

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Obtención y caracterización de una línea celular diploide de riñón humano

Lic. Luis Morier,<sup>1</sup> Téc. Margarita Gómez,<sup>2</sup> Dr. Juan J. Rodríguez<sup>3</sup> y Lic. Lissette Pérez<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se obtuvo una nueva línea celular diploide de riñón embrionario humano mediante subcultivos seriados (Mag) a partir de un cultivo primario. Se preparó aplicando la técnica de explanto en lugar de la clásica digestión enzimática con tripsina. El proceso de estabilización de la línea diploide luego del "cultivo secundario" se alcanzó entre los pases 6 y 7. Fueron probados 3 medios de cultivo durante el proceso, demostrándose que solo el MEM fue completamente satisfactorio. Las características biológicas de la nueva línea fueron: morfología fibroblástica, medio de cultivo Eagle MEM con 10 % de SBF, *split* 1:2 a 1:3, cariotipo humano normal, viabilidad poscongelación de 60 %, libre de contaminantes y no tumorigénica. Los subcultivos 11-13 de Mag criopreservados fueron estudiados desde el punto de vista de su utilidad para el diagnóstico de diferentes grupos virales.

DeCS: RIÑÓN; LINEA CELULAR; CRIOPRESERVACION.

La historia de los cultivos de células animales comienza en los inicios del siglo xx.<sup>1-5</sup> En la primera mitad era un mito cultivar células *in vitro*, durante mucho tiempo solo se lograba mantener células de cortes de tejidos de animales en coágulos que se formaban con extractos de esos tejidos y plasma o suero del mismo animal.<sup>3</sup> Aunque los intentos por mantener explantos de tejidos *in vitro* se han informado desde 1907, el comienzo de la era moderna del cultivo celular lo marcó el establecimiento de las primeras líneas celulares (HeLa y células-L de ratón), y los estudios iniciales para determinar los requerimientos nutricionales de las células en cultivo.<sup>6</sup>

Existen 3 tipos mayores de cultivos celulares para el diagnóstico viral: cultivos primarios, líneas celulares diploides y líneas celulares continuas o establecidas.<sup>2,3,5-14</sup>

Se ha descrito en la literatura un amplio rango de líneas celulares animales, incluidas las

humanas.<sup>13-15</sup> Para los estudios de rutina de los laboratorios de virología, los cultivos celulares que se utilizan son diploides y continuos. Tales líneas no siempre son adecuadas para todos los propósitos porque no hay un tipo celular universal, o sea, sensible al crecimiento de todos los virus. En estas situaciones el investigador puede considerar preparar su propio cultivo primario y tratar de establecer una nueva línea celular con fines diagnósticos o de investigación.<sup>2,7,8</sup>

Se conoce que el uso de los cultivos de células primarias desempeña un papel prominente en el desarrollo de la virología como ciencia, así como en su aplicación a la inmunología, sin embargo, son caros, consumen tiempo para prepararlos y tienen un tiempo de vida muy limitado.<sup>7,13</sup>

*Hayflick y Moorhead* desarrollaron las líneas celulares diploides en los años 60. La mayoría de estas líneas son del tipo celular fibroblástico; son

<sup>1</sup> Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

<sup>2</sup> Técnica en Microbiología. Laboratorio Nacional de Genética Médica.

<sup>3</sup> Máster en Virología. IPK.

<sup>4</sup> Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada. IPK.

sensibles a un número de virus que habían sido difíciles de cultivar previamente de muestras clínicas.<sup>9</sup>

A pesar de que las células primarias de origen humano, incluidas las embrionarias de riñón, son muy sensibles para el aislamiento de virus<sup>3</sup> y ofrecen la más estrecha aproximación de la situación *in vivo*,<sup>7</sup> estas no se encuentran disponibles a diario en los laboratorios de diagnóstico virológico y no es posible obtener un banco, por lo que es necesario tratar de establecer líneas celulares diploides, con una sensibilidad igual o superior a los sistemas recomendados en el aislamiento de los virus. Por lo antes expuesto, los autores de este trabajo se propusieron la obtención de una línea celular diploide de riñón embrionario humano que pudiera ser utilizada posteriormente para el diagnóstico de algunos virus.

## MÉTODOS

### MATERIALES

*Riñón embrionario humano:* se obtuvo a partir de un feto normal, de 22 semanas, del sexo masculino.

