

Implementación de estrategias *in vitro* para evaluar la funcionalidad de un suero fetal bovino colombiano

Linamaría Escobar M.^{1,2}, Sandra Morantes^{2,3}, Claudia P. Cordero^{2,4},
Fabio A. Aristizábal².

¹ Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C., Colombia.

² Grupo de Farmacogenética del Cáncer. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: faaristizabalg@unal.edu.co.

³ Fundación Universitaria San Martín, Bogotá, D. C., Colombia.

⁴ Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, D. C., Colombia.

Recibido para evaluación: 8 de junio de 2011.

Aceptado para publicación: 26 de septiembre de 2011.

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados de las pruebas biológicas realizadas para evaluar la funcionalidad y desempeño del suero fetal bovino de fabricación nacional sobre el crecimiento de cultivos celulares con diversos requerimientos nutricionales. Realizando ensayos de eficiencia de clonaje, eficiencia de plaqueo y curvas de crecimiento sobre líneas celulares y fibroblastos, se demostró que el suero de fabricación nacional puede ser empleado en el cultivo continuo de las líneas A549, PC-3, HT-29, MDA-MB231 con un buen desempeño; y en fibroblastos, las células LSPG8G, MDBK e hibridomas puede ser usado siempre y cuando se emplee al 10% y se realicen cambios de medio al menos cada 48 horas. En ninguno de los ensayos se observó un efecto tóxico o adverso sobre el crecimiento de las células empleadas, aunque en algunos casos se observó una menor funcionalidad frente al crecimiento celular comparando los resultados con otros sueros calificados. Los resultados obtenidos destacan la utilidad del SFB nacional en la aplicación para la propagación de células poco exigentes en ensayos de corta duración, así como en procedimientos transitorios tales como la inactivación de la actividad enzimática de la tripsina y criopreservación.

Palabras clave: cultivo celular, crecimiento celular, bioensayos, suero fetal.

SUMMARY

Implementation of in vitro strategies to evaluate the functionality of a Colombian fetal bovine serum

In this work, we present the results of biological tests performed to evaluate the functionality and performance of fetal bovine serum produced in Colombia, on the growth of cell cultures with different nutritional requirements. Performing cloning efficiency tests, plating efficiency and growth curves of cell lines and fibroblasts, showed that the Colombian serum can be used with a good performance, in continuous culture of cell lines A549, PC-3, HT-29, MDA-MB231, in fibroblasts LSPG8G cells, MDBK and hybridomas can be used in a minimum concentration of 10% and medium every 48 hours. It should be noted that none of the treatments showed a toxic or adverse effect on the growth of the cells used, although in some cases had less functionality compared to cell growth by comparing the results with other qualified serum. Therefore, the Colombian showed to be suitable for the propagation of short-term culture cells, as well as transitional procedures such as trypsin inactivation, and cryopreservation.

Key words: cell culture, cell growth, bioassays, bovine serum.

INTRODUCCIÓN

El suero fetal bovino (SFB) es uno de los productos biológicos más empleados en el mantenimiento de cultivos celulares con aplicación en las áreas de inmunología, virología, ingeniería genética, farmacología y otras áreas de investigación biomédica. Este aporta factores de crecimiento, hormonas, minerales, lípidos y otros micronutrientes, que al ser usados en concentraciones apropiadas en el medio de cultivo, suplen satisfactoriamente los requerimientos metabólicos que garantizan la proliferación y adhesión celular (1-3).

En muchas de estas aplicaciones, la experimentación exige contar con un SFB altamente calificado, con control de calidad en todos sus procesos de obtención, comercialización, y que garanticen que el suero esté libre de agentes contaminantes que puedan representar riesgos para los diferentes tipos celulares a los cuales es aplicado de manera continua.

Aunque actualmente existen medios de cultivo libres de suero que permiten el crecimiento de algunos tipos celulares, éstos requieren ser suplementados con hormonas y

otros factores que están involucrados en diferentes procesos celulares. Sin embargo, la adición de estos suplementos aumenta los costos del cultivo y hace poco rentable el cultivo a gran escala en condiciones libres de SFB.

Además, muchos de los agentes que se emplean actualmente como suplemento en estos medios libres de suero son purificados a partir SFB, lo que impide su reemplazo definitivo (4).

Diferentes ensayos se han validado para controlar la calidad y probar la funcionalidad de sueros. Pruebas de estabilidad, pruebas para endotoxinas, de carga viral y análisis microbiológicos, han sido consistentemente empleadas para evaluar la calidad del suero, así como los ensayos de eficiencia de clonaje, de crecimiento y de plaqueo sugeridos para evaluar la funcionalidad (5, 6). Soportados en lo anterior, este trabajo se centró en implementar ensayos para evaluar y comparar la funcionalidad y desempeño del suero fetal de fabricación en Colombia, empleando como modelo de estudio líneas celulares con diferentes requerimientos nutricionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Las pruebas de funcionalidad del suero se realizaron empleando líneas celulares con diferentes requerimientos nutricionales y que proliferan formando monocapa o en suspensión. Estas se listan a continuación: adenocarcinoma de colon HT-29 (ATCC: HTB-38), carcinoma anaplásico de célula grande de pulmón LSPG8G, adenocarcinoma de mama MDA-MB231 (ATCC: HTB-26), adenocarcinoma de próstata PC-3 (ATCC: CRL-1435), un adenocarcinoma de pulmón A549 (ATCC: CCL-185), un cultivo de fibroblastos normales de pulmón humano MRC-5 (ATCC: CCL-171), una línea derivada de riñón bovino normal MDBK (ATCC: CCL-22) y un hibridoma, derivado de linfoblastos de bazo de ratón Sp2/0-Ag14 (ATCC: CRL-1581). Todas las líneas se importaron de la ATCC, excepto las células LSPG8G que se aislaron en nuestro laboratorio. Todas las células se emplearon de forma independiente para realizar ensayos de crecimiento, de plaqueo y de eficiencia de clonaje.

Sueros fetales bovinos

Para algunos ensayos, las células se propagaron en medios suplementados con diferentes SFB calificados, empleados y comercializados de manera continua en el país; estos se denotaron aleatoriamente: Suero 1, Suero 2 y Suero 3. En otros ensayos, las células se propagaron en medios suplementados con diferentes lotes de SFB fabricado

en Colombia; el consecutivo de los lotes y las fechas de vencimiento se reportan en la tabla 1. En todos los casos, el suero Gibco® se usó como suero de referencia.

Tabla 1. Lotes de SFB nacional empleados para realizar pruebas de funcionalidad.

