

Banco de líneas celulares: efecto de la criopreservación en la viabilidad celular a lo largo del tiempo

Arregui L¹., Mayol X¹., García C^{1,2,3}., Navarro P¹., Alayo I^{1,2}., Torà M^{1,4}.

¹IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques), MARBiobanc, Barcelona. ²CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), España. ³UPF (Universitat Pompeu Fabra), Departament Experimental de Ciències de la Salut, Barcelona. ⁴Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. (correo electrónico: larregui@imim.es)

INTRODUCCIÓN

El banco de líneas celulares *Cancer Cell Line Repository (CCLR)* del MARBiobanc (IMIM) mantiene stocks de 150 líneas, mayoritariamente tumorales, para uso interno con fines de investigación biomédica.

Los stocks de líneas celulares se preservan en tanques de nitrógeno líquido a -196°C monitorizados con un sistema de alarma externo. La trazabilidad de los viales de los diferentes stocks se registra en una base de datos vinculada a la información intrínseca de cada línea celular, manteniendo un número de pasajes estrecho. Sistemáticamente se realizan análisis de contaminación por micoplasma.

El CCLR estableció un protocolo de criopreservación estandarizado para minimizar los daños producidos por el proceso de congelación y garantizar la recuperación del máximo número posible de células viables al descongelar.

El presente estudio analiza el estado actual del CCLR, comprobando los efectos de la criopreservación a corto, medio y largo plazo en la viabilidad celular de 34 líneas representativas.

Objetivo: Establecer una sistemática de control de calidad para la correcta preservación de las líneas celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos Celulares. Estudio longitudinal de la viabilidad de 34 líneas celulares criopreservadas a 1-10⁶ cel/ml/vial, 40% FBS, 10% DMSO. Rampa de congelación en contenedores de isopropanol Nalgene® a -80°C, 24 h. La viabilidad se midió por exclusión de azul tripán. La selección de la muestra de conteo es aleatoria.

Se consideraron 3 grupos respecto al periodo de criopreservación para cada línea:

- Lotes de congelación recientes 0,08 años ±0,05
- " intermedios 5,8 años ±1,3
- " antiguos 11,0 años ±0,9

Registro Fotográfico. Valoración de posibles cambios en el comportamiento o morfología de las células (deriva fenotípica, contaminaciones cruzadas).

Método Estadístico. Análisis mediante test no paramétricos para muestras independientes, considerando significativo p-val<0,05. La correlación entre el tiempo de criopreservación y la viabilidad celular se estimó mediante modelos de Ecuaciones de Estimación Generalizadas (GEE) para eventos binomiales con link logit.