*Medios de cultivo:* se utilizaron los medios Ham F-10, Eagle MEM y Dulbecco MEM; suplementados con diferentes concentraciones de suero bovino fetal (SBF) (Sigma).

### PROCEDIMIENTO

#### *Preparación del cultivo primario*

Se obtuvo el riñón, con todas las condiciones de asepsia y antisepsia, en un flujo de aire laminar y se colocó el órgano en solución salina buferada (PBS) con antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomycin y 2,5 mg/mL de anfotericín B).

Se preparó el tejido en placas de Petri, lavándolo varias veces con PBS con antibióticos. Se eliminó el tejido de los cálices, la cápsula y la pelvis renal, dejando solo el parénquima, el cual se fragmentó en piezas pequeñas de 1-2 mm<sup>2</sup>.

Se colocaron 25-30 piezas en una placa de Petri que contenía 1 mL de medio Ham F-10 suplementado con 50 % de suero bovino fetal (SBF). Se inclinó la placa para esparcir las piezas uniformemente y se incubó a 37 °C en atmósfera

de 5 % de CO<sub>2</sub>, hasta que las piezas se adhirieron al soporte. Después se añadió medio de cultivo Ham F-10 hasta completar 5 mL.

Se hizo cambio de medio de cultivo (Ham F-10 suplementado con 10 % de SBF) a las 24 h para eliminar los detritos celulares y se dejaron crecer bajo las mismas condiciones.

#### *Obtención de la línea diploide. Selección del medio de cultivo*

Cuando las células cubrieron 50 % de la superficie del soporte, se disgregaron, diluyeron y pasaron a un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, y se incubaron a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> hasta la formación de una monocapa. En este momento se comenzó a llevar en paralelo en 2 medios de cultivo: el Ham F-10 utilizado durante la obtención del cultivo primario y el Eagle MEM.

Se continuaron haciendo subcultivos (anexo 3) en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, hasta el pase 3 en el que se congelaron 2 lotes de células en sus respectivos medios según el método descrito por Bird.<sup>14</sup>

A partir del subcultivo 3 se continuaron los pases en medio Eagle MEM con *split* 1:2 a 1:3, y en el subcultivo 4 se comenzó a pasar paralelamente con Dulbecco MEM suplementado con 10,0 % de SBF.

En el subcultivo 6 con Eagle MEM y 10,0 % de SBF se acortó el *split* a 1:1 y se amplió el tiempo de cultivo en los pases hasta el subcultivo 8 en que se retomaron las condiciones iniciales, manteniéndose en el subcultivo 9, en el que se preparó un lote de células criopreservadas, y continuando hasta el subcultivo 15.

#### *Morfología*

Se determinó qué tipo de célula predominaba, fibroblástica o epitelial por observación directa de las células del cultivo primario y de los subcultivos del 9-11 a través del microscopio invertido Olympus CK 2 con aumento 40x.

#### *Cariotipo*

Se utilizaron células mitóticas en metafase del cultivo primario y del subcultivo 15, siguiendo la técnica descrita por Bird y Forrester.<sup>14</sup>

### *Determinación de contaminantes e infección por micoplasmas*

De un frasco con cultivo del pase 9 se preparó una suspensión celular, se eliminó 2/3 del medio de cultivo, se desprendieron las células con un plicia y se mezclaron bien en el 1/3 del medio que quedó en el frasco. Se inoculó en diferentes medios diagnósticos en busca de contaminantes. Para bacterias se inoculó 0,5 mL y 0,2 mL en caldo tioglicolato y en agar sangre respectivamente y se incubaron a 37 °C durante 2 semanas. Para hongos se utilizó caldo Saboureaud incubado a 22-25 °C por 21 d. Para micoplasmas se sembró 0,1 mL en agar PPLO y se incubó a 37 °C en aerobiosis y con atmósfera de CO<sub>2</sub> durante 3 semanas. También se sembró en caldo PPLO a 37 °C subcultivándose en agar PPLO a los 6-7 d. Finalmente, se procedió a la extracción de ADN para una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (*primer* genérico).

Para detectar virus, se inocularon 6 tubos con células MDCK con 200 µL de la suspensión celular, se incubaron a 33-35 °C durante 21 d. Igualmente se procedió con células MRC-5 y Vero pero incubadas a 37 °C.

