



# ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS Y TRANSFECCIÓN CON EL VECTOR pTG13077 en *Ruditapes philippinarum*



Francisca Robles, Roberto de la Herrán, Alejandra Gutiérrez-Guerrero, Rafael Navajas-Pérez, Alexander García-Zea, José Luis Cortés y Carmelo Ruiz Rejón

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada, 18071, Granada. (frobles@ugr.es)

## INTRODUCCIÓN

En Acuicultura, los cultivos celulares son de gran interés ya que permiten el estudio de procesos relacionados con la actividad y división celular, la expresión génica y sirven como modelos para análisis en virología, inmunología o patología.

Se vienen realizando cultivos celulares de gran variedad de tejidos (manto<sup>1</sup>, hemocitos<sup>2</sup>, corazón<sup>3</sup>, branquia<sup>4</sup> o glandula digestiva<sup>5</sup>) en diferentes clases de moluscos bivalvos como en mejillones<sup>1,2,6,7</sup> (*Mytilus edulis* L. 1798, *M. galloprovincialis* Lamarck 1819, *Perna viridis* L. 1758 y *Dreissena polymorpha* Pallas 1771), vieira<sup>8</sup> (*Pecten maximus* L. 1758), ostra japonesa<sup>9</sup> (*Crassostrea gigas* Thunber 1973) o almeja fina<sup>10</sup> (*Ruditapes decussatus* L. 1758). En este trabajo hemos llevado a cabo el desarrollo y seguimiento de cultivos primarios de células de branquia y hemolinfa en la almeja japonesa *R. philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) (Fig1) con la idea de establecer futuras líneas celulares. También se ha puesto a punto la técnica de transfección de genes exógenos para futuros estudios de ingeniería genética.

## RESULTADOS

La disgregación del tejido branquial se realizó mediante tratamiento enzimático EDTA-Tripsina (éste no es necesario en el caso de la hemolinfa) obteniendo del orden de  $2,4 \times 10^5$  y  $9,8 \times 10^5$  células/ml de branquia y hemolinfa respectivamente (Fig2). Ambos tipos de células fueron cultivadas a 20°C en el medio DMEN suplementado con suero fetal bovino, antibióticos y glutamina. Se comprobó la viabilidad de las células en cultivo mediante la tinción con Hoechst (colorante fluorescente que se une al surco menor del ADN por lo que los núcleos intactos se ven redondos y ubicados en el centro de la célula) (Fig3) y con diacetato de fluoresceína (se hidroliza a fluoresceína por la acción de las esterasas en el citoplasma si la membrana celular está activa) (Fig4).



Fig1: Ejemplares de la especie *R. philippinarum*.