RESULTADOS

1. REGISTRO FOTOGRÁFICO

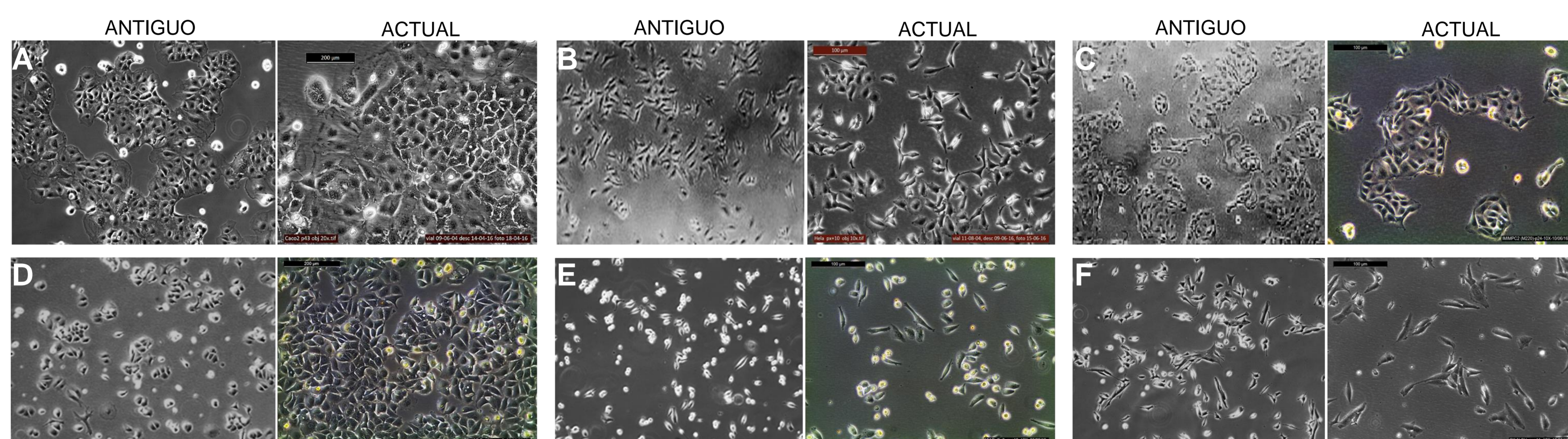


Fig.1. Control fotográfico realizado durante las reposiciones. Comparación de la morfología de los lotes originales del repositorio (ANTIGUO) con los cultivos de lotes de congelación ACTUALES. A. Caco-2, B. HeLa, C. IMIM-PC2, D. MCF-7, E. MiaPaCa-2, F. SK-N-SH. La morfología celular para una misma línea se mantiene inalterable independientemente del periodo de congelación. La mediana del rango de pasajes durante el estudio se mantuvo en 3,5 (min.2, max.10).

