

# CONTROL DE CALIDAD A SUEROS BOVINOS OBTENIDOS Y PROCESADOS PARA EL CULTIVO DE CELULAS ANIMALES

A. Otero, N. Rosales y V. Fleites

Departamento de Cultivo de Tejido Animal, Dirección de Diagnóstico y Evaluación de Medicamentos, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 4 de diciembre de 1985

**ABSTRACT.** Fetal calf sera and sera from calostro and non-calostro consuming new born calves were obtained and compared with commercial products. Sterility and growth promoting tests, analysis and cuantification of proteins, pH and triglyceride determination were performed. It was found that it is possible to select serum batches for different cell requirements from quality control results. Non-calostro new born calf serum can be used for some cultures that usually are extremely dependent of fetal calf serum. Some batches of calostro new born calf serum can be used for cell hybridization experiments.

**RESUMEN.** Se obtuvieron sueros fetales y de animales recién nacidos que habían consumido o no calostro materno y éstos fueron comparados con sueros comerciales similares. Se realizaron pruebas de esterilidad, promoción de crecimiento, análisis y cuantificación de proteínas, pH y determinación de triglicéridos. Se encontró que las pruebas de control permitieron seleccionar lotes de sueros para diferentes exigencias. El suero de ternero recién nacido sin ingerir calostro cumple con los requerimientos para algunos sistemas que tradicionalmente usan suero fetal. El suero de ternero recién nacido que consumió calostro puede utilizarse en experimentos de hibridación celular.

## INTRODUCCION

El suero bovino es añadido a una gran cantidad de sistemas de cultivo como un suplemento suministrador de los factores más importantes promotores del crecimiento y una fuente considerable de nutrientes<sup>1</sup>.

Fenómenos como la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad han permitido mediante su estudio<sup>2,3</sup> identificar mecanismos de control del crecimiento que involucran a moléculas estimuladoras en el suero que ejercen su acción a través de receptores de membrana<sup>4,5</sup>.

Ha sido establecido que varios factores de crecimiento son necesarios para sustentar el crecimiento celular tanto "in vivo" como "in vitro". Estos factores son clasificados como de competencia y de progresión para fibroblastos de ratón Balb/c 3T3 "quiescentes"<sup>6</sup> y aunque actúan sinérgicamente, se ha evidenciado en células NHIK 3025 que los eventos de incremento de tamaño celular (contenido de proteínas) y desarrollo del ciclo celular (síntesis de DNA y división celular) se encuentran bajo controles independientes<sup>7</sup>.

Aunque hay evidencias de que mezclas de componentes definidos como insulina, transferrina, etanolamina y selenito de sodio pueden sustituir el suero bovino<sup>8</sup>, éste continúa siendo la fuente práctica más universal para factores y promotores de crecimiento en muchos laboratorios de cultivo de tejidos, porque además probablemente existe un cierto número de otros componentes indefinidos presentes en este producto que contribuyen a "mantener" en sentido general, los cultivos de células y tejidos animales.

La preparación del suero bovino debe llevarse a cabo bajo condiciones controladas para mantener en activo las propiedades mencionadas anteriormente, así como

microorganismos u otras sustancias tóxicas que puedan ser introducidas durante el proceso.

Aunque las firmas comerciales publican sus normas de producción ajustando el precio del producto en relación directa con la magnitud del control de calidad efectuado, se ha descrito la presencia del virus de la enfermedad de la mucosa en suero fetal bovino comercial<sup>9,10</sup>, así como la contaminación de sueros de diferentes orígenes con bacteriófagos<sup>11</sup>. También se ha detectado contaminación con endotoxinas bacterianas en sueros comúnmente empleados para la producción de vacunas<sup>12</sup>. La presencia de endotoxinas bacterianas en el suero bovino ha sido demostrada<sup>13</sup> como responsable en la inducción de un número anormalmente alto de ruptura de cromátidas en células WI-38.

Por otra parte, han sido aislados microorganismos psicrófilicos de suero fetal bovino comercial<sup>14</sup>, el cual presentaba un fuerte efecto inmunoestimulador en células esplénicas de ratón debido a la presencia de lipopolisacáridos formados por la ruptura de organismos Gram-negativos.

