida en estas situaciones. Incluso la criopreservación permite realizar experimentos que suponen el sacrificio de pocos animales.

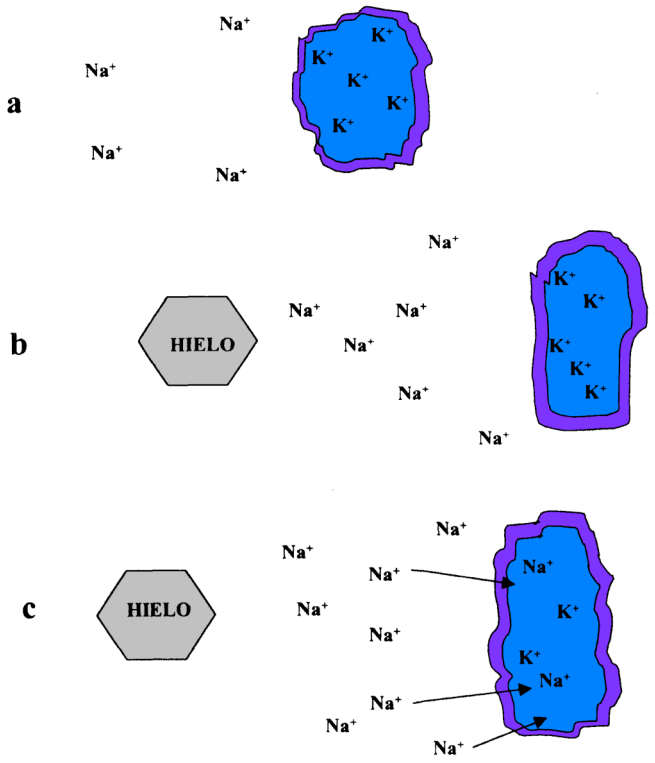


**Figura 1.** Congelación celular a velocidad lenta.

a) Célula descongelada.
b) Temperatura -2ϒ C el volumen se reduce osmóticamente.
c) Temperatura -10ϒ C la deshidratación celular es excesiva. Se produce daño en la membrana celular.

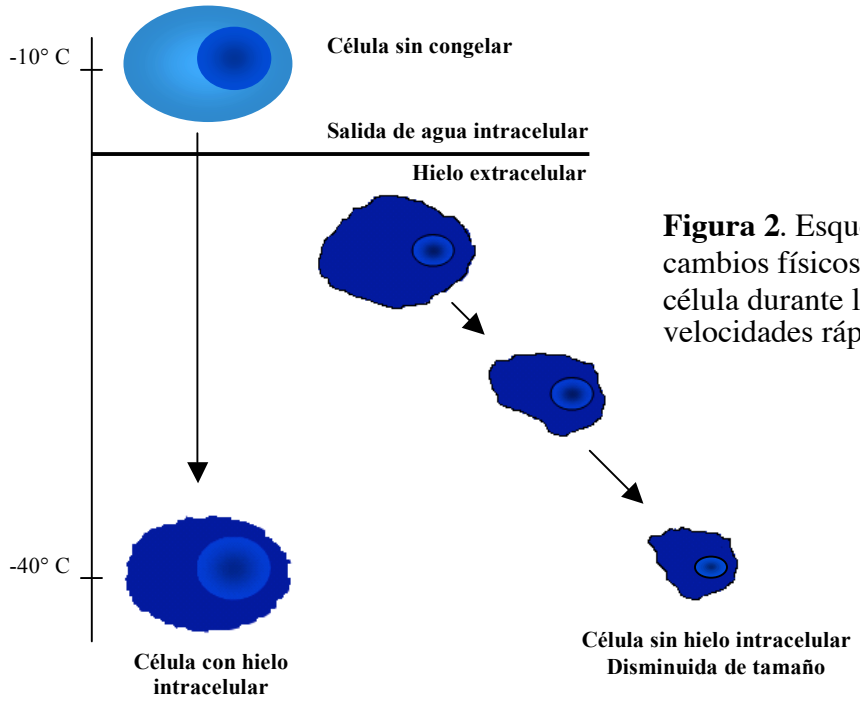


**Figura 2**. Esquema de los cambios físicos que ocurren en la célula durante la congelación a velocidades rápida y lenta.