

Estudio de viabilidad celular en un modelo experimental de fibroblastos gingivales humanos cultivados en ausencia de suero bovino fetal

A CELL VIABILITY STUDY ON AN EXPERIMENTAL MODEL OF HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS CULTURED WITHOUT FOETAL BOVINE SERUM

Ana Celeste Ximenes Oliveira (1), Ismael Ángel Rodríguez (1), Ingrid Garzón (1), Miguel Alaminos (1)

1) Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular, Universidad de Granada.

Resumen

El objetivo del estudio es aportar más informaciones metodológicas y conceptuales a cerca del efecto del SBF 10% en ensayos de viabilidad celular sobre fibroblastos gingivales humanos, con la finalidad de optimizar las condiciones experimentales para la obtención de resultados más predictivos. Se utilizarán el ensayo colorimétrico WST-1 para la evaluación de proliferación celular, el ensayo de LDH para evaluación de la integridad de membrana celular, el ensayo de cuantificación de ADN mediante espectrometría y la microscopía óptica de contraste de fases para observar las alteraciones morfológicas. Entre 6 y 24 h, las células sufren poco con la ausencia del SBF 10% y no resulta imprescindible su utilización para evaluar proliferación celular y la integridad de membranas plasmática y nuclear. Sin embargo, la morfología de las células se altera, de forma intensa, a partir de 6 h de ausencia de SBF 10%, por lo que es conveniente utilizarlo para dichos estudios morfológicos.

Palabras clave: suero bovino fetal, viabilidad celular, fibroblastos gingivales humanos, proliferación celular, integridad de membrana celular, cuantificación de ADN.

Abstract

The aim of this study is to improve the methodological and conceptual knowledges about the effect of 10% foetal bovine serum in cell viability assays on human gingival fibroblasts, in order to optimize the experimental conditions to obtain more predictable results. In this study, different methods were used to determine cell proliferation, cell and nuclear membrane integrity and morphological study by using WST-1 assay, LDH assay, DNA quantification and phase contrast microscopy. Our results demonstrated that 10% foetal bovine serum deprivation for 6h up to 24h did not show changes in terms of cell proliferation, cell and nuclear membrane integrity. However, important morphological changes were observed under foetal bovine serum deprivation conditions after 6h. We conclude that, 10% foetal bovine serum does not result essential its utilization to evaluate cell proliferation and their deprivation do not compromise cell survival range and could be suppressed in cell proliferation, cell and nuclear membrane assays without affecting the assays results. In contrast, the utilization of 10% foetal bovine serum becomes crucial in morphological studies and we strongly recommend 10% foetal bovine serum supplement in morphological studies.

Key words: foetal bovine serum, cell viability, human gingival fibroblasts, cell proliferation, cell membrane integrity, DNA quantification.

1. Introducción

La Ingeniería tisular es un área en expansión que asentada en los conocimientos básicos de la histología, tiene por objeto construir tejidos nuevos, funcionalmente activos con la finalidad de reemplazar o sustituir tejidos u órganos perdidos o dañados por distintas causas (1). Para generar nuevos tejidos la Ingeniería tisular utiliza tres herramientas básicas: células con capacidad de renovación, matrices extracelulares, y factores de crecimiento.

Los medios de cultivo, imprescindibles para el desarrollo de la Ingeniería tisular, consisten en una mezcla de solutos en proporción constante y conocida que sirven como nutrientes a las células mantenidas in vitro. Los constituyentes comunes a todos los medios son aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa, tampones, minerales y suero. El suero representa un suplemento necesario para casi todas las líneas celulares y enriquecen el medio con una serie de elementos que favorecen la proliferación celular (2).

La detección de la viabilidad celular es crucial en varios campos biológicos, como en la toxicología, en la farmacología (3) o en el estudio de células que se pretenden utilizar para la construcción de tejidos artificiales por Ingeniería tisular (4). Para investigar en efecto la viabilidad de las células mantenidas en cultivo se utilizan distintas técnicas que evalúan desde los criterios morfológicos, bioquímicos y metabólicos (5) hasta los patrones iónicos intracelulares por microanálisis por energía dispersiva de rayos X (6, 7).