A 2 tubos de cada línea celular sembrados con la suspensión celular se les hizo la prueba de hemadsorción (Had) con eritrocitos de curiel 0,5 % según el método de *Lenette*<sup>8</sup> y el resto se observó diariamente para detectar la aparición de ECP.<sup>16</sup>

En todas las pruebas se utilizaron controles negativos, inoculando medio de cultivo estéril en las mismas cantidades que la suspensión celular.

*Viabilidad poscongelación:* se determinó la viabilidad por medio de conteo en cámara de Newbawer empleando azul de Trypan 3 % como colorante vital, y se calculó según la fórmula de Paul.<sup>14</sup>

$$\% \text{ células viables} = \frac{\text{células viables (sin colorear)} \times 100}{\text{Células viables} + \text{Células muertas (coloreadas)}}$$

### *Tumorigenicidad*

Se realizó el método de formación de colonias en agar suave modificado por la utilización de medio MEM Dulbecco.<sup>17,18</sup> Las células se sembraron a razón de 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> y 10<sup>2</sup> por pozo de 15 mm de diámetro. Se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y

se observaron a los 3, 7, 10 y 14 d después de sembradas. Las colonias de más de 16 células fueron contadas a los 14 d y fue calculada la eficiencia de clonaje (EC)<sup>19</sup> mediante la fórmula:

$$EC = \frac{(\text{número de colonias} \times 16 \text{ células}) \times 100}{\text{número de células sembradas}}$$

## RESULTADOS

### OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR PRIMARIO

Se obtuvo un cultivo celular primario a partir de un riñón de un feto humano normal, del sexo masculino y de 22 semanas de edad. La técnica empleada fue el cultivo de explanto.

### OBTENCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR DIPLOIDE A PARTIR DEL CULTIVO PRIMARIO

En el subcultivo 3 se dio por obtenida una línea diploide, fue denominada Mag. En los subcultivos 9-13 se hicieron todos los estudios de caracterización.

### *Morfología*

Las células fibroblásticas fueron las que caracterizaron a la línea celular Mag (fig.)



Fig. Morfología fibroblástica de la línea celular Mag.

### *Medios de cultivo*

Las características del crecimiento durante el proceso de obtención de la línea celular Mag aparecen en la tabla 1.

**TABLA 1.** Características del crecimiento durante el proceso de obtención de la línea celular Mag

Pase	Característica	Medio de cultivo	Cambio de medio	Split
1-3	Monocapa en 6-7 d	Ham F-10 90 %; SBF 10 %; sin antibióticos	4d	1:2 a 1:3
4-15	Monocapa en 6-7 d	Eagle MEM 90 %; SBF 10 %; sin antibióticos	4 d	1:2 a 1:3
1-15	Monocapa en 6-7 d	Eagle MEM 90 %; SBF 10 %; sin antibióticos	4 d	1:2 a 1:3

El medio de cultivo Ham F-10, suplementado con 10,0 % de SBF sin antibióticos, fue el utilizado en un lote de los subcultivos 1-3, pero fue sustituido por Eagle MEM 90,0 %, SBF 10,0 %, sin antibióticos a partir del subcultivo 4 y este último medio también fue utilizado en otro lote desde el subcultivo 1 hasta el 15, lográndose la formación de monocapas con ambos medios, lo que no ocurrió con el medio Dulbecco MEM suplementado con SBF y Hepes. Se hizo cambio de medio a los 4 d, con uno adicional el séptimo día al frasco con Dulbecco MEM, de acuerdo con las características del crecimiento y al pH del medio de cultivo.

### Split

El *split* utilizado fue siempre 1:2 a 1:3.

### Cariotipo

El número diplode de cromosomas ( $2n=46$ ) característico de la especie humana, fue el que predominó en más de 75,0 % de las 50 células del subcultivo 15 que se sometieron al examen del cariotipo. Previamente se había hecho el cariotipo al cultivo primario con este mismo resultado. Esto permitió clasificar la línea celular como diploide.

La frecuencia de distribución de los cromosomas del cariotipo hecho al subcultivo 15 fue la siguiente:

50 células 2 1 1 2 39 1 2 2

# de cromosomas 41 43 44 45 46 47 50 52

### Viabilidad poscongelación

Se congelaron células a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  de los subcultivos 3 y 9. Se hicieron descongelaciones de ambos subcultivos a los 3 meses. La viabilidad poscongelación de estos subcultivos en ese tiempo fue de 60,0 %.