2. VIABILIDAD CELULAR

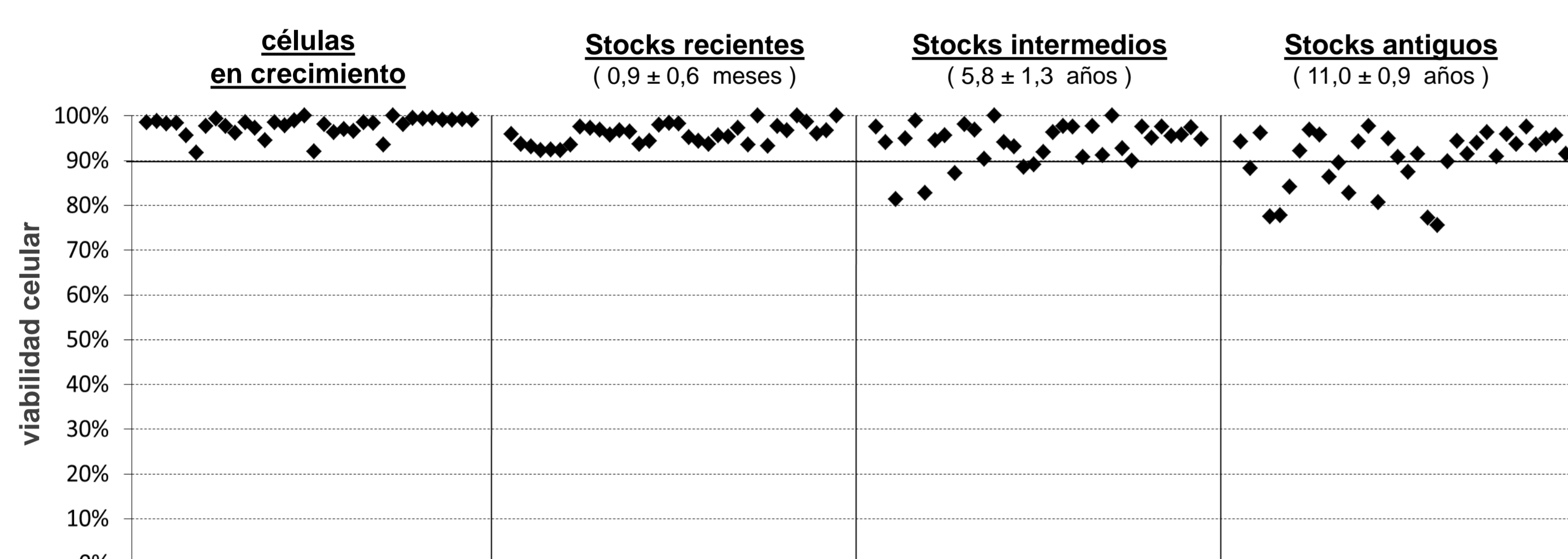


Fig.2. Evolución de la viabilidad (%) de los stocks congelados en los diferentes periodos de tiempo.

Viabilidad celular (media ±DE)

en crecimiento97,5% ± 2,5
lotes recientes.....95,9% ± 2,2
lotes intermedios...94,0% ± 4,4
lotes antiguos.....89,9% ± 6,4

Todas las líneas congeladas en periodos recientes e intermedios tienen una viabilidad ≥ 90%.

La viabilidad de los stocks antiguos es ≥ 75%.