En un cultivo celular, distintos factores influyen en la proliferación y diferenciación celular; mientras otros pueden inducir apoptosis, como hormonas, toxinas, antígenos, fármacos quimioterápicos, carcinógenos, interacciones intercelulares, retirada de factores de crecimiento y traumas físicos (8). La retirada de señales externas, como la ausencia de suero bovino fetal en un medio de cultivo, puede ocasionar una degradación intracelular de proteínas (9), muerte celular (10, 11, 12), estrés oxidativo (13) y reducción de las tasas de proliferación y alteración de viabilidad celular (14).

Por un lado, existen algunas condiciones experimentales que requieren la ausencia de suero bovino fetal (SBF), como algunos estudios sobre la citotoxicidad de fármacos o productos que al someter las células al tratamiento con un producto, diluido en medio de cultivo, no suplementan dicho medio con SBF (15, 16, 17). En dicho contexto, algunos autores, al estudiar la citotoxicidad de la clorhexidina, afirman que la ausencia de SBF en los ensayos evita la precipitación de dicho fármaco en el cultivo (18,19). Seravalli et al (20) afirman que la presencia del SBF en estudios de citotoxicidad de anestésicos locales puede contribuir para que haya absorción de los anestésicos locales por las proteínas del SBF.

Por otro lado, el uso de suero animal en cultivos celulares también soporta una serie de desventajas. Dichas desventajas están relacionadas con aspectos éticos y de bienestar animal (21). En este sentido, la agencia europea para evaluación de medicamentos (EMA), aunque permite el uso de SBF, recomienda la sustitución del mismo por productos de origen no animal o la reducción de su uso (22). Con respecto a esto, De Castro et al (14), mediante un estudio para evaluar un potencial sustituto para el SBF, proponen el posible uso de albumina humana sérica (HSA), una sustancia con aprobación médica de FDA

(Food and Drug Administration) y también presente en el cuerpo humano, para mantener o transportar las células C2C12 durante cortos periodos de tiempo antes de la implantación.

Teniendo en cuenta que los cultivos celulares se utilizan para realizar distintos ensayos de citotoxicidad, el uso del SBF, una sustancia que posee distintos componentes, puede introducir variables en el sistema de cultivo celular. De esa forma, dependiendo del tiempo de duración y del tipo de ensayo realizados, la ausencia de SBF podrá o no afectar los resultados del estudio.

Al existir una serie de situaciones experimentales en la que se recomienda no utilizar el suero bovino fetal (SBF) en los ensayos, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la ausencia del SBF sobre la viabilidad celular, en concreto el efecto sobre la proliferación celular, la integridad de la membrana y la morfología de la célula.

2. Materiales y métodos

Cultivo celular.

Fibroblastos gingivales humanos fueron cultivados en DMEM suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF 10%) y antibióticos, con la densidad de 2×10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, en una incubadora húmeda bajo las condiciones de 95% de aire y 5% CO₂ en 37° C por 48 horas. Después de 48 h de cultivo, se consideró el inicio del experimento. En este experimento se utilizaron fibroblastos del pase tercero (III).

Retirada del Suero Bovino Fetal (SBF).

En este trabajo se han destinado ocho pocillos para cada grupo experimental (6 h, 12 h, 24 h, 48 h), totalizando en cuatro el número de grupos experimentales. Cada grupo experimental de 6 h, 12 h, 24 h y 48 h fue dividido en dos subgrupos: cuatro pocillos para las células mantenidas con DMEM sin SBF 10% y cuatro pocillos para las células mantenidas con DMEM suplementado con SBF 10%, lo que se consideró como sus propios grupos controles. Antes de empezar la sustitución de DMEM suplementado con SBF 10% por DMEM solo, todos los pocillos fueron cambiados por DMEM suplementado con SBF 10%, para que hubiera un nuevo aporte de nutrientes para las células. En todos los grupos experimentales, se eliminó el DMEM con SBF 10% en los ocho pocillos del grupo sometidos a evaluación, se lavó tres veces con PBS y se agregó DMEM solo en cuatro pocillos y en los

otros cuatro pocillos DMEM con SBF 10%. Dicho proceso fue realizado para cada grupo experimental, organizando la sustitución de los medios de cultivo de forma que las lecturas de los ensayos fueran hechas al mismo tiempo.