Número de registro	1	2	3	4	5	6	7	8
Lote	L024-07	L032-08	L147-07	L141-07	L138-06	L125-07	L166-06	L076-10
Fecha de vencimiento	ene-2009	mar-2010	dic-2009	nov-2009	ago-2008	oct-2009	sep-2009	julio 2012

Mantenimiento general de cultivos celulares

Los cultivos celulares se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) (Sigma), suplementado con 5% a 10% de suero fetal bovino respectivo, penicilina 100 UI/mL y estreptomycin 100 µg/mL, en frascos de cultivo estériles de 75 cm² e incubadas en condiciones estándar (5% CO₂ en el aire, 37 °C y 100% de humedad relativa) (1). Las células A549, HT-29 y LSPG8G se propagaron en medio RPMI-1640 bajo las mismas condiciones anteriormente descritas.

Conteo y comprobación de viabilidad por azul de tripano

Para realizar cada una de las pruebas de funcionalidad del SFB colombiano, se cuantificó el número de células en cada cultivo y se verificó la viabilidad celular por azul de tripano. Para esto, los cultivos en 70% a 80% de confluencia se trataron con una solución de tripsina 0,025%-EDTA 0,03% (ácido etilendiamino tetracético) durante 5 minutos a 37 °C. De la suspensión obtenida por este tratamiento, se tomó una alícuota y se llevó a cabo una tinción con solución de azul de tripano al 0,4%. Usando una cámara de Neubauer se determinó la viabilidad celular y el número de células en cada cultivo.

Curvas de crecimiento celular

Para realizar este ensayo se emplearon las líneas celulares HT-29, PC-3, LSPG8G, MDBK y MDA-MB231. Todas las líneas inicialmente se privaron de suero, por al menos 48 horas (SFB 0,5%). Transcurrido este tiempo, las células se tripsinizaron, contaron y sembraron en placas de 96 pozos (una placa por cada 24 horas de cultivo) a una densidad de 1.500 células por pozo. Cada línea celular se inoculó por cuadruplicado en 200 µL/pozo de medio suplementado con SFB referencia o el de fabricación nacional evaluando dos concentraciones, 5% y 10%. La influencia de los sueros 1, 2 y 3 también se evaluó, pero sólo sobre las líneas PC-3 y MDBK. Como control interno del ensayo, se monitoreó y comparó el crecimiento celular con suero de referencia al

0,5% (condición de privación). Para generar las curvas se realizó un seguimiento del crecimiento celular durante 96 y 144 horas, dependiendo de la línea.

Para cuantificar el crecimiento celular se empleó el método fluorométrico de tinción con resazurina descrito (7) y previamente adaptado al laboratorio por Escobar *et al.* (8). Para este ensayo, el medio con los diferentes sueros se reemplazó por una solución de resazurina, luego cada placa se incubó por 4 horas a 37 °C. La intensidad de fluorescencia emitida por cada pozo se cuantificó usando un lector de placas TECAN GENios. Este mismo procedimiento se repitió cada 24 horas hasta completar las 96 y 144 horas de cultivo. Los resultados obtenidos se graficaron en función del tiempo y a partir de la ecuación de la gráfica se calcularon los tiempos de duplicación para las líneas celulares cultivadas con los diferentes sueros.

Ensayo de promoción de crecimiento en fibroblastos diploides

Con el propósito de cuantificar la influencia de los lotes de SFB nacional en la proliferación de células con una alta exigencia de nutrientes, se cultivó por duplicado la línea celular MRC-5 en frascos de cultivo de 25 cm² a una densidad celular de 200.000 células/caja. Se realizó un cambio de medio MEM suplementado al 5% SFB cada tres días y una tripsinización cada siete días, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. En cada tripsinización se contaron las células en cámara de Neubauer. Estas mismas células se subcultivaron en cajas nuevas de 25 cm² estériles, sembrando la densidad celular inicial (200.000 células/caja). La misma metodología se empleó hasta cumplir con un tiempo de subcultivo de 21 días (10). El ritmo relativo de crecimiento se calculó así:

$$\frac{(\text{promedio de células en crecimiento con cada lote de SFB nacional})}{(\text{promedio de células en crecimiento con SFB de referencia})} \times 100$$

Con el fin de determinar el aumento o disminución en la proliferación celular ejercida por cada uno de los lotes, se realizó un análisis de varianza y se compararon los lotes mediante una prueba de *Dunnet*, comparando todos los lotes frente al suero de referencia.

Ensayo clonogénico

Para evaluar la eficiencia clonogénica, definida como la capacidad de cada lote de SFB para promover el crecimiento de líneas celulares formadoras de clones, se mantuvieron cultivos del hibridoma Sp2/0-Ag14 en dos densidades celulares: cinco y una célula por pozo, en placas de 96 pozos, de fondo plano, estériles. Sobre cada densidad celular se evaluó cada lote de SFB nacional y suero de referencia bajo dos concentraciones: 5% y 10% v/v en medio MEM. Las placas se incubaron por 21 días, al cabo de los cuales se

colorearon con resazurina y se leyó la intensidad de fluorescencia en el lector TECAN GENios. La eficiencia clonogénica para cada tratamiento se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Intensidad de fluorescencia en el pozo tratado con el lote de SFB nacional}}{\text{Intensidad de fluorescencia en el pozo tratado con SFB de referencia}} \times 100$$

Con el fin de determinar diferencias en el aumento o disminución de la formación de clones ejercida por cada uno de los lotes, se realizó una prueba de *Kruskal-Wallis*.

Ensayo de plaqueo

Para complementar los análisis de funcionalidad, se realizó un ensayo en el que se evaluó y comparó la capacidad que tiene la línea A549 para formar colonias en presencia de diferentes lotes del suero colombiano y el suero de referencia (11). Para realizar el ensayo, las células A549 se propagaron hasta confluencia en medio suplementado con SFB al 10% y antibióticos. Antes de comenzar el ensayo, el medio de propagación las células se privaron durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, las células se tripsinizaron, contadas en cámara de Neubauer e inoculadas en placas de 6 pozos con fondo plano a una densidad de 200 células /pozo. Cada lote de suero nacional se evaluó en dos concentraciones: 5% y 10% en un volumen final de 5 mL de medio. Las placas luego se incubaron durante 12 días. Cumplido este tiempo de incubación, el medio se retiró y las colonias presentes en cada pozo se fijaron y se colorearon con una solución de azul de metileno. El número de colonias observado para las células propagadas con los diferentes lotes de suero nacional y el suero de referencia se comparó empleando una prueba *Tukey*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en eficiencias de plaqueo relativas (EPR), las cuales se calcularon así:

$$\text{EPR} = \frac{\text{Porcentaje de eficiencia de plaqueo suero nacional}}{\text{Porcentaje de eficiencia de plaqueo suero de referencia}}$$

$$\text{Porcentaje de eficiencia de plaqueo} = \frac{\text{Número de Colonias/pozo}}{\text{Número de células viables inoculadas/pozo}} \times 100$$

Cuantificación de proteína total

Para determinar el contenido de proteína total se usó el kit Quant-iT™ Protein Assay y el fluorómetro Qubit™ fluorometer (Invitrogen®) empleado según protocolo del fabricante (12). Para la cuantificación de la proteína total de cada muestra se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de la muestra} = (\text{medida obtenida en Qubit}) \left(\frac{200}{X} \right) 100$$

Donde, X = número de mL adicionados al tubo de ensayo.