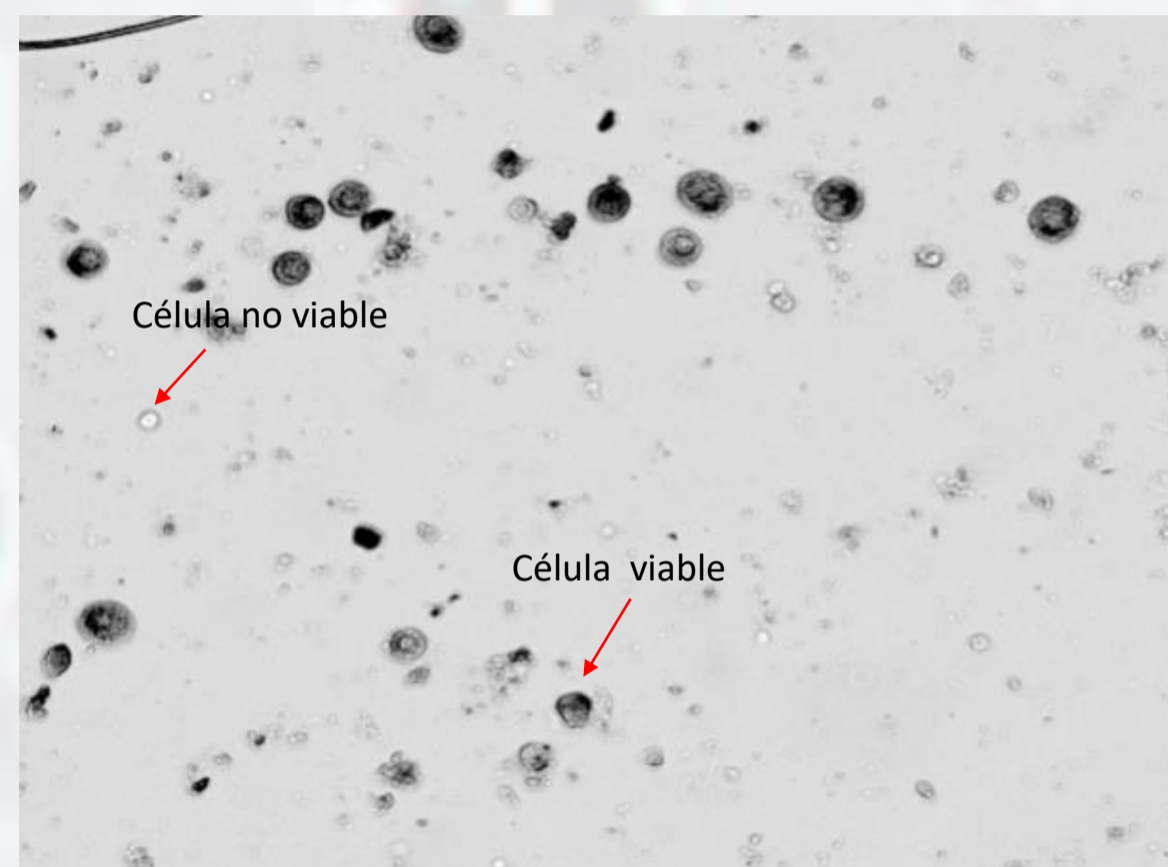


Fig2: Cultivo primario de células de branquia. Las flechas muestran un ejemplo de células viables y no viables.