Análisis morfológico.

Para evaluar las alteraciones morfológicas de las células sometidas a la ausencia del SBF 10%, se observaron los fibroblastos mediante un microscopio óptico de contraste de fases (Nikon Eclipse i90).

Ensayo colorimétrico WST-1.

Para evaluar la influencia de la retirada del SBF 10% en la proliferación celular, el sobrenadante de todos los grupos experimentales fue retirado, las células fueron lavadas una vez con PBS, el reactivo WST-1, preparado anteriormente con medio de cultivo (con o sin SBF, de acuerdo a su grupo experimental o control), fue agregado en la proporción de 10 μ l de reactivo para 100 μ l de medio de cultivo en cada pocillo. Las células fueron incubadas durante 4 h de acuerdo con el manual de instrucciones del kit. Se realizó la lectura en un lector de placas (UVM 340 Microplate Reader ASYS) utilizando las longitudes de onda recomendadas 450 nm – 690 nm. El ensayo fue realizado por cuadruplicado.

Ensayo LDH.

Para evaluar la influencia de la retirada del SBF 10% en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular mediante la detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo, se retiró el sobrenadante de todos los grupos experimentales. En una placa de 96 pocillos, una alícuota de 100 μ l de sobrenadante fue colocada en un pocillo y luego se le agregó una alícuota de 100 μ l del reactivo anteriormente preparado de LDH, de acuerdo al manual de instrucciones del kit. Para investigar la cantidad de enzima LDH presente en el SBF 10%, en un pocillo sin células cultivadas se agregó DMEM solo y en otro DMEM suplementado con SBF 10%. Se realizó la lectura en un lector de placas (UVM 340 Microplate Reader ASYS) utilizando la longitud de onda recomendada de 490 nm. El ensayo fue realizado por triplicado.

Cuantificación de ADN.

Para cuantificar el ADN liberado en el medio de cultivo por los fibroblastos sometidos a ausencia de SBF 10%, se retiró el sobrenadante de todos los grupos experimentales.

Una alícuota de 10 μ l del sobrenadante fue diluida en 90 μ l de agua bidestilada. Se realizó la lectura mediante espectrometría (SmartSpec™ Plus Spectrophotometer BIO-RED) utilizando la longitud de onda de 260 nm – 280 nm. El ensayo fue realizado por triplicado.

3. Resultados

Análisis morfológico.

El análisis de los fibroblastos gingivales humanos cultivados sometidos a la ausencia de SBF 10% reveló la existencia de alteraciones morfológicas a partir de 6 h (Fig.1B). Las células se volvieron esféricas. A partir de 12 h, además de esta conformación esférica, presentaron cuerpos apoptóticos (Fig. 1C).