Resulta obvio, que la presencia de pequeñas cantidades de elementos contaminantes en el suero bovino puede tener un marcado efecto en los sistemas de cultivo, lo que puede llevar a costosas pérdidas en la producción de vacunas u otros productos biológicos, así como introducir errores en las investigaciones en cultivo de células.

El Departamento de Cultivo de Tejidos del CENIC con más de 15 años de experiencia en la obtención de suero de bovino recién nacido, ha comenzado un programa de control de calidad a los sueros que se reciben en el Laboratorio en relación a controles comerciales y de producción nacional. En este trabajo se discuten los resultados de las pruebas de control que se han realizado hasta el momento.

## MATERIALES Y METODOS

### Sueros

Control (bovino, fetal): Foetal Calf Serum (Gibco, Europe, Ltd.); Cat. No. 011-6290.

Control (bovino recién nacido): Newborn Calf Serum, Flow, Ltd. Cat. No. 29-121-49.

Bovino recién nacido obtenido en el CENIC (mezcla de 4 terneros por lote) con ingestión previa de calostro materno (10 lotes).

Bovino recién nacido obtenido en el CENIC (lote sin mezclar) sin ingestión previa de calostro materno (2 lotes).

Bovino fetal obtenido por el Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal (CIMA) mediante cesárea a vacas en término de gestación.

Procesado en el CENIC (lote sin mezclar, 2 lotes).

### Extracción de sangre y obtención del suero

Terneros de 3 a 4 d de nacidos provenientes del plan genético "Niña Bonita", La Habana, fueron mantenidos durante 24 h sin alimentación en corral separado con el objetivo de disminuir el contenido de lípidos en circulación.

Los animales fueron desangrados a través de la vena subclavia mediante catéter y la sangre colectada en probetas de 2 L con varilla de vidrio y enjuagadas con solución tampón fosfato (PBS).

La sangre así obtenida fue mantenida de 4 a 5 h a 37 °C para permitir la coagulación y toda la noche a 4 °C para facilitar la retracción del coágulo. El suero decantado fue centrifugado a 2 000 r/min a temperatura ambiente durante 20 min, siendo redecantado cuidadosamente e inmediatamente filtrado a través de membrana de 0,22 µm (142 mm) de nitrato de celulosa con un sistema de presión en línea (Sartorius) y conservado a 4 y -70 °C en espera de las pruebas de control.

### Esterilidad

Una muestra de cada tipo de suero proveniente de la filtración fue mantenida a 37 °C durante 10 d para detectar directamente algún posible crecimiento microbiano.

Una muestra de cada tipo de suero, extraída estérilmente, fue sembrada en caldo de soya (Oxoid) para detección de microorganismos aerobios y otra sembrada en caldo tioglicolato (Inst. Finlay) para detección de anaerobios. Ambas fueron mantenidas a 37 °C durante 10 d y evaluadas diariamente.

Detección de micoplasmas mediante cultivo microbiológico (Dpto. de Microbiología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA) en caldo y placa durante 15 d (también incluyó formas L bacterianas).

### Pruebas de promoción de crecimiento

Utilizando como controles los sueros comerciales se efectuaron 3 subcultivos o pases a cada lote de suero en 3 líneas de células con el objetivo de observar ritmo de crecimiento, morfología y duración del cultivo. Se utilizaron frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup> de área efectiva (Sterilin, Ltd.) con una relación de inóculo 1:10, cambio de medio a las 72 h y pase a las 120 h.

### Líneas celulares

L41 (pulmón humano transformado, URSS); Hep-2 (Carcinoma laríngeo humano, American Type Culture Collection, ATCC) y FL (Amnion humano, ATCC).

En todos los casos se utilizó medio esencial mínimo de Eagle (Eagle MEM, Gibco, Inc.) con aminoácidos no esenciales, a 37 °C y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %.

### Concentración de H<sup>+</sup>

El pH de los diferentes lotes y controles se determinó mediante pH-metro analógico (DIE, CENIC) por medida directa contra patrón pH 7,0.