Todas las mediciones se realizaron por triplicado para cada lote de suero nacional y para una muestra del suero 1, suero 2, suero 3 y de referencia. Los valores obtenidos se expresaron en g/L.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curvas de crecimiento celular

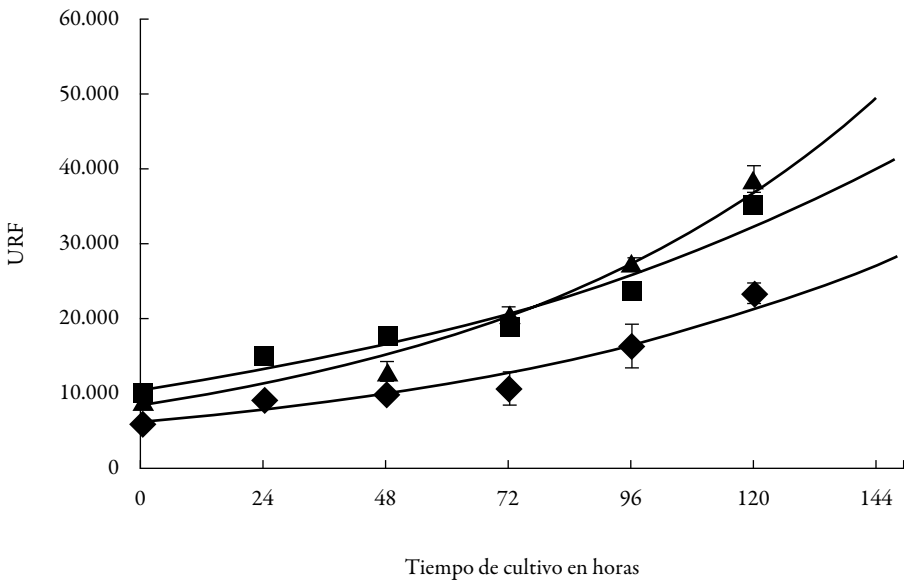
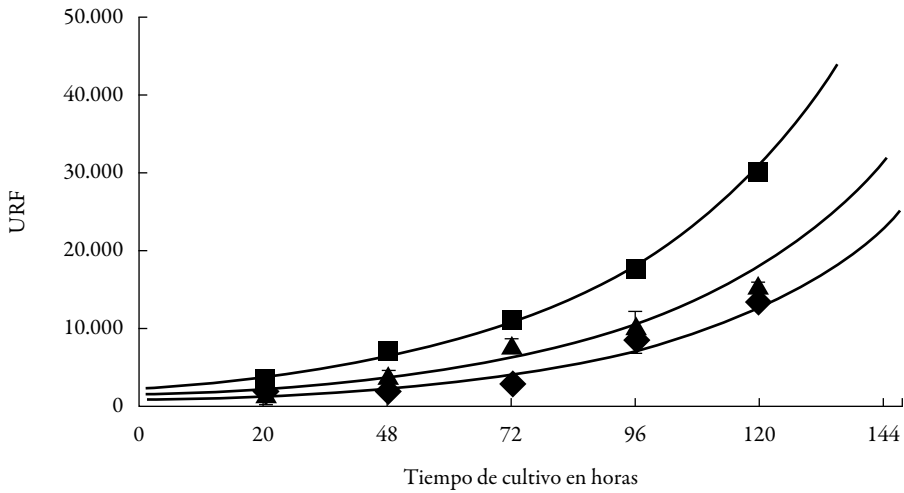
Los resultados de esta prueba mostraron que las líneas celulares HT-29, PC-3, LSPG8G, MDBK y MDA-MB231 bajo nuestras condiciones de ensayo proliferan satisfactoriamente en medios suplementados con suero nacional. Además, se comprobó que las células crecen sin que se presenten cambios en su morfología, daños a nivel celular o alteraciones en su capacidad metabólica.

Para generar las curvas de crecimiento, cada 24 horas se hizo una lectura de la fluorescencia emitida por las células que metabolizaron la resazurina, y el aumento en las unidades relativas a la fluorescencia (URF) se tomó como una medida indirecta del crecimiento celular (7). Al graficar la URF en función del tiempo de cultivo, las curvas se ajustaron a una tendencia exponencial, aunque la pendiente de las gráficas difirió entre líneas, marcas de suero y concentración evaluada.

En la figura 1 se graficaron los resultados obtenidos para las líneas celulares HT-29, PC-3 y LSPG8G propagadas con el suero de referencia y suero nacional al 10%. Los resultados obtenidos para las líneas MDBK y MDA-MB231 se compararon con los observados para el resto de las líneas. La ecuación de las gráficas y los valores de R^2 obtenidos con cada una de las curvas se resumen en las tablas 2 y 3. Cabe notar que la tendencia exponencial también se observó para líneas propagadas en medios suplementados con suero al 0,5% (condición de privación), aunque se observó una disminución en las URF obtenidas en cada punto de la curva (figura 1). También fue evidente una disminución, o en otros casos, el no cambio en los valores de fluorescencia después de 96 horas de cultivo en las células MDBK y PC-3. Para el resto de las líneas esto se observó a las 120 horas de cultivo; incluso, en los ensayos realizados con el suero nacional. Esta tendencia observada en las curvas de crecimiento puede ser explicada, porque la confluencia en los pozos llega al 100% limitando el crecimiento celular o favoreciendo que las células

se desprendan del pozo por falta de espacio. Para ajustar los datos experimentales a la función exponencial, la lectura de las 144 horas no fue tomada en cuenta.

Los análisis de la funcionalidad del suero nacional se realizaron comparando el tiempo en que las células tardaron en duplicar su población. Despejando esta variable de las ecuaciones presentadas en las tablas 2 y 3, se determinó que en general el suero nacional presenta un buen desempeño sobre el crecimiento de las células empleadas en este estudio.