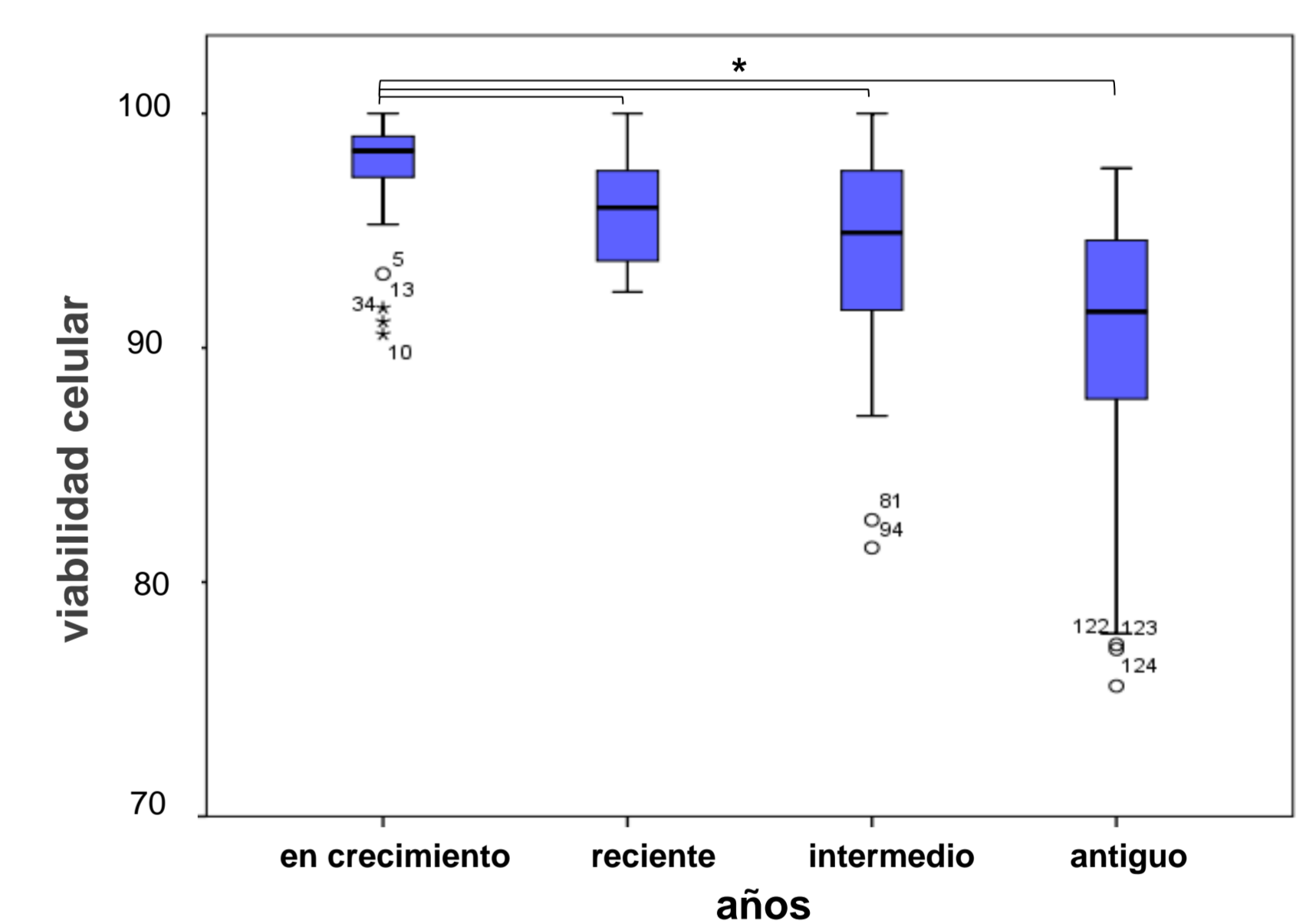


Fig.3. Viabilidad por tiempo de congelación. mediana±SD. *p-val<0,05

3. CINÉTICA DE MORTALIDAD

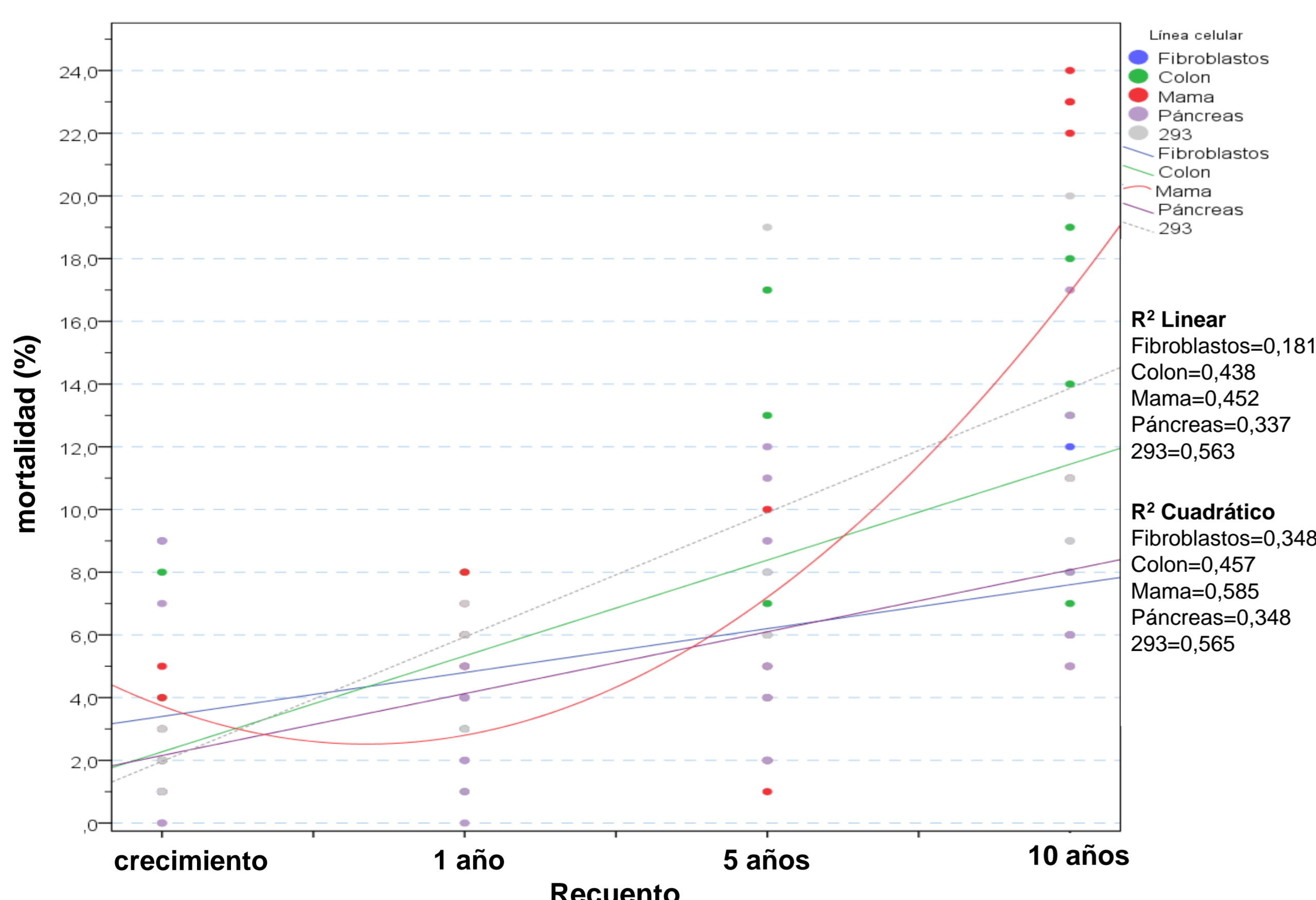


Fig.4. Evolución de la mortalidad, según origen tisular, de los stocks de las líneas celulares congelados en periodos recientes, intermedios y antiguos. Valores expresados en OR.

El riesgo de mortalidad respecto al tiempo de congelación, excepto en las de mama, creció de forma lineal a una tasa anual del 10% (OR=1.10, IC95%: 1.07-1.12) sobre un riesgo basal del 1.5%.

Las líneas de mama presentaron una cinética del riesgo de mortalidad superior a las otras líneas a partir del quinto año de congelación.

4. INDICADORES DE CALIDAD

	Línea	% de mortalidad predicho por el modelo	IC_min	IC_max
en crecimiento	Fibroblastos	3,2	0	9
	Colon	2,2	0	4,9
	Mama	3,8	0	7,2
	Páncreas	2	0,2	3,8
stocks recientes	293	2	0	6,5
	Fibroblastos	4,5	0,8	8,2
	Colon	5,1	3,3	6,9
	Mama	2,6	0,2	5
stocks intermedios	Páncreas	3,9	2,8	5
	293	6	3,1	8,9
	Fibroblastos	6	2,2	9,8
	Colon	8,1	6,2	10
stocks antiguos	Mama	6,9	4,4	9,1
	Páncreas	6	5,1	6,9
	293	9,9	7	12,8
	Fibroblastos	7,4	1,8	13
	Colon	11	8	14
	Mama	18,9	12,9	20,2
	Páncreas	8	6,5	9,5
	293	13,9	9,6	18,2

Tabla.1. Valores establecidos como indicadores de calidad para el correcto mantenimiento del CCLR.

Valores esperados de mortalidad y sus intervalos de confianza obtenidos por origen de línea celular y periodo de congelación. Estos valores se establecerán como indicadores de calidad y se tendrán en cuenta para las futuras reposiciones de los stocks que conforman el CCLR.

CONCLUSIONES

- ❖ Con los protocolos empleados (congelación, control de micoplasma y la monitorización de los equipos), la mayoría de líneas mantienen una viabilidad ≥90% a lo largo de los años de congelación.
- ❖ La mortalidad celular crece linealmente con el tiempo de criopreservación y es característica para cada grupo de líneas.

- ❖ Los resultados obtenidos nos han permitido establecer unas pautas para el correcto control de calidad de las líneas:

- Por una parte, establecer como punto de corte de viabilidad aceptable el 90%. Se estudiará la reposición de los stocks que presenten una viabilidad menor teniendo en cuenta los IC de mortalidad obtenidos para cada línea y tiempo de congelación.
- Por otra parte, establecer un intervalo idóneo de 5 años para la realización de controles sistemáticos de calidad de los stocks existentes.