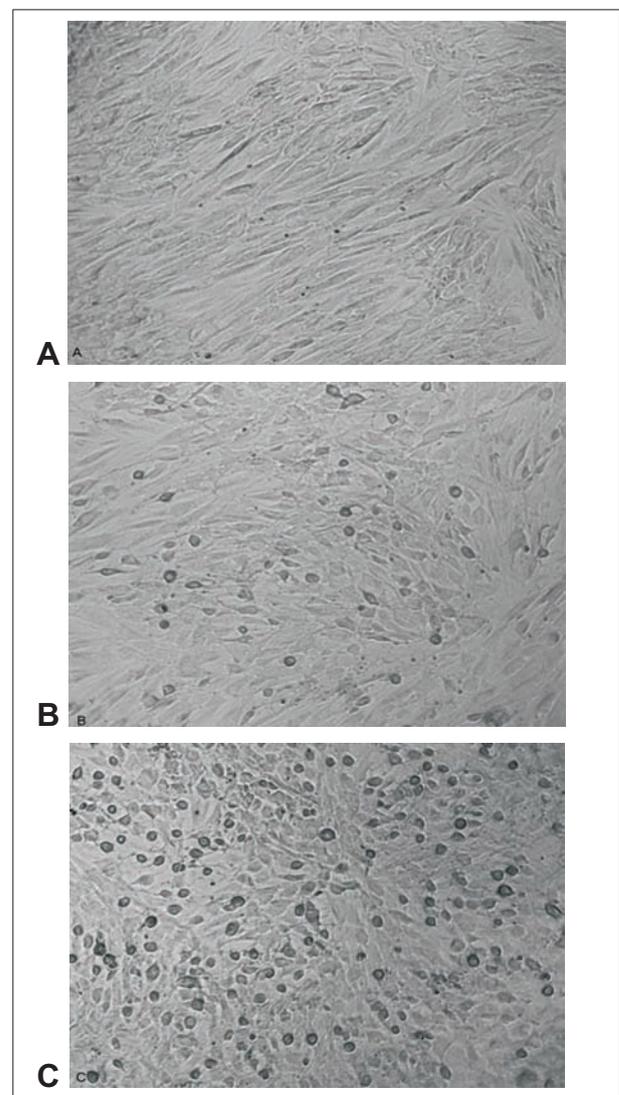


Fig. 1. Fibroblastos gingivales humanos cultivados en la presencia de SBF 10% mostrando la morfología típica fusiforme (A). Fibroblastos gingivales humanos sometidos a 6 h de ausencia de SBF 10% mostrando la conformación redonda de parte de los fibroblastos (B) y a 12 h de ausencia de SBF 10% mostrando mayor cantidad de fibroblastos redondos y cuerpos apoptóticos (C). Fotomicrografías representativas por contraste de fases (10x).

Ensayo colorimétrico WST-1.

En los fibroblastos gingivales humanos cultivados sometidos a la retirada de SBF 10%, la proliferación celular se mantuvo en niveles parecidos entre los periodos de 6 h hasta las 24 h (1.14%, 3.23%, 2.87% de reducción de proliferación celular a las 6, 12 y 24 h, respectivamente), mientras que a las 48 h hubo una reducción en los niveles de la proliferación celular que alcanzó el 15.07%. Estos resultados indican que a las 48 h con ausencia de SBF 10% las células sufren y son dependientes del suero para mantener sus tasas de proliferación celular (Fig. 2).

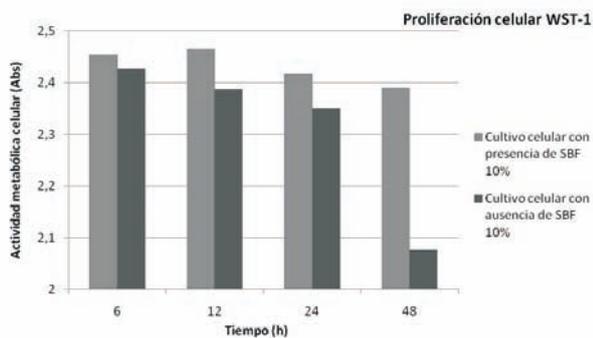


Fig. 2. Actividad metabólica celular de fibroblastos gingivales humanos cultivados con presencia de SBF 10% y con ausencia SBF 10% utilizando el ensayo WST-1 (Abs: absorbancia).

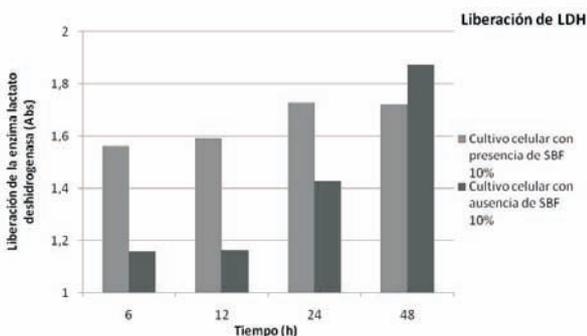


Fig. 3. Liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo de los fibroblastos gingivales humanos cultivados con presencia de SBF 10% y ausencia de SBF 10% (Abs: absorbancia).