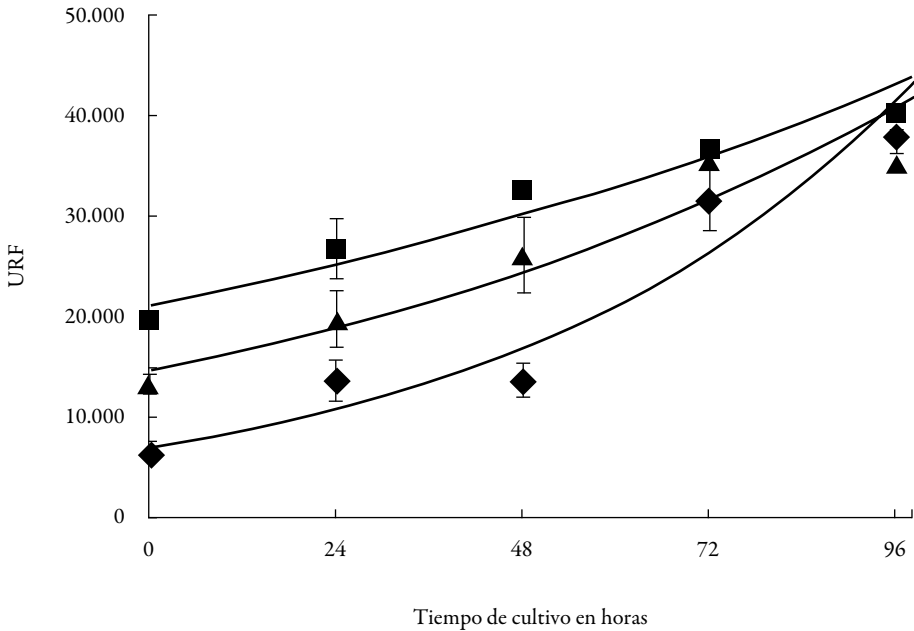


Figura 1. Curvas de crecimiento obtenidas para líneas celulares propagadas en SFB nacional, lote L076-10, durante 96 y 144 horas de cultivo continuo.

A. Células LSPG8G. B. Células PC-3 y C. Células HT-29, URF. Unidades relativas de fluorescencia. Cada punto en la gráfica representa el promedio de cuatro repeticiones \pm una desviación estándar. Cuadrados: SFB nacional 10%, triángulos: SFB, referencia 10%, rombos: control 0,5%. ****Figura 1****

Destacándose su funcionalidad sobre el crecimiento de las líneas HT-29 y MDA-MB231, sobre las que se evidenciaron TDP menores o iguales a los calculados para el suero de referencia tanto al 5% como al 10%. Al comparar los TDP obtenidos para el suero nacional, el suero de referencia y otros sueros que se comercializan en nuestro país, se encontró que las células MDBK son las que más tardan en duplicar su población celular empleando el suero nacional. Una representación gráfica de estas comparaciones y las diferencias en los TDP para otras líneas se presentaron en la figura 2.

En este ensayo también se comparó la variación del TDP calculado para las células PC-3 propagadas en medio suplementado suero nacional de dos lotes diferentes. Las células PC-3 2009 se propagaron con el lote 7 y las PC-3 2010 con el lote 8. Los resultados de esta prueba muestran que los TDP calculados para cada lote son comparables entre sí y que las diferencias en estos tiempos con respecto a los calculados para el suero de referencia también son mínimas, entre 12 y 22 horas, probando 5% y 10% (figura 2).

Tabla 2. Variaciones en los tiempos de duplicación poblacional calculados para dos líneas celulares propagadas con diferentes marcas comerciales de SFB y diferentes lotes de suero nacional.

Sueros	Líneas celulares					
	PC-3 2009			MDBK		
	$y = ce^{bx}$	R^2	TDP ^a	$y = ce^{bx}$	R^2	TDP
Referencia 5%	$12990e^{0,0114x}$	0,9901	60,80	$5729,4e^{0,0171x}$	0,9655	40,53
Referencia 10%	$8395,6e^{0,0138x}$	0,9922	50,23	$2057,9e^{0,025x}$	0,9876	27,73
Nacional 5% ^b	$16153e^{0,0094x}$	0,9809	73,74	$19027e^{0,0075x}$	0,9118	92,42
Nacional 10%	$14158e^{0,0107x}$	0,9714	64,78	$20696e^{0,007x}$	0,932	63,01
SFB 1 5%	$11073e^{0,0114x}$	0,932	63,01	$10628e^{0,0119x}$	0,969	58,25
SFB 1 10%	$11448e^{0,0112x}$	0,9357	61,89	$7440,6e^{0,0135x}$	0,9526	51,34
SFB 2 5%	$6435,8e^{0,0172x}$	0,9468	40,30	$14366e^{0,0101x}$	0,9633	68,63
SFB 2 10%	$4286,7e^{0,0194x}$	0,9042	35,73	$12733e^{0,0109x}$	0,972	63,59
SFB 3 5%	$6312,8e^{0,0101x}$	0,8531	68,63	$17852e^{0,0083x}$	0,963	83,51
SFB 3 10%	$5109,8e^{0,0113x}$	0,722	61,34	$16575e^{0,0091x}$	0,9622	76,17

^a TDP. Tiempos de duplicación poblacional calculados de la ecuación obtenida a partir del ajuste a la función exponencial $y = ce^{bx}$.

^b Para este ensayo se probó el lote 7 del suero nacional.

Tabla 3. Tiempos de duplicación poblacional calculados para cuatro líneas celulares propagadas en diferentes concentraciones de suero nacional y un suero de referencia.

Sueros	Líneas celulares					
	HT-29			LSPG8G		
	$y = ce^{bx}$	R^2	TDP	$y = ce^{bx}$	R^2	TDP ^a
Referencia 5%	$1299,7e^{0,0196x}$	0,97	35,36	$7975,6e^{0,0126x}$	0,97	55,01
Referencia 10%	$1116,5e^{0,0231x}$	0,96	30,01	$8267,7e^{0,0125x}$	0,97	55,45
Nacional 5% ^b	$1026e^{0,0291x}$	0,99	23,82	$13605e^{0,0076x}$	0,90	91,20
Nacional 10%	$2002,7e^{0,0229x}$	0,98	30,27	$13605e^{0,0076x}$	0,95	75,34

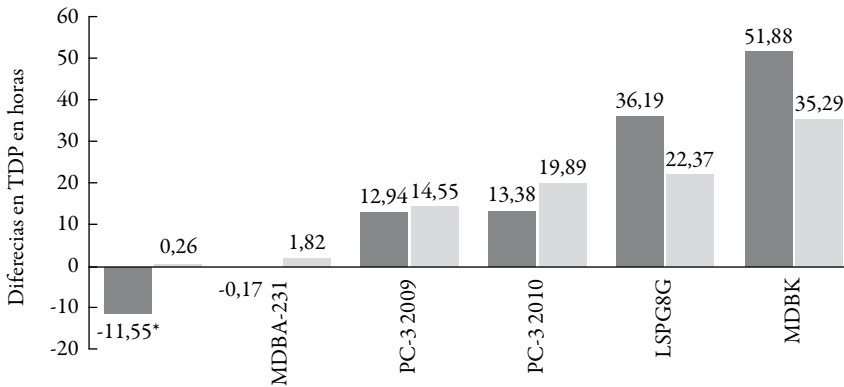
^a TDP. Tiempos de duplicación poblacional calculados de la ecuación obtenida a partir del ajuste a la función exponencial $y = ce^{bx}$.

