RECUPERACIÓN, CULTIVO Y PRESERVACIÓN DE FIBROBLASTOS PORCINOS DE ANIMALES GENÉTICAMENTE VALIOSOS

Piñeiro-Silva[1,2], C., Navarro-Serna[1,2], S., Sarrías-Gil[1], L., Cánovas[1,2], S., Romar[1,2], R., Gadea[1,2], J. y Vieira[1], L.A.
[1]Dept. Fisiología. Universidad de Murcia. [2]IMIB-Arrixaca; luisalberto.vieira@um.es

INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares tienen diversas aplicaciones, como la realización de ensayos bioquímicos, toxicológicos o moleculares, además de permitir la conservación y propagación de material biológico (Phelan *et al*., 2016). Por otra parte, estas células se pueden utilizar para generar organismos mediante clonación (Polejaeva *et al*., 2000), proceso especialmente interesante cuando se utilizan células de animales valiosos (modificados genéticamente), pudiendo reproducir sus características o recuperarlas si el animal ha fallecido. Recientemente, hemos producido cerdos KO para el gen TPC2 (*two pore segment channel 2*) (Navarro-Serna *et al*., 2021). Debido al alto valor de los animales, el objetivo de este trabajo fue realizar un cultivo celular de muestras procedentes de dos de los cerdos KO fundadores, así como de los lechones de la F1 que murieron en el periparto con la finalidad de conservar su material biológico para posteriores estudios.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de oreja de dos cerdos adultos vivos y muestras de oreja, cola, lengua y mucosa oral de tres lechones en el plazo de 18 h tras su muerte. Además, de uno de estos lechones se pudo obtener muestra de oreja previamente a su fallecimiento. Tras lavar las muestras tres veces con PBS (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina), se cultivaron una media de cuatro fragmentos de 2-5 mm en frascos de 25 cm^2, en medio DMEM:F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4,5 g glucosa*:*Nutrient Mixture F-12*; 10% suero fetal bovino, 2,5 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 2,5 µg/ml anfotericina) a 38,5 ºC y 5% CO_2. Cuando las células alcanzaron la fase exponencial de crecimiento con alrededor de 80-90% de confluencia, se realizó el primer pase mediante la digestión con tripsina (0,25% y 0,02% EDTA). Posteriormente, se determinó la viabilidad celular con azul Tripán y la concentración mediante el conteo automático. Finalmente, se sembraron entre 8.000-10.000 células vivas/cm^2 en frascos de 25 cm^2. A partir del segundo pase, se congelaron las células en la fase exponencial de crecimiento a una concentración de entre 1 y 2 millones/ml en medio DMEM:F12 (20% suero y 10% DMSO) y se almacenaron en nitrógeno líquido (Davis, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 15 muestras sembradas, en 9 de ellas (60%) apareció contaminación bacteriana y fúngica. En todas las muestras de lengua y mucosa oral (n=6) se registró crecimiento bacteriano y/o fúngico, pero se pudieron cultivar células de 4 de los 5 animales muestreados a partir de tejido de oreja o cola. De estos 4 animales, finalmente se logró la preservación de la línea celular congelando viales a concentraciones entre 0,975 y 1,865 millones de células/ml tras 3-4 semanas en cultivo con una viabilidad superior al 97%. Estos fibroblastos almacenados suponen una fuente de material con potencial uso para su posterior multiplicación y análisis, o bien para ser empleados en clonación con el objetivo de producir animales genéticamente idénticos a estos cerdos.

CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones empleadas, las muestras obtenidas de cola y oreja son una mejor opción que las de lengua o cavidad bucal por su alta incidencia de contaminación. Se ha conseguido preservar un cultivo primario de células de animales genéticamente valiosos con alta eficiencia (80%; 4/5 animales) y suficiente concentración celular viable como para continuar con su propagación, estudio y futura clonación pudiendo producir animales con sus mismas características genéticas. La contaminación de las líneas celulares originadas de animales muertos supone un problema técnico a resolver en un futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Davis, J.M. 2002. Basic Cell Culture. 2nd Edition. Oxford University Press. • Navarro-Serna, S., *et al.* 2021. Crispr J. 4: 1-16 • Phelan, K. & May, K.M. 2016. Current Protoc. Toxicol. 70: A.3B.1-A.3B.22. • Polejaeva, I.A., *et al.* 2000. Nature. 407 (6800): 86-90.

Agradecimientos: Proyectos MINECO AGL2015- 66341-R y Fundación Seneca Región de Murcia 20040/GERM/16 y 21105/PDC/19