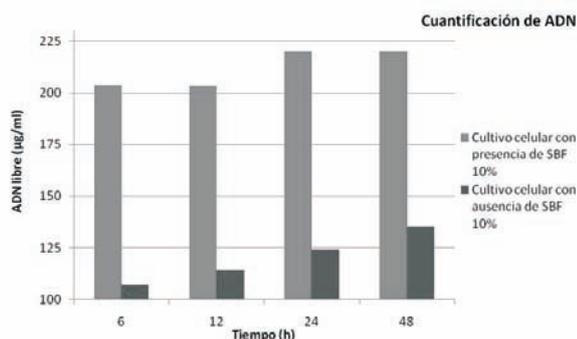


Fig. 4. Cantidad de ADN libre detectado en el medio de cultivo de los fibroblastos gingivales humanos cultivados con presencia de SBF 10% y ausencia de SBF 10%.

Ensayo LDH.

En los sobrenadantes de los cultivos de fibroblastos gingivales humanos sometidos a la ausencia de SBF 10%, la cantidad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) aumentó siguiendo una relación tiempo dependiente. Cuando fue comparada con sus grupos controles, se detectó reducciones de LDH de 34.79% para 6 h, de 36.90% para 12 h, de 21% para 24 h y un aumento de 8,72% para 48 h, indicando características de muerte celular por necrosis. La cantidad de LDH liberada demostró ser más elevada en los grupos que contenían SBF 10% en el medio de cultivo, en todos los tiempos evaluados (Fig. 3).

Cuantificación de ADN

En los sobrenadantes de los cultivos de fibroblastos gingivales humanos sometidos a la ausencia de SBF 10%, los niveles de fragmentos de ADN detectados aumentaron siguiendo una relación tiempo dependiente. Sin embargo, al comparar con sus grupos controles, que contenían SBF 10%, hubo una reducción tiempo dependiente de la diferencia entre ellos (90.58%, 78.46%, 77.48% y 62.88% para 6, 12, 24 y 48 h respectivamente). La cantidad de ADN detectada demostró ser más elevada en los grupos que contenían SBF 10% en el medio de cultivo, en todos los tiempos evaluados (Fig. 4).

4. Discusión

La Ingeniería tisular es un área de la medicina regenerativa que tiene por finalidad construir tejidos nuevos, que sean capaces funcionalmente de sustituir órganos dañados por enfermedades, traumas u otras causas. Para lograr eso se utilizan células, cultivadas en matrices de distintos tipos de biomateriales, y mantenidas en medios de cultivo que contienen, entre otros componentes, factores de crecimiento. Evaluar la viabilidad celular es imprescindible para el control de calidad de esos tejidos. En el presente trabajo, al retirar el SBF 10% de los cultivos celulares no hubo variaciones importantes en los niveles de proliferación celular entre los periodos de 6 h y 24 h, mientras que a las 48 h se detectó una reducción de 15.07%. Abe et al. (11) han descrito que bajo la ausencia del suero o factores de crecimiento, una parte de los fibroblastos gingivales sufre apoptosis, mientras otra parte sobrevive y expresa la fosfatasa alcalina.

Por otro lado, M de Castro et al. (14) han mostrado que la sustitución del SBF 10% por SBF 1%, por 3 días de incubación, causó una reducción de 90% en la tasa de proliferación celular y de 80% en la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Slot et al. (9) han demostrado que, en fibroblastos humanos cultivados con la ausencia de suero, el aumento de la proteólisis involucra los lisosomas y afecta solo una subpoblación de proteínas celulares.