### Contaminaciones

En la tabla 2 aparecen los resultados de las pruebas hechas en el subcultivo 9 en busca de contaminantes. Como se puede apreciar estas células se mostraron libres de contaminantes bacterianos, micóticos, virales y de micoplasmas.

**TABLA 2.** Pruebas para detectar contaminantes en la línea celular Mag

Medios de cultivo/diagnóstico	Resultados
Caldo tioglicolato	No crecimiento bacteriano
Agar sangre	No crecimiento bacteriano
Sabouraud agar	No crecimiento de hongos
PPLO agar	No crecimiento de micoplasmas
RCP micoplasmas	Negativo
Línea celular Vero	No ECP / Had negativa
Línea celular MDCK	No ECP / Had negativa
Línea celular MRC-5	No ECP / Had negativa

### Tumorigenicidad

Las células Mag y MRC-5 (ATCC CCL171)<sup>15</sup> se multiplicaron hasta formar colonias de 4 a 8 células que detuvieron su crecimiento a partir del séptimo día, mientras que las HeLa se multiplicaron hasta formar 710 colonias de más de 16 células, obteniéndose como promedio  $713 \pm 8$  colonias en la dilución  $10^3$  y  $65 \pm 4$  en  $10^2$ ; en las diluciones  $10^4$  y  $10^5$  las colonias fueron incontables.

Para la líneas celulares Mag y MRC-5 la EC fue 0 y para HeLa fue de 70,0 %.

### DISCUSIÓN

Existen varias formas de disgregar los tejidos, de las cuales la menos agresiva es el cultivo de explantos. Teniendo en cuenta que las células embrionarias para cultivo primario son muy frágiles, se decidió utilizar esta técnica para obtener el cultivo primario y los resultados obtenidos demuestran que fue una buena selección.<sup>7</sup>

La composición del medio de cultivo es hasta ahora el factor más importante en el cultivo de células animales.<sup>20</sup> Las principales funciones de los medios de cultivo celulares son mantener el pH y la osmolaridad esenciales para la viabilidad celular y aportar los nutrientes y energía necesarios para el crecimiento y la multiplicación celular. El medio de cultivo Ham F-10 se ha diseñado para los cultivos celulares libres de suero, y por lo tanto es un medio muy rico en nutrientes. *Leppendinger* recomienda el uso del medio de cultivo Ham F-10 o algunos de sus derivados para hacer los cultivos primarios de células adherentes.<sup>20-23</sup>

La mayoría de los medios basales para cultivos celulares no permiten el crecimiento de células por sí mismos y es práctica común suplementar los medios de cultivos celulares con sueros animales.<sup>14,20</sup> *Cartwright*, basado en los trabajos de *Eagle* plantea que esta suplementación es necesaria para suministrar factores no identificados, pero esenciales para lograr un crecimiento celular eficiente.<sup>24</sup> *Bird* señala que el suero de los animales más jóvenes promueve un mejor crecimiento celular y es menos probable que contengan sustancias que interfieran en dicho crecimiento. El suero bovino fetal es el preferido, debido a su falta de inmunoglobulinas y a su reputación por no inhibir el crecimiento de virus en células cultivadas en medios que lo contienen. *Bird* y *Cartwright* expresan que el medio de crecimiento debe contener, como regla general, 10,0 % de suero. Por todo esto fue que se suplementó el medio Ham F-10 con 10,0 % de SBF.<sup>14,20</sup>

Según *Sato*, cuando se cultivan células de órganos y tejidos en medios nutrientes suplementados con suero, los fibroblastos crecen con rapidez a partir del explanto y se convierten en el tipo celular predominante. *Koneman*, *MacDonald* y *Bird* afirman que los cultivos primarios tienen una mezcla de tipos celulares. Estos criterios confirman el predominio de células fibroblásticas, con escasas células epiteliales que tuvo el cultivo primario de este estudio. Coincidiendo con los resultados de este trabajo, *Castillo* y otros crearon un banco de células primarias de riñón de perro con heterogeneidad morfológica de la monocapa.<sup>6,7,10,13,14</sup>

A pesar de que por definición, se obtiene una línea celular desde el primer subcultivo exitoso a

partir del primario, no fue hasta el subcultivo 3 que se decidió dar por obtenida la línea celular diploide, la cual se denominó Mag.

