

Células RK13: Influencia de la concentración de suero fetal bovino en el tiempo de duplicación*

► Nora Beatriz Molina¹, Marta Cecilia Minvielle², Juan Angel Basualdo³

1. Bioquímica. Ayudante Diplomado.
2. Dra. en Medicina. Profesora Adjunta.
3. Dr. en Medicina. Profesor Titular.

* Cátedra de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.
60 y 120 S/N°. 1900 La Plata.
Buenos Aires. Argentina.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue analizar el Tiempo de Duplicación (TD) y la Fase de Latencia (Lag) de una línea celular con 2 concentraciones de Suero Fetal Bovino (SFB) y 2 inóculos celulares iniciales. Se realizaron 4 curvas de crecimiento de células adherentes RK13 (*rabbit kidney*) en Minimal Essential Medium (MEM) suplementado con glutamina, penicilina, estreptomycin y SFB no inactivado al 5% y 7%. Los inóculos iniciales fueron de 3×10^4 y $6,8 \times 10^4$ células viables/mL. El TD fue de 24 h para el cultivo con 7% de SFB con ambos inóculos y de 16,36 h para el cultivo con 5% de SFB con el mayor inóculo. El cultivo con 5% de SFB y 3×10^4 viables/mL presentó escaso desarrollo. Se observaron diferencias significativas en el TD ($p = 0,0055$) cuando se utilizó el inóculo de $6,8 \times 10^4$ viables/mL y se varió el SFB (5% y 7%). La diferencia no fue significativa al utilizar los inóculos de 3×10^4 y $6,8 \times 10^4$ viables/mL manteniendo constante la concentración de suero fetal (7%).

Palabras clave: tiempo de duplicación * RK13 * cultivo celular * suero fetal bovino * inóculo celular.

Summary

RK13 CELLS: INFLUENCE OF FETAL BOVINE SERUM CONCENTRATION ON DOUBLING TIME

The aim of this study was to analyze the Doubling Time (DT) and the Lag phase of a cell line with two concentrations of fetal bovine serum (FBS) and two initial inocula. Four growth curves of RK13 cells in Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with glutamine, penicillin, streptomycin and 5% and 7% non-inactivated FBS were performed. The initial inocula were 3×10^4 and 6.8×10^4 viable cells/mL. DT was 24 h for the culture with 7% FBS with the two inocula and 16.36 h for the culture with 5% FBS with the greatest inoculum. The culture with 5% FBS and 3×10^4 viable cells/mL had limited growth. There was significant difference in DT ($p = 0.0055$) when the inoculum was 6.8×10^4 viable cells/mL with the two concentrations of FBS. There was no significant difference with the 7% FBS and the two inocula (3×10^4 and 6.8×10^4 viable cells/mL).

Key words: doubling time * RK13 * cell culture * fetal bovine serum * cell inoculum.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Introducción

Las técnicas de cultivo celular se han convertido en herramientas fundamentales para la investigación básica y aplicada, para algunos procesos industriales e incluso para diversas técnicas diagnósticas. Durante las últimas décadas, numerosos sistemas de producción de sustancias de interés económico han incorporado los cultivos de células a sus procesos, entre ellos, la industria farmacéutica y el trasplante de tejidos. En la actualidad, son una herramienta fundamental para la investigación. Su aplicación es amplia, abarcando diversas disciplinas como la inmunología, virología, biología molecular, ingeniería genética y farmacología (1-3).

Las técnicas actuales de cultivo de células permiten un control preciso del medio ambiente celular ya que utilizan concentraciones conocidas de nutrientes y regulan los parámetros físico-químicos y fisiológicos del cultivo. Evitan el grave problema de la heterogeneidad de las muestras asociada al uso de animales, sin olvidar las motivaciones éticas respecto al sacrificio de animales de experimentación. Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues los cultivos se realizan en volúmenes reducidos, asegurando un acceso directo de la droga a las células.

El cultivo celular ha sido fundamental para numerosos avances científicos alcanzados en distintas ramas de las ciencias biomédicas. En el campo de la microbiología, el cultivo celular permite estudiar las relaciones entre la célula huésped y los microorganismos intracelulares (virus, bacterias y parásitos) (4) (5), desarrollar reactivos inmunológicos de diagnóstico, confirmar una infección, evaluar la eficiencia de antimicrobianos, realizar estudios de infectividad, estudiar nuevas especies y obtener gran cantidad de microorganismos no cultivables para optimizar técnicas moleculares.