### Inactivación

Dos lotes de suero bovino de recién nacidos que ingirieron calostro fueron inactivados en baño termostataado a 56 °C durante 30 min en agitación.

### Determinación de triglicéridos

Se empleó el juego diagnóstico: Test Combinación Triglicéridos (grasa neutral) enzimático, detección UV, No. 124 958, Boehringer Mannheim, GmbH.

### Análisis de proteínas

Identidad electroforética: Acetato de celulosa en placa Cellogel, Chemetrom, Milano<sup>15</sup>, en tampón barbital pH 8,6.

Inmunoelectroforesis empleando un antisuero anti-total bovino de conejo<sup>16</sup> obtenido en el Dpto. de Bioquímica Clínica, CENIC.

Determinación de proteínas totales. Método de Folin-Ciocalteu modificado<sup>17</sup>.

## RESULTADOS

El rendimiento de suero por volumen inicial de sangre es del 40 al 50 % en el caso de los terneros recién nacidos (de 3 a 4 d) que han consumido calostro. El proceso de coagulación se completa de manera que no se observa precipitación de fibrina después de filtrado el suero, no siendo así en el caso de los sueros fetales y de recién nacidos sin ingerir calostro, en los que puede no completarse el proceso, existiendo la posibilidad de aparición de fibrina en cantidades apreciables que puede ser removida por congelación-descongelación y filtración a través de placas de celulosa<sup>1</sup> (Seitz, Supra grado EK, Seitz Werke, GmbH) evitándose así el empleo del abesto para el que se ha demostrado toxicidad en sistemas de filtración y prefiltración.

Los niveles de hemólisis fueron bajos según el aspecto exterior de los sueros en comparación con los controles.

Los resultados de las pruebas de promoción de crecimiento se muestran en la Tabla I.

TABLA I  
Pruebas de promoción de crecimiento de los sueros bovinos en 3 líneas celulares diferentes

Característica y tipo de suero	Líneas celulares		
	L41	Hep-2	FL
Fetal Gibco	+++	+++	+++
Recién nacido (Flow)	++	++	++
Recién nacido inactivado (Flow)	+/-	++	++
Recién nacido + calostro	++	++(+/-)	++(+/-)
Recién nacido + calostro inactivado	+/-	++	++
Recién nacido sin calostro	+++	+++	+++
Fetal CIMA	++++	++++	++++

++++ Crecimiento excepcional Sueros con pH de 7,8 a 8,0

+++ Muy buen crecimiento +/- No satisfactorio al tercer pase

++ Buen crecimiento

### Esterilidad

La prueba de esterilidad directa no evidenció crecimiento de hongos y bacterias. Las pruebas en caldos nutritivos fueron negativas y no se encontraron colonias de Micoplasmas para ningún caso estudiado.

### Concentración de H<sup>+</sup>

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.

**TABLA II**  
Valores y rangos de pH para los sueros estudiados

Característica y tipo de suero	pH
Fetal Gibco	7,1
Recién nacido (Flow)	7,6
Recién nacido + calostro	7,4 a 8,0
Recién nacido sin calostro (promedio)	7,5
Fetal CIMA (promedio)	7,4

### Análisis de triglicéridos

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III

**TABLA III**  
Valores y rangos de triglicéridos para los sueros estudiados

Característica y tipo de suero	Triglicéridos (mmol/L)
Fetal Gibco	0,26
Recién nacido (Flow)	1,13
Recién nacido + calostro (promedio)	0,46
Recién nacido sin calostro (promedio)	0,33
Fetal CIMA (promedio)	0,19

### Determinación de proteínas totales

La Tabla IV agrupa los resultados para las diferentes variantes.

**TABLA VI**  
Cuantificación de proteínas totales para los sueros estudiados

Característica y tipo de suero	Proteínas (g/100 mL)
Fetal Gibco	3,9
Recién nacido (Flow)	6,5
Recién nacido + calostro	4,1 a 6,5
Recién nacido sin calostro (promedio)	3,1
Fetal CIMA (promedio)	3,2

### Análisis de proteínas

Las figuras 1 y 2 muestran los resultados de electroforesis en acetato de celulosa y en la figura 3 se muestran los de inmunolectroforesis.