^b Para este ensayo se probó el lote 8 del suero nacional.

Ensayo de promoción de crecimiento en fibroblastos diploides

El seguimiento del crecimiento celular se realizó semanalmente mediante conteos de las células obtenidas de cada frasco de cultivo.

En general, los resultados obtenidos reflejaron la senescencia intrínseca de los fibroblastos. Los conteos de la primera semana mostraron, para los lotes de sfb nacional 1, 3, 4 y 7, un ritmo de crecimiento superior al 50%. Por otro lado, los lotes 2, 5 y 6 presentaron valores inferiores al 50%, siendo el lote 5 el que presentó la menor eficiencia entre los evaluados (figura 3).



Líneas celulares						
MDBK			PC-3 2010			
$y = ce^{bx}$	R^2	tdp	$y = ce^{bx}$	R^2	TDP	
$1439,3e^{0,0284x}$	0,87	24,41	$14340e^{0,0106x}$	0,94	65,39	
$1221,8e^{0,0308x}$	0,83	22,50	$13505e^{0,0137x}$	0,99	50,59	
$1425,9e^{0,0286x}$	0,86	24,24	$20382e^{0,0088x}$	0,95	78,77	
$1374,2e^{0,0285x}$	0,90	24,32	$16267e^{0,0095x}$	0,95	72,96	

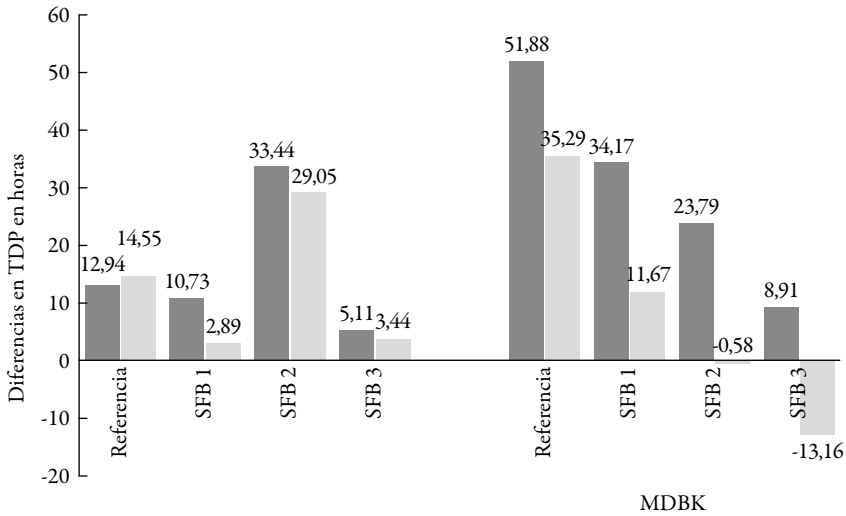


Figura 2. Horas de diferencia en los TDP calculados para las líneas celulares HT-29, PC-3, LSPG8G, MDBK y MDA-MB231 propagadas con diferentes sueros.

A. Diferencia entre los TDP obtenidos para el suero nacional y el suero de referencia. B. Diferencia entre los TDP obtenidos para el suero nacional y los sueros 1, 2 y 3. *Los valores negativos indican un mejor desempeño para el suero nacional.

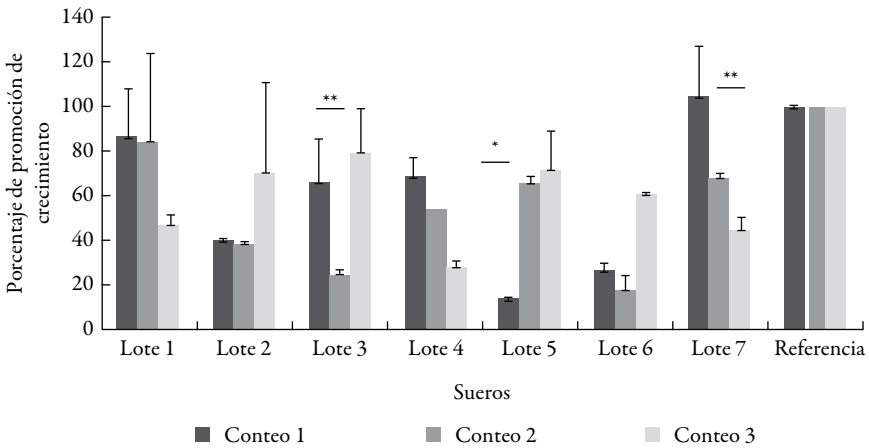


Figura 3. Evaluación del porcentaje de promoción de crecimiento de fibroblastos MCR-5 al emplear diferentes lotes de suero fetal bovino nacional a una concentración de 5% v/v. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones \pm una desviación estándar.

En la segunda semana, los cultivos evaluados con el lote 5 mostraron un aumento marcado del ritmo relativo de crecimiento, pues pasó de tener un crecimiento menor al

20% en la primera semana, a un incremento del 70% en la segunda. El ritmo de crecimiento celular decreció para los lotes 3, 4, 6 y 7; y sólo se mantuvo constante en los cultivos de fibroblastos donde se valoraron los lotes 1 y 2. En esta semana se obtuvieron porcentajes superiores al 50% para los lotes 1, 4, 5 y 7 (figura 3).

Los resultados obtenidos en el último conteo celular, reflejaron una disminución en el ritmo relativo de crecimiento de los fibroblastos al emplear los lotes 1, 4 y 7; a diferencia de los lotes 2 y 5 donde la eficiencia de crecimiento fue aumentando paulatinamente. Todos los resultados obtenidos se cotejaron con el SFB de referencia, para el que se consideró un porcentaje de eficiencia relativa del 100%.

Seguidamente se realizó una comparación de medias con el fin de respaldar las diferencias observadas. Los resultados demuestran una variabilidad de crecimiento de células normales al emplear indistintamente lotes de SFB nacional. Así que se recomienda, para este tipo de cultivos, mejorar la reproducibilidad entre lotes, para hacer el suero más homogéneo, estandarizando su proceso de obtención y producción (tabla 4).

Tabla 4. Resultados obtenidos de la prueba de *Dunnet* sobre el crecimiento de fibroblastos al emplear diferentes lotes de SFB nacional a una concentración 5% v/v.