En este trabajo se llegó hasta el subcultivo 15, realizando la caracterización biológica de la línea celular entre los subcultivos 9-13.

La ausencia de líneas diploides de riñón humano en los catálogos de la ATCC de 1992 y 1994 es indicadora de lo laborioso de la obtención de estas, por lo que la conducta seguida parece haber sido adecuada para salvar las dificultades durante los subcultivos seriados que formaron parte del trabajo.<sup>25</sup>

En cuanto a la morfología de la línea Mag, se plantea que después que las células de un explanto se subcultivan, los fibroblastos son los únicos que sobreviven. De ahí que las líneas celulares que están adaptadas al cultivo seriado tienden a ser de un solo tipo celular, usualmente fibroblastos en las líneas celulares diploides.<sup>10,14</sup> Además son las células menos difíciles de propagar en medios que contienen suero.<sup>6</sup> Lo anteriormente dicho reafirma el resultado de que las células que caracterizaron la línea celular Mag fueron fibroblásticas. Comparando la morfología de la línea celular de este estudio con la de otras líneas celulares diploides se tiene que *Castillo* y *Morier* obtuvieron una línea de pulmón embrionario humano con morfología fibroblástica; MRC-5 (ATCC CCL171), WI-38 (ATCC CCL75) y FRHL-2 (ATCC CL-160) también muestran esta morfología.<sup>26</sup>

El medio de cultivo Ham F-10, suplementado con 10,0 % de SBF sin antibióticos, fue el utilizado en un lote de los subcultivos 1-3 de Mag, pero fue sustituido por Eagle MEM 90,0 %, SBF 10,0 %, sin antibióticos a partir del subcultivo 4 y este último medio también fue utilizado en otro lote desde el subcultivo 1 hasta el 15, lográndose la formación de monocapas con ambos medios, lo que no ocurrió con el medio Dulbecco MEM suplementado con SBF y Hepes. Se hizo cambio de medio a los 4 d, con uno adicional el séptimo día al frasco con Dulbecco MEM, de acuerdo con las características del crecimiento y al pH del medio de cultivo.

*Sato* plantea que los medios nutrientes comúnmente usados son óptimos para el crecimiento de las líneas celulares fibroblásticas, otros autores recomiendan el uso del medio Eagle MEM para el cultivo de células fibroblásticas de

mamíferos, y se ha reportado que los fibroblastos fetales humanos logran mejor morfología y nivel de doblaje de la población con el medio de cultivo Eagle MEM.<sup>6,20</sup> *Sumbilla* y otros demostraron que los fibroblastos diploides humanos encuentran su energía casi totalmente por glicólisis anaerobia y oxidación de glutamina. Por todas estas razones fue que se decidió sustituir el medio de cultivo Ham F-10 por Eagle MEM para continuar desarrollando la línea celular Mag. Además, hay que tener en cuenta que dadas las características del medio Ham F-10, este resulta muy costoso en comparación con Eagle MEM.<sup>27</sup>

Los autores de este trabajo piensan que no se obtuvo igual resultado con el medio Dulbecco MEM debido posiblemente a que este medio estaba suplementado con Hepes, un tampón orgánico sintético que según *Lennette* no es fisiológicamente inerte y puede afectar el cultivo celular.<sup>8</sup>

Se suplementó el medio Eagle MEM con SBF 10,0 % como medio de crecimiento y 2,0 % como medio de mantenimiento de la línea celular Mag como lo utilizan la mayoría de las líneas similares mencionadas anteriormente.

Con el *split* 1:2 a 1:3 en las células Mag se obtiene la confluencia adecuada al cabo de una semana; sin embargo, cuando este se violentaba más allá de 1:3 se ponía en riesgo la supervivencia celular. El *split* es una característica innata que varía de una línea celular a otra, incluso entre las diploides; así vemos que MRC-5 (ATCC CCL 171) tiene un *split* 1:2 a 1:5, WI-38 (ATCC CCL75) de 1:3 a 1:5, FRHL-2 (ATCC CL-160) de 1:2 a 1:3, y PHuE-1 de pulmón humano, obtenida por *Castillo* y *Morier*, tiene un *split* de 1:3 a 1:6. El *split* de la línea celular Mag responde a lo dicho por *Lennette*.<sup>8,15,26</sup>