Fig. 1. Perfiles electroforéticos en acetato de celulosa de sueros de terneros recién nacidos que ingirieron calostro (1 y 2) comparados con sueros de recién nacido comercial (4) y suero fetal comercial (3)

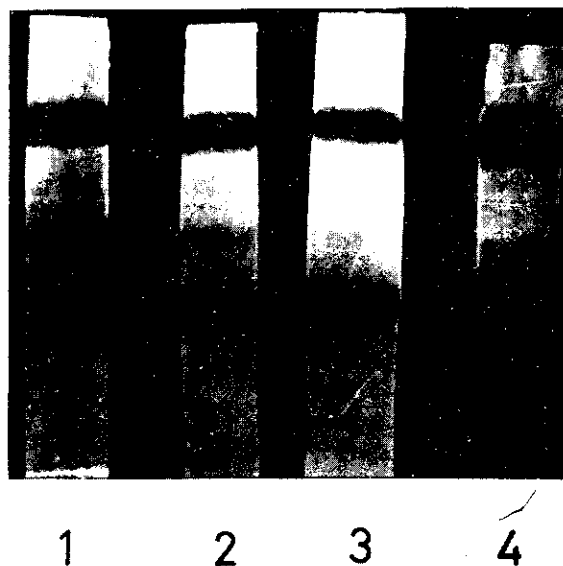


Fig. 2. Perfiles electroforéticos en acetato de celulosa de suero fetal del CIMA (4) comparado con sueros de animales recién nacidos sin consumir calostro (1; 2 y 3)

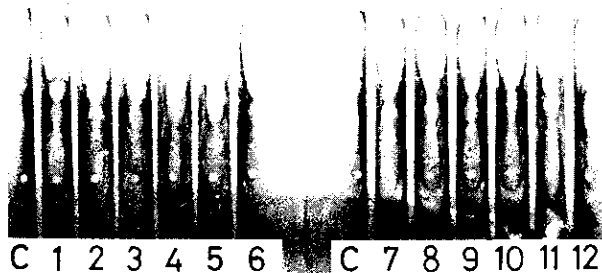


Fig. 3. Perfiles inmunolectroforéticos de sueros de terneros recién nacidos que ingirieron calostro (1; 2; 3; 6; 7; 8; 9; 10; y 12) comparados con sueros de recién nacidos que no consumieron calostro (4 y 5), con suero fetal comercial (11) y con suero de recién nacido comercial (C)

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

El problema de la hemólisis y por consiguiente el contenido de hemoglobina en los sueros para cultivo de tejidos, ha demostrado en la práctica depender de la forma y agilidad con que se efectúen los procesos de coagulación-retracción, centrifugación y congelación preliminar.

La clásica prueba con el reactivo de Drabkin que transforma la hemoglobina en cianometahemoglobina (colorimétrica) y que se utiliza para determinar hemoglobina en el orden de los g/L, ha resultado insensible para sueros típicamente hemolíticos<sup>18</sup>. La Sigma Chemical Co. utiliza el procedimiento colorimétrico de la peróxidasa que detecta hasta 20 mg% para sueros comerciales, fetales y de recién nacidos. No obstante, en el departamento de trabajo de los autores ha sido suficiente la evaluación visual, pues no existe relación directa entre la calidad del suero y un ligero grado de hemólisis, hecho éste que ha sido comprobado durante más de 15 años en la obtención de sueros bovinos.

Aunque se han hecho intentos para reducir el número de virus animales y bacteriófagos en el suero mediante precipitación con Polietilenglicol<sup>19</sup>, este tratamiento remueve macroglobulinas y gammaglobulinas, observándose ligeramente afectadas las propiedades de promoción de crecimiento.

También se ha utilizado ácido peracético para esterilizar suero fetal bovino sin deterioro de las capacidades promotoras de crecimiento<sup>20</sup>, no obstante, este tipo de procesamiento con agentes externos no supera la tradicional filtración a través de membranas de porosidad controlada. La esterilización mediante radiación ultravioleta oscurece ligeramente el suero y requiere una prefiltración en filtro profundo de celulosa, si se desea clarificarlo a través de filtro de membrana<sup>1</sup>.