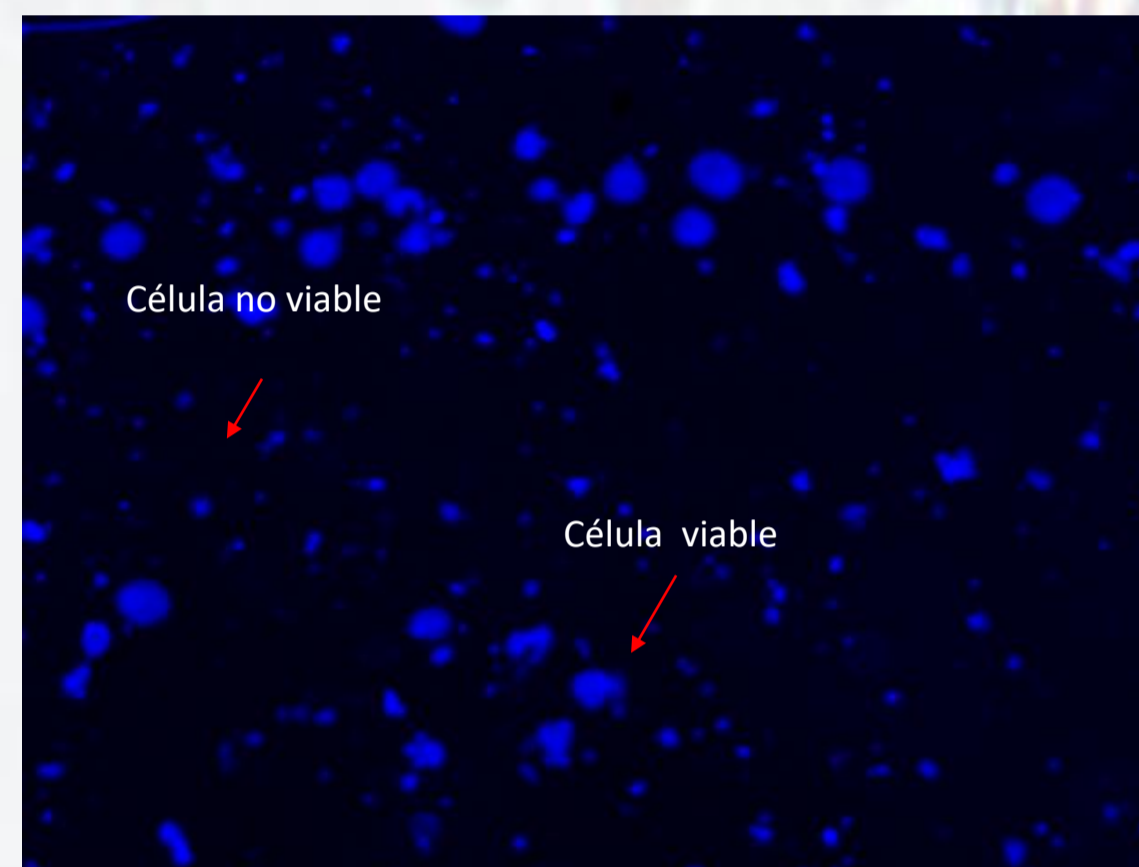


Fig3: Tinción de núcleos con Hoechst.

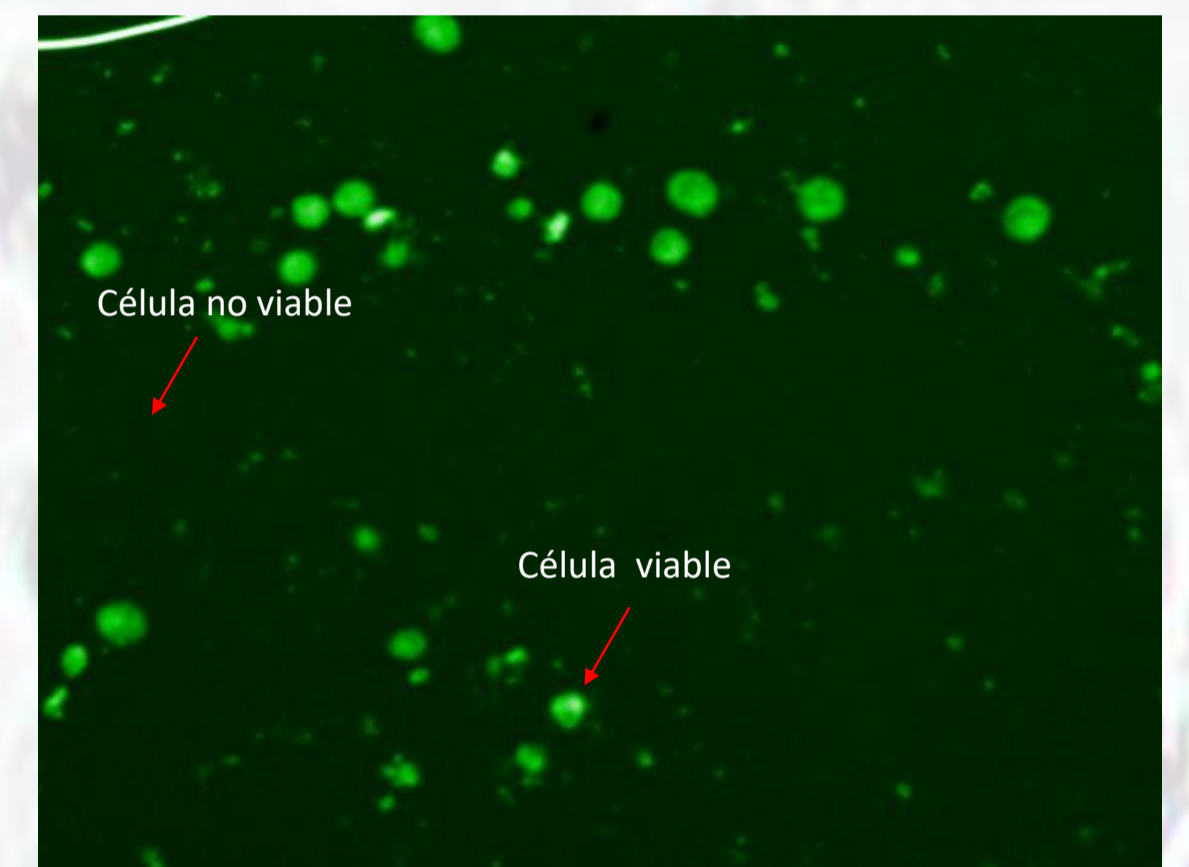


Fig4: Tinción del citoplasma con diacetato de fluoresceína.