La viabilidad poscongelación de los subcultivos 3 al 9 fue de 60,0 %. Se encontraron diferentes resultados de la viabilidad poscongelación en otras líneas celulares: MRC-5 (ATCC CCL171) tiene una viabilidad de aproximadamente 95,0 %, WI-38 (ATCC CCL 75) de 90,0 % y FRHL-2 (ATCC CL-160) de 81,0 %.<sup>15</sup>

Se trató de explicar esas diferencias en la viabilidad entre estas líneas celulares y la obtenida aquí, basados en los estudios realizados por otros autores según los cuales la viabilidad celular consecutiva a la descongelación constituye un rasgo

particular de cada línea. Además, *McAteer* plantea que el eflujo de agua es la clave en estos procesos y existen varios factores que la afectan, de ahí que los resultados sean diferentes.<sup>28</sup>

La no detección de contaminaciones bacterianas, micóticas y por micoplasmas en el subcultivo 9 de la línea celular Mag avala la realización de buenas técnicas asépticas. Además, el hecho de no encontrar posibles contaminaciones virales confirma que no hubo contaminación cruzada y que el tejido de origen era totalmente normal.

La tumorigenicidad se realizó por la potencialidad de las líneas diploides de ser utilizadas como sustratos en la producción de vacunas vivas atenuadas.

La formación de colonias celulares en agar suave es una manifestación de la no dependencia del anclaje, lo cual es característico del crecimiento *in vitro* de las células malignas. Los organismos regulatorios internacionales han aprobado la técnica *in vitro* como válida en la determinación de la tumorigenicidad celular y autores como *Swason* y otros estudiaron el potencial tumorigénico de las células Vero mediante el método *in vivo* y la formación de colonias celulares en agarosa suave y obtuvieron resultados similares por ambos métodos. Por este motivo se utilizó este último método para determinar el potencial tumorigénico de las células Mag. Como las líneas diploides se originan de tejido normal y se mantienen normales a través de los subcultivos, estas no se muestran invasivas por lo que la EC debe ser 0.<sup>14,18,19,29</sup>

Se impone en estudios posteriores determinar la utilidad de la línea Mag para el aislamiento y la multiplicación de diferentes grupos virales, como pueden ser los virus causantes de infecciones respiratorias. Hasta el momento, se cuenta con una nueva línea diploide que pudiera aumentar la batería de sistemas celulares para las investigaciones virológicas.

#### SUMMARY

A new diploid cell line of human embryonic kidney was obtained by serial subcultures (Mag) starting from a primary culture. It was prepared by applying the explant technique instead of the classical enzymatic digestion with trypsin. The stabilization process of the diploid line after the "secondary culture" was attained between the passes 6 and 7. 3 culture media were tested during the process. Only the MEM was completely satisfactory.

The biological characteristics of the new line were as follows: fibroblastic morphology, Eagle MEM culture mean with 10 % of SBF, split from 1:2 to 1:3, normal human carotype, postfreezing viability of 60 %, pollutant-free and non-tumorigenic. The cryopreserved Mag subcultures 11-13 were studied from the point of view of their usefulness for the diagnosis of different viral groups.