Algunas firmas comerciales (Gibco y Difco, EU, Flow, Glaterra) utilizan la filtración esterilizante a través de membranas de 0,1  $\mu$ m hasta 3 veces en serie para eliminar fundamentalmente Micoplasmas, lo cual encarece extraordinariamente el producto. En el caso estudiado la filtración a través de membrana de 0,22  $\mu$ m fue suficiente para no encontrar ningún tipo de contaminación

microbiana, incluyendo Micoplasmas, cuya detección en sueros tradicionalmente emplea la técnica de grandes volúmenes recomendada por Barile y Kern<sup>21</sup> que tiene la desventaja de ser muy costosa al requerir 100 mL de suero + 400 mL de caldo para poder lograr suficiente sensibilidad, ya que estos microorganismos no se replican en suero. Por otra parte, la evaluación a través de células indicadoras como la 3T6, además de ser indirecta (no tiene valor diagnóstico), requiere controles estrictamente libres de Micoplasmas.

De extraordinaria importancia para el departamento de trabajo de los autores resultó la comprobación de que la frescura del suero juega un papel determinante en las propiedades de promoción de crecimiento, aun cuando sean comparados con sueros fetales comerciales de calidad superior, inclusive liofilizados, de un precio excesivamente alto en divisas libremente convertibles.

La posibilidad del empleo de suero bovino de recién nacidos sin ingerir calostro en trabajos donde se requiere suero fetal de alta calidad queda avalada por las pruebas de crecimiento y por los niveles de proteína y a los perfiles electroforéticos en comparación con los controles. Más aún, sueros de recién nacidos con consumo de calostro que aportaron valores de proteínas y perfiles electroforéticos similares a los fetales o sin consumo de calostro, fueron utilizados en experimentos de hibridación celular con resultados satisfactorios sin necesidad de esperar la clásica prueba de clonaje de parentales mielómicos ni supervivencia de esplenocitos. Sería interesante, estudiar el contenido de fetuina en estas dos variantes contra control fetal.

Por otra parte, los sueros de recién nacidos sin ingerir calostro no mostraron diferencias en cuanto a promoción de crecimiento, niveles y perfiles proteicos para diferentes horas entre el nacimiento y el momento de la extracción.

Estas características hacen de esta variedad una magnífica opción para sustituir el suero fetal en la mayoría de las aplicaciones más importantes del cultivo de células y tejidos, sobre todo por el hecho de que su utilización, no implica el sacrificio de terneros que quedan así, a disposición del sistema ganadero nacional.

Se comprueba una vez más, que la inactivación indispensable para algunas aplicaciones, como por ejemplo las líneas de mosquito, puede resultar en una pérdida de condiciones promotoras, como ocurrió con la línea L41 tanto en los sueros procesados en el CENIC como en el control al tercer pase.

El problema de la presencia de endotoxinas de origen bacteriano, Gram-negativo (LPS) parece tener tendencia hacia la detección mediante el ensayo de lisado de amebocito *Limulus*, LAL(E-Toxate, No.210, Sigma Chemical Co., con sensibilidad de 0,05 a 0,20 ng/mL contra un patrón de endotoxina de *E. coli*, lote EC-2, de la Administración para las Drogas y Alimentos, FDA, EU. Una vez detectados los niveles de varios lotes pueden hacerse mezclas hasta llegar a niveles por debajo de 50 pg de LPS/mL. Una microtécnica, variante de este ensayo, utiliza solamente 10  $\mu$ L de suero<sup>1</sup>. Otra variante incluye el tratamiento con materiales retenedores de endotoxinas bacterianas como el Detoxigel de la Pierce and Warriner, Ltd, el que mediante cromatografía de afinidad asegura la remoción de lipopolisacáridos componentes de la pared celular de organismos Gram-negativos por debajo de 1-pg/mL. No obstante, su eficiencia, este producto se recomienda preferentemente para el medio de cultivo que contiene ya el suero como aditivo.