En este estudio, se realizaron curvas de crecimiento con dos concentraciones de Suero Fetal Bovino (SFB) y dos inóculos iniciales para evaluar el desarrollo de células RK13 (*rabbit kidney*) en cultivo y seleccionar las condiciones celulares óptimas para realizar futuros ensayos de infección con parásitos intracelulares, en particular, los microsporidios (5).

Materiales y Métodos

Se cultivaron células adherentes RK13 (*rabbit kidney*) en botellas plásticas de 25 cm³ (provenientes del Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP). El medio utilizado fue Minimun Essential Medium (MEM) autoclavable (Cat. N° 410-1700, Gibco), preparado según protocolo del fabricante (6), suplementado con L-glutamina (2 mM), penicilina (200 U/mL), estreptomycin (350 µg/mL) y SFB

no inactivado al 5% y 7% (v/v). Se ajustó el pH a 7,4 con CO₃HNa (7,5%) (2) (6). Los inóculos iniciales fueron 3 x 10⁴ y 6,8 x 10⁴ células viables/mL (v/mL) (2) (7). Se incubaron en estufa seca y sin CO₂, con las tapas firmemente cerradas para evitar la evaporación del medio (2) (3). A diario, las botellas de cultivo fueron inspeccionadas visualmente, en busca de cambios de color y al microscopio buscando posibles contaminaciones bacterianas o fúngicas. Cada subcultivo fue sometido a controles mediante inoculación de una alícuota en agar sangre, agar Sabouraud y caldo cerebro corazón.

Preparación de Células Adherentes: bajo flujo laminar se retiró el medio MEM envejecido y se lavó 2 veces con PBS estéril (sin calcio ni magnesio, pH = 7,2), ejecutando movimientos de vaivén antes de retirarlo por completo. Al cultivo se le incorporó 1 mL de tripsina (0,05%, 1/250) - EDTA (0,02%) durante 1 min. Se retiró todo el volumen y se incubó a 37 °C por 3 a 5 min verificando el desprendimiento de la monocapa con microscopio invertido con óptica de contraste de fases. Se cortó la reacción con 5 mL de MEM fresco, aspirando varias veces con el fin de despegar las células entre sí y de la superficie (2) (6) (7).

Recuento de Células: se contaron en Cámara de Neubauer con una dilución 1:2 de la suspensión celular en Azul Tripán (0,5%), por duplicado, diferenciando las transparentes (viables) de las azules (no viables) (7). Para los cálculos se utilizaron las siguientes fórmulas (2):

$$\text{N}^\circ \text{ Cél. totales/mL} = [\text{N}^\circ \text{ T}] \times 2 \times 10^4 =$$

$$\text{N}^\circ \text{ Cél. viables/mL} = [\text{N}^\circ \text{ V}] \times 2 \times 10^4 =$$

Donde N° T es el número de células totales promedio por cuadrado mediano de la cámara (0,1 mm³) y N° V es el número de células viables promedio en la misma superficie.

El porcentaje de células viables se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ V} = [\text{N}^\circ \text{ Cél. viables/mL} / \text{N}^\circ \text{ Cél. totales/mL}] \times 100 =$$

Realización de la Curva de Crecimiento: con el dato de la concentración de células viables, se prepararon diluciones apropiadas con MEM fresco para obtener inóculos de 3 x 10⁴ y 6,8 x 10⁴ v/mL en un volumen final de 10 mL por botella. Se iniciaron 12 cultivos el día cero. Durante 4 días, se tripsinaron 3 cultivos diarios, registrándose la concentración celular y el tiempo (2) (3).

Protocolo de variación del SFB: las células fueron cultivadas hasta la confluencia. A continuación se dividió en 2 alícuotas (botellas A y B). La botella A se cultivó

con 10% de SFB y la B recibió una mezcla en partes iguales de medio original (10%) y medio con 7% de SFB, y se evaluó el crecimiento celular con microscopio invertido. Una vez que las células de la botella B alcanzaron la confluencia, se despegaron las células y se repitió el mismo procedimiento (botellas C y D). En consecuencia, el cultivo D recibió la cuarta parte del medio original (10%) y el resto del medio adicionado fue MEM con 7% de SFB. Cuando se alcanzó la confluencia en esta botella, se realizó el cultivo con el medio al 7% en su totalidad. Idéntico procedimiento fue el utilizado para adaptar las células al medio con 5% de SFB (8).

Análisis estadístico: Los datos fueron evaluados aplicando Prueba de T para medias de dos muestras emparejadas.