Causa de variación	Gl	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Valor p
Interacción	14	17.700	1.264	6,897	***
Lotes	7	16.800	2.400	7,425	**
Conteo	2	382,2	191,1	1,043	Ns
	8	2.586	323,2	1,763	Ns
Residual	16	2.933	183,3		

ns: no significativo. Significancia ** = $p > 0,01$. *** = $p > 0,001$.

Ensayo de clonogenicidad entre lotes de SFB nacional

Con el fin de observar la habilidad del suero para generar colonias de hibridomas, se evaluaron cantidades mínimas de células (1 y 5 células/pozo) del hibridoma Sp2/0-Ag14, mantenidas durante 21 días con diferentes lotes de suero nacional. La formación de colonias se midió empleando el método de reducción de resazurina. Los resultados reflejaron un ligero aumento en algunos de los lotes de suero nacional.

En general, se evidenció que la eficiencia clonogénica de Sp2/0-Ag14 es menor al ser incubada con alguno de los siete lotes de suero, indistintamente de su concentración en el medio, que al ser incubada con el suero de referencia (figura 4).

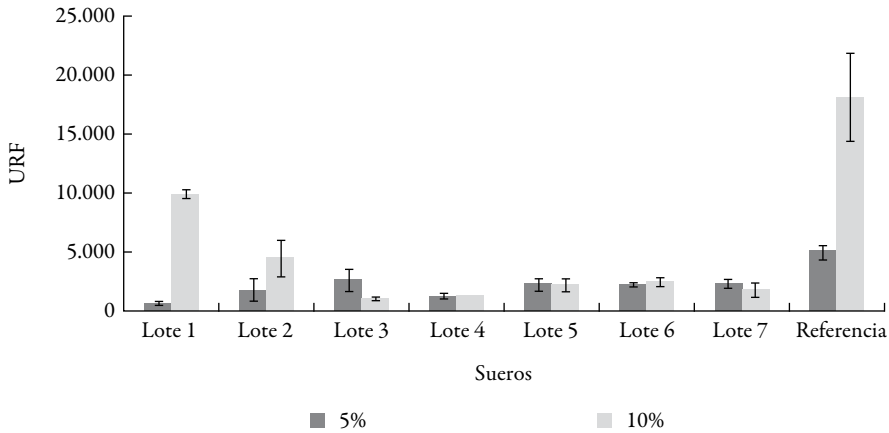


Figura 4. Influencia de diferentes lotes de SFB nacional. Efecto de clonogenicidad para cada uno de los lotes de SFB evaluados partiendo de 1 célula/pozo al emplear dos concentraciones de SFB. Cada barra representa el promedio de seis repeticiones \pm una desviación estándar.

Bajo un análisis de comparación de medias, los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la eficiencia clonogénica de cada uno de los siete lotes de SFB nacional ($p = 0,4405$); sin embargo, descriptivamente, la eficiencia de clonogenicidad mostrada por los lotes de SFB nacional, resultó más baja que la del suero de referencia.

Al comparar los resultados obtenidos para los siete lotes de SFB nacional adicionados en concentración de 5% v/v sobre pozos con una célula/pozo, se encontró que el lote que mayor formación de colonias indujo fue el lote 3. Al comparar la eficiencia clonogénica de este lote con la eficiencia del suero de referencia, se encontró que fue dos veces menor para el suero nacional (figura 4). A la concentración de 10% v/v, el lote que mayor eficiencia clonogénica mostró fue el lote 1. Al compararlo con el suero de referencia se encontró que su eficiencia clonogénica fue tres veces menor al control.

Entre los siete lotes de SFB nacional evaluados, se encontró que para cinco lotes la eficiencia clonogénica aumentó al incrementar la concentración de 5% a 10% v/v; pero en los lotes 3 y 7 no se presentó este comportamiento (figura 4).

Paralelamente se realizaron evaluaciones partiendo de una densidad de 5 células/pozo, donde se encontró una tendencia semejante a la observada al inocular 1 célula/pozo.

Igualmente, el suero de referencia mostró una mayor eficiencia de formación de colonias, comparado con los demás tratamientos. Sólo para el lote 3, en concentración 5%, se observó una eficiencia de formación de colonias mayor a la eficiencia del SFB de referencia; sin embargo, la desviación estándar de este resultado fue alta (figura 5).

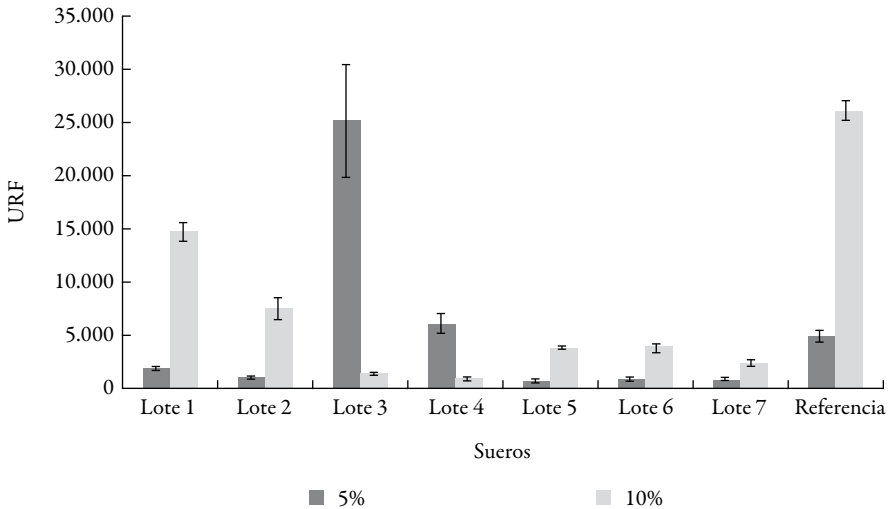


Figura 5. Efecto clonogénico obtenido para cada uno de los lotes de SFB evaluados partiendo de 5 células/pozo, empleando dos porcentajes de SFB. Cada barra representa el promedio de seis repeticiones \pm una desviación estándar.

Al emplear una concentración del 10%, los lotes que mayor formación de colonias indujeron fueron los lotes 1 y 2, siendo concordante con lo observado en el experimento con densidad de 1 célula/pozo. Al comparar entre los resultados obtenidos para las dos densidades celulares de partida, se encontró que la formación de colonias es dos veces mayor al emplear 5 células/pozo que al emplear 1 célula/pozo, lo que indica que no se mantiene la proporción entre el número de células sembradas en el pozo y formación de colonias.

Es importante enfatizar que en este ensayo, la variabilidad experimental fue alta, debido a las bajas densidades celulares de partida, que hacen más difícil garantizar la homogeneidad inicial entre pozos de experimentación.