No se conoce en estos momentos la incidencia de este factor en el departamento de trabajo de los autores, pero después de introducida la bidestilación en cuarzo (hace algunos años) para el agua de base en los medios de cultivo y aditivos, se pudo controlar un efecto de citotoxicidad que en aquel momento se debió al tratamiento de agua con resinas sintéticas intercambiadoras de iones que constituyen un medio ideal para el desarrollo de bacterias contaminantes y productoras de endotoxinas (comprobado por ensayo biológico).

Con respecto al pH, no parece nada nuevo encontrar que sueros con un valor cercano a 8,0 disminuyen su acción promotora de crecimiento y superior a 8,0 no son ya recomendados.

La detección de triglicéridos demostró que la frescura de las muestras es crítica para esta prueba, debiéndose evitar el análisis post-congelación. Los sueros fetales estudiados oscilaron alrededor del valor fisiológico para bovinos (0,13 mmol/L) y para los sueros de recién nacidos se encontraron niveles superiores, debido probablemente a la acción del calostro como fuente suministradora de grasas en los primeros días de vida.

## RECONOCIMIENTOS

A los departamentos de Bioquímica Clínica y Bioquímica Microbiológica del CENIC por la oportuna asistencia técnica. Al doctor Antonio Ramirez, del Instituto Finlay, por sus valiosas observaciones, a la compañera Nirta Plasencia por el rescate del material de fotografía y al Ing. Eduardo Héctor por la inestimable ayuda en la mecanografía.

## BIBLIOGRAFIA

1. McLeod C., Anderson D. W. J. and Kats W. *Journal of Biological Standardization* 8, 263, 1980.
2. Holley R. W. *Nature* 258, 487, 1975.
3. Wolstenholme G. E. and Knight J. Growth control in cell cultures. Churchill-Livingstone, 1-32, Edinburgh and London, 1971.
4. Dulbecco R. *Nature* 227, 802, 1970.
5. Gospodarowicz D. and Morgan J. *Ann. Rev. Biochem.* 45, 531, 1976.
6. Pledger W. J., Stiles C. D., Antoniadis H. N. and Scher C. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4481, 1977.
7. Ronning O. W. and Pettersen E. O. *Experimental Cell Research* 157, 29, 1985.
8. Murakami H., Masui H., Sato G. H., Sueoka N., Chow T. P., Kano-Sueoka T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1158, 1982.
9. Nuttall P. A., Luther P. D. and Stott E. J. *Nature* 266, 835, 1977.
10. Kniazeff A. J., Wopschall L. J., Hopps H. E. and Morris C. S. *In vitro* 11, 400, 1975.
11. Vieu J. F., Horodniceanu F., Klein B. and Leherissey M. *Journal of Biological Standardization* 6, 221, 1978.
12. Moody E. E. M., Transdale M. D., Jorgensen J. H. and Shelokov A. *Journal of Infectious Diseases* 131, 588, 1975.
13. Whitaker A. M. and Smith E. M. *Development in Biological Standardization* 37, 185, 1977.
14. Shiigi S. M., Capwell R. R., Grabstein K. H. and Mischel R. I. *Journal of Immunology* 119, 679, 1977.
15. Colts J. and Verheiden A. *Clinical Chemical Acta* 18, 325, 1967.
16. Grabar P. and Williams C. A. *Biochem. Biophys. Acta* 10, 193, 1953.
17. Lowry D. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randell J. R. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265, 1951.
18. Hernández F. Dpto. de Bioquímica Clínica, CENIC. (Comunicación personal).
19. Barteling S. J. *Development in Biological Standardization* 37, 91, 1977.
20. Schweitzer H., Sprossig M., Mucke H. and Wutzler P. *Nature, New Biology* 240, 61, 1972.
21. Barile M. F. and Kern J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138, 432, 1971.

# PUBLICACIONES

Es una compilación de algunas de las últimas investigaciones realizadas en el terreno de la psicología cognoscitiva, la neurofisiología clínica, la neurofisiología experimental y la modelación de la actividad eléctrica cerebral.

Consta de 22 trabajos con 286 páginas.



**Editorial CENIC**



Avenida 25 y calle 158, Cubanacán, Playa  
Apartado Postal 6880 y 6990  
Teléf. 21-8066. Ciudad de La Habana, Cuba  
Telex: 51-1582 CNICA CU