Para los dos tipos celulares, hemos llevado a cabo un estudio del crecimiento del cultivo durante 15 días mediante el recuento del número de células y el análisis de la confluencia. El experimento se realizó iniciando el cultivo con siete diluciones seriadas del 50%. El crecimiento en branquia y hemolinfa fue muy similar, con un incremento de 1,5X en número de células y confluencia en branquia (Fig5), y de 1,8X en número de células y confluencia en hemolinfa (Fig6). Hasta el día 12 se produce crecimiento del cultivo tanto en branquia como en hemolinfa. A partir de ese día, los cultivos sufren un ligero descenso.

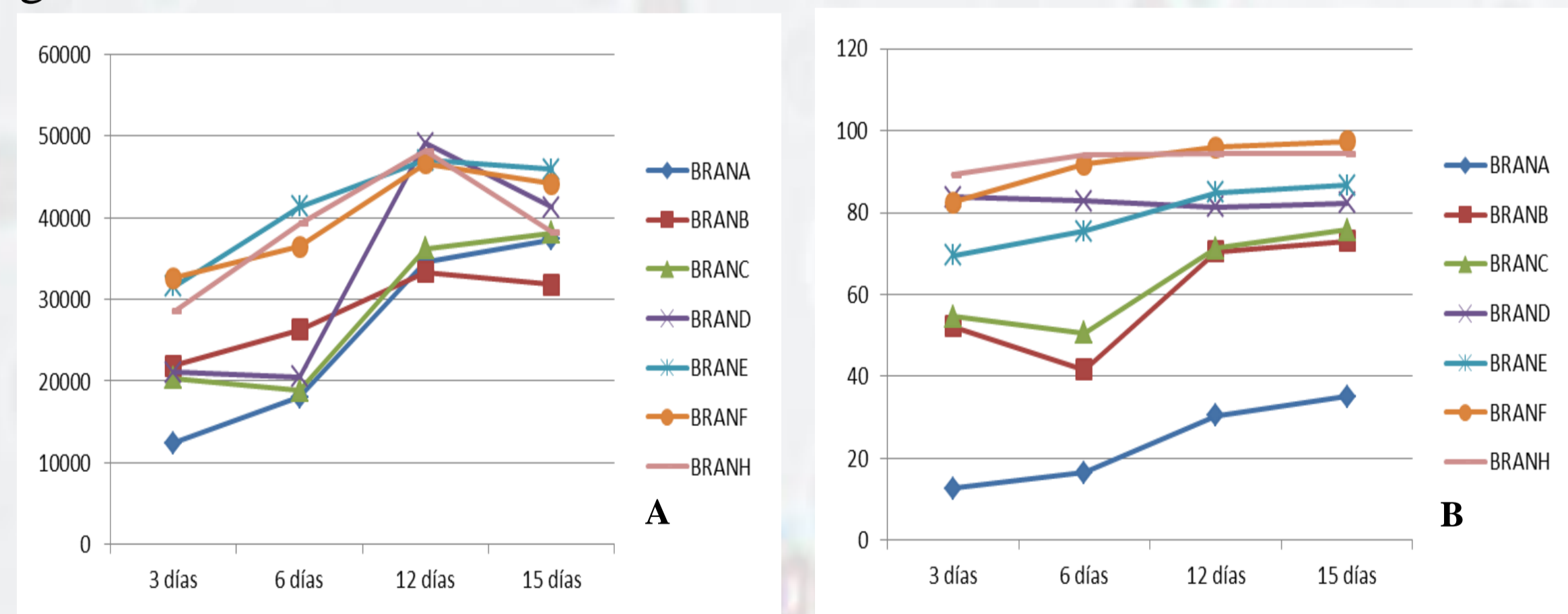


Fig5: Gráficas que representan el Número de células (A) y la Confluencia (B) en el cultivo de Branquia durante los 15 días.