Ensayo de plaqueo

Los resultados obtenidos en el ensayo de plaqueo usando la línea celular A-549, muestran que la formación de colonias para estas células no se afecta con los diferentes lotes de suero nacional. Las células no modifican su capacidad de proliferación, mantienen la adherencia en los pozos durante los 12 días de cultivo y la morfología es similar a la observada en los pozos control (figura 6). Al comparar la formación de colonias entre lotes y frente al suero de referencia, la prueba *Tukey* mostró que sólo se presentan diferencias significativas ($p = 0,05$) entre el lote 2 (probando 5%) y los

lotes 3 y 7 (probando 10%). En la figura 7 se muestra el número de colonias observadas para cada lote y las diferencias encontradas cuando se emplean los sueros al 5% y 10%.

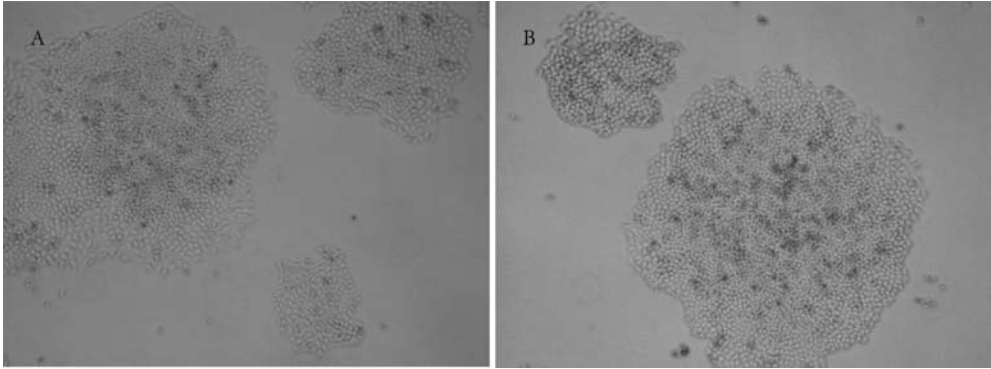


Figura 6. A. Colonias A549 propagadas con SFB de referencia. B. Colonias A549 propagadas con lote (1) suero nacional visualizadas en microscopio (40x).

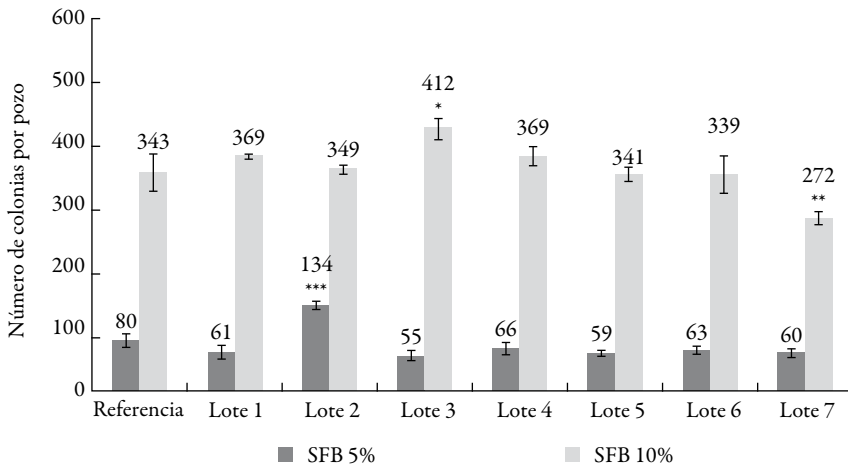


Figura 7. Número de colonias observadas para A549, después de 12 días de cultivo con diferentes lotes de suero nacional y un suero de referencia. Promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Al comparar las eficiencias de plaqueo relativas, se comprueba que las células A549 mejoran la capacidad de formar colonias cuando crecen en medios suplementados al 10%, sin desconocer el desempeño del suero nacional cuando se usa al 5%. En la tabla 5 se resumen estos resultados.

Tabla 5. Eficiencia relativa de plaqueo (%) para A549 empleando diferentes lotes de SFB nacional y el suero de referencia.

Sueros	Concentración de suero (v/v)		
	5%		10%
	Porcentaje		
Referencia	100		100
Lote 1	77		107
Lote 2	169		102
Lote 3	69		120
Lote 4	83		107
Lote 5	74		99
Lote 6	79		99
Lote 7	75		79

Tabla 6. Valores de concentración de proteína total obtenidos para todos los sueros evaluados. Cada muestra representa el promedio de dos repeticiones \pm una desviación estándar.

Sueros	Concentración final de proteína		
	g/L		
Lote 1	13,7	\pm	0,46
Lote 2	16,3	\pm	1,88
Lote 3	17,9	\pm	0,12
Lote 5	9,4	\pm	0,21
Lote 6	15,9	\pm	0,26
Lote 7	13,7	\pm	0,17
Suero de referencia	18,2	\pm	0,23
Suero 1	14,9	\pm	0,21
Suero 2	18,8	\pm	0,12
Suero 3	15,9	\pm	0,21

Cuantificación de proteína total

Se evaluó la cantidad de proteína total de cada lote de suero fetal bovino, así como los diferentes SFB calificados obteniendo los siguientes resultados.

De los lotes de SFB nacional, el lote 5 presentó la más baja concentración proteica, seguido de los lotes 1 y 7. Esta baja proporción de proteínas puede estar relacionada con el lote más antiguo y explicar parcialmente la baja eficiencia observada para estos lotes al evaluar la habilidad de crecer fibroblastos, generar clones de hibridomas y la capacidad de estimular la formación de colonias. Entre los lotes de suero nacional, el 3 fue el que mostró la mayor concentración proteica (tabla 6).

Así mismo, se observó descriptivamente una importante variabilidad en la cantidad de proteína presente en los lotes de suero nacional. Sin embargo, al realizar la prueba de *Kruskal-Wallis* no se observó diferencias estadísticas entre lotes ($p = 0,4402$).

Las diferencias observadas pueden estar relacionadas con la toma de suero de fetos de diferentes razas y edades, lo que puede influir en la cantidad proteica presente en cada lote. Para reducir esta variabilidad, se debe ejercer un control de estas dos variables con el fin de garantizar un contenido proteico más homogéneo entre lotes.

Igualmente, al comparar la cantidad de proteína presente en los diferentes sueros comerciales, no se observó diferencias con la media de proteína detectada ($p = 0,4060$) en los lotes de suero nacional. Sin embargo, es importante resaltar que entre los sueros fetales comerciales el suero 2, suero de referencia y el suero 3 mostraron una alta concentración de proteína presente en la muestra, respectivamente.

Al comparar los rangos de referencia reportados por los fabricantes para algunos de los sueros fetales bovinos altamente comercializados, se pudo observar que la concentración proteica obtenida en este estudio es mucho más baja que los propuestos en los reportes biotecnológicos (figura 8).