Resultados

Los recuentos celulares obtenidos se volcaron a un gráfico de Log del N° de células viables/mL vs Tiempo (horas), calculándose la fase de reposo (Lag), el tiempo de duplicación (TD) y el porcentaje de células viables en las distintas condiciones de cultivo (2) (3). Los resultados se muestran en la Figura 1. El porcentaje de células viables fue superior al 92% en todos los casos, excepto en el cultivo con 5% de SFB y 3×10^4 v/mL donde el desarrollo de la monocapa fue muy escaso.

El Tiempo de Duplicación (TD) fue de 24 h para los dos cultivos con 7% de SFB y ambos inóculos celu-

lares. El cultivo con 5% de SFB y el mayor inóculo presentó un TD de 16,36 h (Fig. 1).

Los datos evaluados estadísticamente demostraron una diferencia significativa en el TD ($p = 0,0055$) cuando se utilizó el inóculo de $6,8 \times 10^4$ v/mL y se varió el SFB (5% y 7%) y la diferencia no fue significativa al utilizar los inóculos 3×10^4 y $6,8 \times 10^4$ v/mL dejando constante la concentración de SFB (7%).

Discusión y Conclusiones

Las curvas de crecimiento permiten caracterizar el desarrollo de las células *in vitro*. Bajo condiciones rigurosamente controladas brindan valiosa información sobre la frecuencia de subcultivos, el número de viables en un determinado momento, el tiempo de duplicación y la fase de reposo, entre otros parámetros. La caracterización de las células permite optimizar los requerimientos nutricionales y fisiológicos, mejorar el rendimiento y estandarizar las condiciones del cultivo (2) (3).

La cuantificación de las células es importante para decidir el momento óptimo del subcultivo. Además, el testeado de nuevos medios de cultivo, de distintas concentraciones o tipos de suero requiere de una cuidadosa cuantificación celular a fin de evaluar posibles efectos tóxicos, o por el contrario, estimulantes del crecimiento. Si bien el conteo en cámara posee un error del 10%, presenta varias ventajas sobre los contadores electrónicos: permite observar la morfología celular, conocer la viabilidad, comprobar la homogeneidad de la suspensión y detectar posibles contaminantes del cultivo (3).

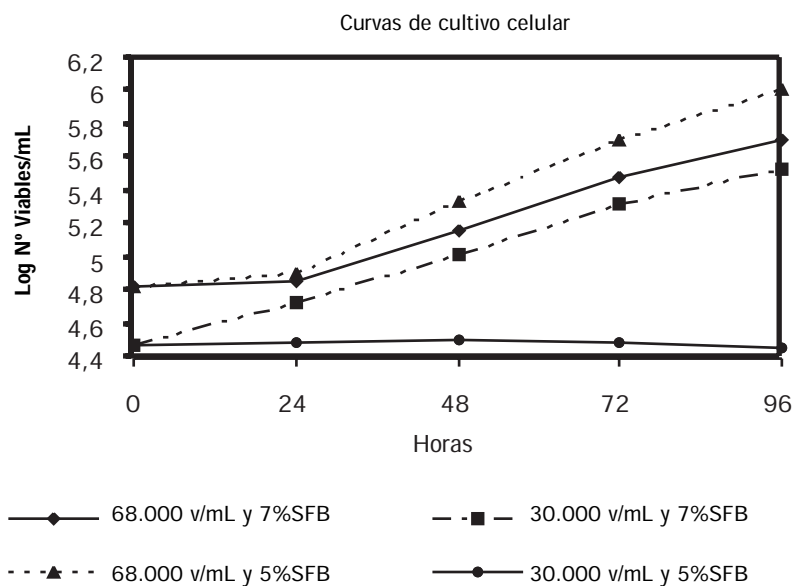


Figura 1. Crecimiento de células RK13 con dos concentraciones de SFB (5 y 7%) y dos inóculos iniciales (3×10^4 y $6,8 \times 10^4$ células viables/mL).

Según la bibliografía, la velocidad de crecimiento celular es inversamente proporcional a la concentración de células, siempre que su densidad inicial sea mayor de 10^3 o 10^4 cél/cm², en consecuencia, los inóculos iniciales más bajos crecen más rápido que los inóculos mayores (7). En concordancia con lo expuesto por otros autores, se observó que al mantener constante el SFB en 7%, el cultivo con menor inóculo (3×10^4 v/mL) tuvo una fase de latencia menor y una velocidad inicial de crecimiento mayor, comparado con el inóculo de $6,8 \times 10^4$ v/mL (6) (7). No se demostró variación en la fase de reposo de los cultivos cuando se varió el SFB (5% y 7%) manteniendo el inóculo constante ($6,8 \times 10^4$ v/mL) (6) (7).