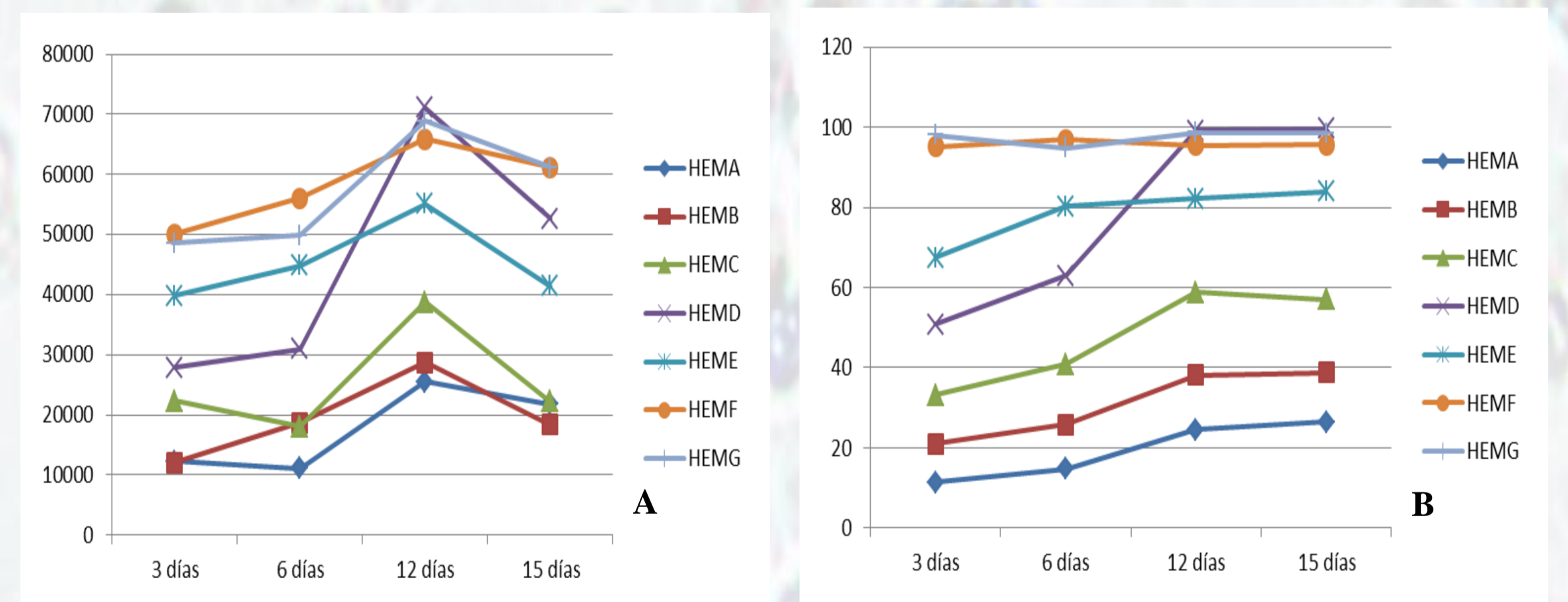


Fig6: Gráficas que representan el Número de células (A) y la Confluencia (B) en el cultivo de Hemolinfa durante los 15 días.