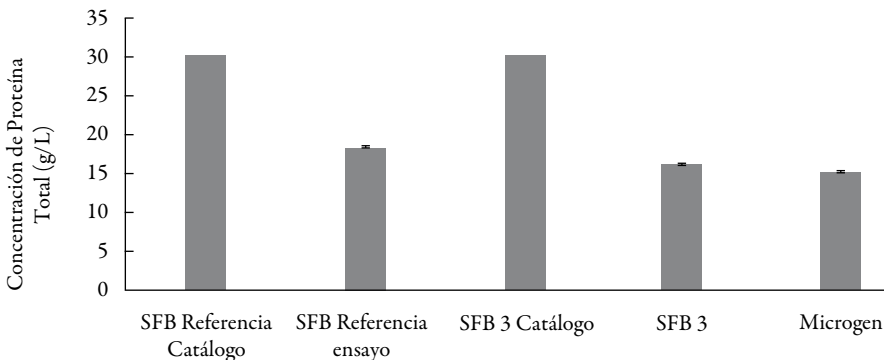


Figura 8. Comparación de la concentración de proteína total reportada para algunos sueros como el suero de referencia, suero 3 y SFB nacional, con respecto a la observada mediante el fluorómetro QUBIT (Invitrogen).

Para el suero de referencia, el catálogo reportó un rango entre 30-50 g/L para la concentración de proteína, y la determinación realizada arrojó un valor de 18,2 g/L; esto indica que el valor determinado corresponde al 40% de lo reportado para este suero. Es necesario considerar que la diferencia se puede deber al método de determinación empleado (8). Para el suero 3, el catálogo reportó un contenido de proteína de 30-45 g/L y el contenido detectado fue de 15,2 g/L, lo que corresponde al 53% del valor mínimo reportado (figura 8).

Es importante resaltar que la mayoría de las casas comerciales no reportan esta prueba como un ensayo rutinario; sin embargo, es necesario monitorear la cantidad de proteína total para establecer de manera indirecta el contenido de factores de crecimiento en el suero fetal bovino y así poder hacer un estimativo de la eficiencia del suero para ensayos especializados. Sin embargo, los datos generados no permiten inferir una relación contundente entre la concentración de proteínas y la eficiencia de los sueros referencia estudiados o para los lotes del SFB nacional para alguna de las características evaluadas.

CONCLUSIONES

El suero fetal bovino es un importante suplemento del medio de cultivo celular que favorece el crecimiento y adhesión celular. Diferentes marcas comerciales se encuentran disponibles y son comúnmente empleadas en muchos laboratorios de nuestro país. El suero nacional hoy está incursionando en el mercado nacional y en asociación con la academia ha comenzado un proceso para mejorar sus procesos de producción y análisis de calidad al producto final.

En este trabajo se emplearon diferentes experimentos para evaluar el desempeño del SFB nacional en cultivos celulares con distintos requerimientos de factores de crecimiento. Los resultados obtenidos sugieren que el suero SFB nacional puede ser empleado para el mantenimiento y propagación de cultivos con bajos requerimientos nutricionales. También puede ser empleado para la propagación y el mantenimiento de cultivos por largos períodos, sin que se afecte la integridad de las células. Los resultados indican que el SFB nacional no tiene el mismo desempeño que el SFB de referencia, por lo que es posible emplearlo pero realizando recambio de medio al menos cada 48 horas de cultivo; esto para garantizar que la cinética de crecimiento se mantenga.

Aunque los resultados obtenidos para el crecimiento de células más exigentes, tales como los fibroblastos, muestran que no favorece un óptimo crecimiento entre 5% y 10%; podría sugerirse aumentar la concentración para mejorar la proliferación. Teniendo en cuenta que cada línea celular puede ser genética y biológicamente diferente y que puede

responder de manera favorable o adversa frente a una condición nutricional, es importante ajustar las concentraciones de suero nacional que más favorecen su propagación *in vitro*.

Cabe resaltar que en ninguno de los ensayos se observó un efecto tóxico o adverso sobre el crecimiento de las células empleadas, aunque en algunos casos se observó una menor funcionalidad frente al crecimiento celular comparando los resultados con otros sueros. No debe descartarse su posible aplicación para la propagación de células poco exigentes, para realizar ensayos de corta duración, en procedimientos transitorios tales como la inactivación del efecto de la tripsina y para criopreservar.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados aquí presentados forman parte del proyecto “Desarrollo e implementación de estrategias para mejorar la fabricación y control del sFB Microgen”, financiado por Colciencias y desarrollado por el Grupo de Farmacogenética del Cáncer en el Laboratorio de Ensayos Farmacológicos, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia-Bogotá.

REFERENCIAS

1. I. Freshney, “Culture of animal cells: A manual of basic technique”, 4th edition, John Wiley & Sons, New York, 2000, 589 p.
2. N.B. Molina, M.C. Minvielle, J.A. Basualdo, Células RK13: influencia de la concentración de suero fetal bovino en el tiempo de duplicación, *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, **38**, 477 (2004).
3. F. Fariñas, Instituto Andaluz de Patología y Microbiología, España, 2006, Diarreas víricas en ganado bovino, *Eumedia Mundo Veterinario*, núm. 188, URL: <http://www.eumedia.es/user/articulo.php?id=85>, consultado en noviembre de 2009.
4. J. Lombardo, C. Fernandez-Degiorgi, D. Quattrini, S. Michelin, E. Smolko, E. Sera, Radiosterilization: Studies and Application, *Radiation Physics and Chemistry*, **45**, 275 (1995).
5. J. Daley, D. Danner, D. Weppner, M. Plavsic, Virus inactivation by gamma irradiation of fetal bovine serum, *Focus*, **20**, 86 (1998).

6. T. Pinyopummintr, B.D. Bavister, Development of bovine embryos in a cell-free medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation, *Theriogenology*, **41**, 1241 (1994).
7. J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *European Journal of Biochemistry*, **267**, 5421 (2002).
8. L. Escobar, P. Alfonso, F. Aristizábal, Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales, *Revista Colombiana de Biotecnología*, **7**, 49 (2009).
9. American Type Culture Collection (ATCC), Cell lines and Hybridomas, URL: <http://www.atcc.org/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm>, consultado en enero de 2010.
10. Gibco™ Catalog, Invitrogen cell products, Media Sera Reagents, Invitrogen Corporation Grand Island, New York, 2009.
11. Gibco, Sigma-Aldrich Publications, Fetal bovine serum (FBS), URL: <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/f4135pis.pdf>, consultado en marzo de 2008.
12. Invitrogen, Qubit™ Quantitation Platform, Nucleic acid and protein quantitation, URL: <http://www.invitrogen.com/qubit>, consultado en septiembre de 2010.