El escaso desarrollo en el cultivo con 5% de SFB y 3×10^4 v/mL podría deberse a que se cultivaron en estufa seca, con bajo contenido de *buffers* séricos (sólo bicarbonato) y sin CO₂, lo que provocaría una mayor variación de pH y osmolaridad, afectando negativamente el crecimiento y dando un cultivo más inestable a bajas concentraciones celulares (2) (6).

El tiempo de duplicación del cultivo permite predecir la concentración probable en cualquier momento de la curva y es una característica intrínseca de cada línea celular bajo esas condiciones de crecimiento (2) (3). En estos cultivos, con 7% de SFB, el TD se mantuvo constante, independientemente del inóculo inicial.

Al evaluar la velocidad de crecimiento para $6,8 \times 10^4$ v/mL, se observó que fue claramente mayor cuando se cultivaron con 5% de SFB que con 7%, lo que podría deberse a sustancias inhibitoras presentes en el suero no inactivado (8). Algunos autores señalan que la inactivación elimina sustancias perjudiciales para el desarrollo pero otros indican que el proceso también reduce el efecto promotor sobre el crecimiento celular (9-11).

Distintos estudios realizados sobre el crecimiento de las células indican la necesidad de estandarizar los protocolos de cultivo para descartar variaciones inherentes al desarrollo y limitar las variables aleatorias que lleven a una interpretación errónea de los resultados (3) (5) (7).

Debido a que las células son el sustrato indispensable para el cultivo de microorganismos intracelulares, la normatización de las variables del cultivo permite estudiar el crecimiento microbiano sobre un soporte vivo, en condiciones reproducibles para evaluar los hallazgos obtenidos.

Los cultivos celulares utilizan medios de cultivo complejos con el agregado de suplementos no totalmente definidos, como el SFB, por lo que se hace indispensable el estudio del crecimiento para cada sistema de cultivo a implementar. Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento del TD frente a distintas concentraciones de SFB en células RK13 y ponen en evidencia la importancia de determinar el comportamiento de cada línea celular bajo las condiciones de trabajo seleccionadas.

AGRADECIMIENTOS

A la Ingeniera en Sistemas Evangelina Bertucci por su colaboración en el análisis estadístico.

CORRESPONDENCIA

PROF. DR. JUAN ANGEL BASUALDO
Cátedra de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Ciencias Médicas. UNLP
Av. 60 y 120 S/N°
1900 LA PLATA
Buenos Aires. Argentina
Tel/Fax: 54-221-425-8987
E-mail: jabasua@atlas.med.unlp.edu.ar

Referencias bibliográficas

1. Reigosa M, Rodriguez A. Historia de los cultivos celulares. *Ciencia Hoy* 1999. 9 (52). Mayo/Junio.
2. Morgan DC, Darling SJ. Cultivo de células animales. Zaragoza: Ed. Acribia; 1995.
3. Candurra N, Claus J, Coronato S, Coto, C. Cultivos celulares y su aplicación en Biotecnología. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1994; Supl 2: 1-77.
4. Reisner BS, Woods GL, Thomson RB, Larone DH, García LS, Shimizu RY. Specimen Processing. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R, Manual of Clinical Microbiology. 7ª Ed. Washington: ASM Press; 1999.
5. Visvesvara G. In vitro cultivation of Microsporidia of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15 (3): 401-13.
6. GIBCO BRL. Catálogo y Guía de Referencia. Grand Island. New York. 1992.
7. Guide to subculturing cell line monolayers. Technical Bulletin. American Type Culture Collection. 2001. (Citado 2003). Available from URL: <http://www.atcc.org/pdf/tb04.pdf>
8. Frequently Asked Questions. Cell Biology. American Type Culture Collection. 2001. (Citado 2003). Available from URL: <http://www.atcc.org/TechnicalInfo/faqCellBiology.cfm>
9. Weber EL. Suero Fetal Bovino: contaminación con virus de la diarrea viral bovina. Asociación Banco Argentino de Células (A.B.A.C.). 2000. Boletín trimestral N° 42.
10. Suero animal, derivados del suero animal y sustitutos usados en la fabricación de productos farmacéuticos. Conferencia Internacional sobre Suero Animal. 1998. *Pharmeuropa* 10 (2): 298-300. En Asociación Banco Argentino de Células (A.B.A.C.). 1998. Boletín Trimestral N° 36.
11. Hay RJ, Caputo J, Macy ML, editores. ATCC Quality control methods for cell lines. Rockville, Maryland: Second Edition; 1992.

Aceptado para su publicación el 27 de agosto de 2004