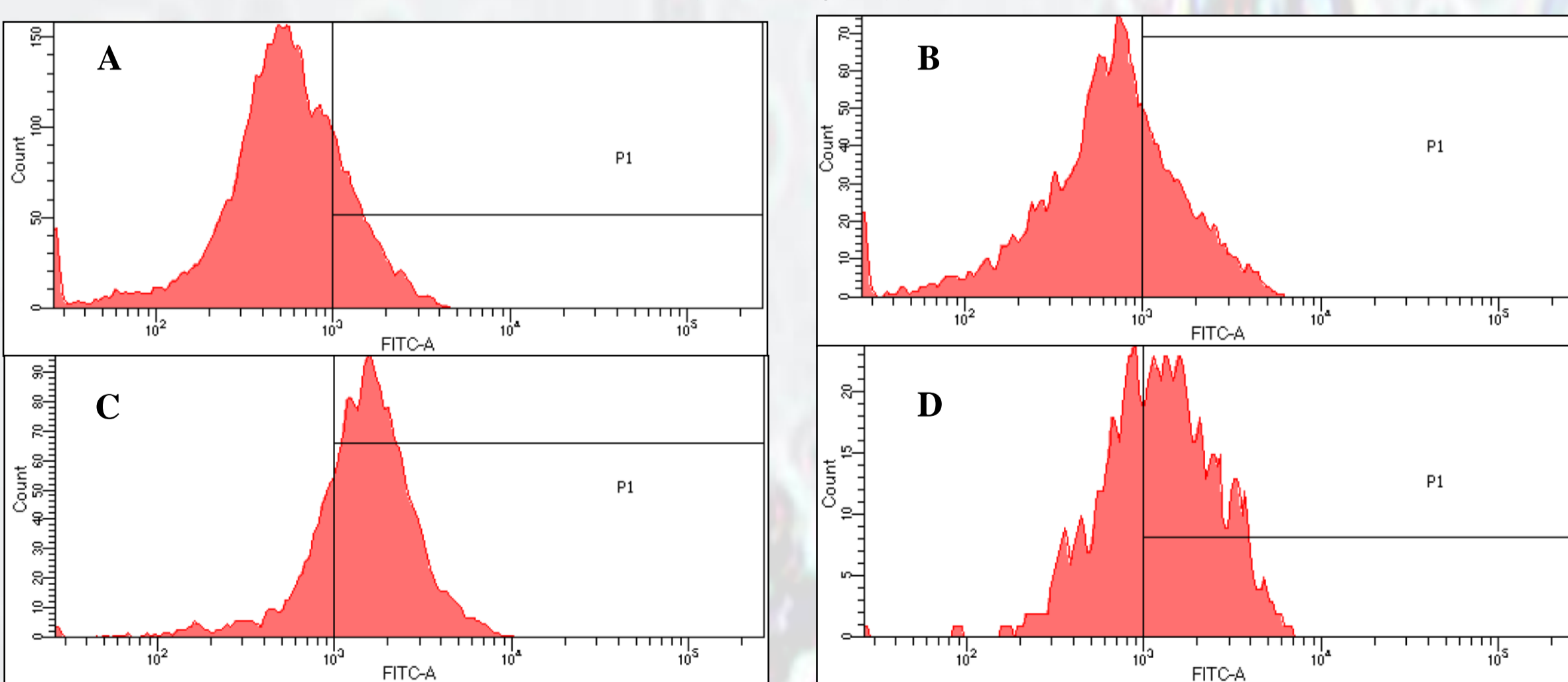


Fig7: Gráficas que representan el incremento de fluorescencia entre los controles negativos de Branquia (A) y Hemolinfa (B) y las muestras con mayor porcentaje de fluorescencia en Branquia (C) y Hemolinfa (D) respectivamente..

## REFERENCIAS

<sup>1</sup>Daugavet MA, Blinova MI (2015). Culture of mussel (*Mytilus edulis* L.) mantle cells. *Cell Tissue Biol* 9:233-243. <sup>2</sup>Cao A, Mercado L, Ramos-Martínez JI, Barcia R (2003). Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: expression of IL-2R $\alpha$  subunit. *Aquaculture* 216: 1-8. <sup>3</sup>Le Marrec-Croq F, Glaise D, Guguen-Guillouzo C, Chesne C, Guillouzo A, Boulo V, Dorange G (1999). Primary cultures of heart cells from the scallop *Pecten maximus* (mollusca bivalvia). *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35:289-295. <sup>4</sup>Katsumiti A, Berhanu D, Howard KT, Arostegui I, Oron M, Reip P, Valsami-Jones E, Cajaraville MP (2014). Cytotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to mussel hemocytes and gill cells in vitro. *Nanotoxicology* 9:543-553. <sup>5</sup>Faucet J, Maurice M, Gagnaire B, Renault T, Burgeot T (2004). Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis*. *Methods Cell Sci* 25:177-184. <sup>6</sup>Wang J, Dong B, Yu ZX and Yao CL (2018). The impact of acute thermal stress on green mussel *Perna viridis*: Oxidative damage and responses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 222:7-15 <sup>7</sup>Quinn B, Costello MJ, Dorange G, Wilson JG, Mothersill C (2009). Development of an in vitro culture method for cells and tissues from the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Cytotechnology* 59:121-134. <sup>8</sup>Le Pennec G and Le Pennec M (2001). Evaluation of the toxicity of chemical compound using digestive acini of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. maintained alive in vitro. *Aquat Toxicol* 53:1-7. <sup>9</sup>Domart-Coulon I, Doumenc D, Auzoux-Bordenave S, Le-Fichant Y (1994). Identification of media supplements that improve the viability of primary cell cultures of *Crassostrea gigas* oysters. *Cytotechnology* 16:109-120. <sup>10</sup>Hanana H, Talarmin H, Pennec JP, Droguet M, Gobin E, Marcorelle P, Dorange G (2011). Establishment of functional primary cultures of heart cells from the clam *Ruditapes decussatus*. *Cytotechnology* 63:295-305.