**Subject headings:** KIDNEY; CELL LINE; CRYO-PRESERVATION.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wigley CB. The cell culture laboratory. En: Davis JM, ed. Basic cell culture: a practical approach. Oxford: Oxford University Press; 1994.p.1-26.
- Mc Intosh K. Diagnostic virology. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, et al. eds. Fields Virology. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.p.401-30.
- Candurra NA. Cultivo de virus. En: Basualdo JA, Coto CE, Torres RA de, eds. Microbiología Biomédica. Buenos Aires: Atlante;1996.p.535-50.
- Planes N, Pirola DA. Diagnóstico virológico. En: Basualdo JA, Coto CE, Torres RA de, eds. Microbiología Biomédica. Buenos Aires: Atlante;1996.p.598-607.
- Atmar RL, Englund JA. Laboratory methods for the diagnosis of viral diseases. En: Evans AS, Kaslow RA, eds. Viral Infections of Human Epidemiology and Control. 4ª ed. New York: Plenum Medical Book;1997.p.59-88.
- Sato JD, Hayashi I, Hayashi J, Hoshi H, Kawamoto T, McKeehan WL, et al. Specific cell types and their requirements. En: Davis JM, ed. Basic cell culture: a practical approach. Oxford: Oxford University Press;1994.p.181-222.
- MacDonald C. Primary culture and the establishment of cell lines. En: Davis JM, ed. Basic cell culture: a practical approach. Oxford: Oxford University Press; 1994.p.149-80.
- Lennette DA. General principles for laboratory diagnosis of viral, rickettsial, and chlamydial infections. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. 7ª ed. Washington, DC: American Public Health Association; 1995.p.3-25.
- Hayflick L, Morehead PS. The serial cultivation of human diploid cell strain. En: Kuchler RJ, ed. Animal cell culture and virology. Stroudsburg: Dowden, Hutchinson and Ross; 1974.p.86-100.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM, Winn WC. Diagnóstico microbiológico, texto y atlas color. 3ª ed. México, DF: Editorial Médica Panamericana; 1998.
- Smith TF. Laboratory diagnosis of viral infections. En: Howard BJ, Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC, eds. Clinical and pathogenic microbiology. 2ª ed. St Louis: Mosby; 1994.p.759-79.
- De Robertis EDP, De Robertis EMF. Biología celular y molecular. 10ª ed. La Habana:Editorial Científico-Técnica (Edición Revolucionaria); 1981.
- Castillo A, Morier L, Soler M, Guzmán MG, González Z. Obtención de células de riñón de perro Beagle puppie (RPB-1) y establecimiento de un banco criopreservado. Rev Cubana Med Trop 1995;47(3):199-201.
- Bird BR, Forrester FT. Basic laboratory techniques in cell culture. Atlanta: US Department of Health and Human Services (CDC); 1981.
- American Type Culture Collection. Catalogue of cell lines and Hibridomes. Maryland; 1994.
- Sanders FK. The presence of viruses in uninoculated tissue cultures: sources and methods of detection. En: Fogh J, ed. Contamination in tissue culture. New York: Academic Press; 1973.p.243-56.
- Macpherson I. Soft agar techniques. En: Kruse PF, Peterson MK, eds. Tissue Culture Methods and Applications. New York: Academic Press; 1973.p.276-80.
- Pérez EM, Aguilar A, Morier L. Evaluación de la tumorigenicidad "in vitro" de un Banco Celular Maestro de cultivo primario de riñón de perro Beagle. Vaccinmonitor 1998;7(11):2-3.
- Swason SK, Mento SJ, Weeks-Levy C, Brock BD, Kowal KJ, Wallace RE et al. Characterization of Vero cells. J Biol Standard 1988;16:311-20.
- Cartwright T, Shan GP. Culture media. En: Davis JM, ed. Basic cell culture: a practical approach. Oxford: Oxford University Press; 1994.p.57-91.
- Courtois Y, Noureux-Uhlrich S. Les facteurs de croissance et la culture de cellules. En: Adolphe M, Barlovatz-Meimon G, eds. Techniques en Culture de cellules animales, Methodologies Applications. Paris: Les Editions INSERM; 1988.p.17-28.
- Parker RC. Methods of tissue culture. 3ª ed. New York: Hoeber Medical Division, Harper and Row;1964.
- Gibco BRL. 1993-1994 Catalogue and reference guide. USA: Life Technologies; 1993.
- Eagle H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science 1955;122:501-4.
- American Type Culture Collection. Catalogue of cell lines and Hibridomes. Maryland; 1992.
- Castillo Alvarez A, Morier Díaz L. Obtención de una línea celular diploide de pulmón humano (PhuE-1). Rev Cubana Med Trop 1992;44(3):224-5.
- Sumbilla CM, Zielke CL, Reed WD, Ozand PT, Zielke HR. Comparison of the oxidation of glutamine, glucose, ketone bodies and fatty acids by human diploid fibroblasts. Biochim Biophys Acta 1981;675(2):301-4.
- McAteer JA, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. En: Davis JM, ed. Basic cell culture: a practical approach. Oxford: Oxford University Press; 1994.p.93-148.
- Levenbook IS, Petricciani JC, Elisberg BL. Tumorigenicity of Vero cells. J Biol Standard 1984;12:391-8.

Recibido: 2 de diciembre de 2002. Aprobado: 12 de octubre de 2003.

Lic. Luis Morier. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: 2020426. Correo electrónico: morier@ipk.sld.cu