En la presente investigación, se observó que al retirar el SBF 10% del cultivo a las 6 h las células se hacen esféricas y a las 12 h presentan cuerpos apoptóticos. Kulkarni et al. (10) han demostrado que la ausencia de SBF causó esfericidad celular, pérdida de contacto intercelular, condensación celular, compactación de cromatina celular, fragmentación nuclear, preservación de la integridad de la membrana y organelas, ausencia de fragmentación de ADN y reducción del calcio intracelular, y han concluido que existe una población de células apoptóticas y otra potencialmente apoptóticas, pero todavía viables. Por otro lado, Leicht et al. (12) han observado la presencia de eventos específicos de ambos procesos, de apoptosis y necrosis, durante la muerte de fibroblastos cardíacos de rata a las 5 h después de la retirada de suero.

En el presente estudio, se detectó aumentos de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo con el tiempo, por lo que se puede concluir que la integridad de la membrana de las células se alteró, permitiendo la liberación de dicha enzima citosólica.

No se encontró mayor liberación de LDH en los grupos de 6, 12 y 24 h, sino que la diferencia entre dichos grupos experimentales y sus grupos controles fue mayor. En el grupo de 48 h se encontró una liberación más acentuada, pues probablemente con este tiempo bajo la ausencia de SBF hay una tasa más elevada de muerte celular. Por otro lado, al analizar la actividad de LDH en medio DMEM y medio DMEM suplementado con SBF 10%, sin células, se detecta que existe actividad de LDH que es superior en el medio suplementado con SBF 10% que en el medio que contiene solo DMEM.

Boraldi et al. (13) han mostrado que la ausencia de suero por 48 h representa un

estrés oxidativo que no alteró la viabilidad celular, pero demostró ser una condición capaz de aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), influenciar el metabolismo celular e interferir en el comportamiento celular.

En el presente experimento, los niveles de ADN detectados en el medio de los fibroblastos sometidos a la retirada de SBF 10% aumentaron siguiendo una relación tiempo dependiente, sin embargo al comparar con sus grupos controles, que contenían SBF 10%, hubo una reducción tiempo dependiente en la cantidad de ADN (90.58%, 78.46%, 77.48% y 62.88% para 6, 12, 24 y 48 h respectivamente). Se observó una mayor cantidad de ADN libre en los cultivos que contenían DMEM con SBF 10% comparados con los grupos que contenían medio DMEM solo, debido probablemente a la presencia de fragmentos de ADN originados del suero del animal donante.

En relación con el ADN, Bortner et al. (8) han descrito distintos tipos de fragmentación con respecto a los mecanismos de muerte celular.

A partir de nuestros resultados sobre la cuantificación de ADN, sería conveniente evaluar en el futuro las longitudes de los fragmentos liberados de ADN para mejor conocer los tipos de muerte celular.

De acuerdo a la presente investigación, se concluye que los resultados de los ensayos utilizados corroboran entre sí. Los ensayos WST-1 y LDH son igual de sensibles y específicos. Entre 6 y 24 h, las células sufren poco con la ausencia del SBF 10% y no resulta imprescindible utilizarlo en evaluaciones de proliferación celular, integridad de membranas plasmática y nuclear. Sin embargo, la morfología de las células se altera, de forma intensa, a partir de 6 h de ausencia de SBF 10%, por lo que es conveniente utilizarlo para dichos estudios morfológicos.

Referencias

1. Campos A. Objetivos conceptuales y metodológicos de la investigación histológica. Educación Médica 2004 7(2): 36-40.

2. García del Moral R. Laboratorio de anatomía patológica. Ed Interamericana McGraw-Hill. Madrid, España 1993.

3. Bopp SK, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. BMC Pharmacol 2008 8(8).

4. Campos A. Cuerpo, histología y medicina. De la observación microscópica a la Ingeniería tisular. Discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina y Cirugía 2004.
5. Rodríguez IA, Fernández-Segura E, Ceballos G, Arrebola F, del Carmen Sánchez-Quevedo M, Campos A. Hybrid cell death induced by exposure to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA): an ultrastructural and microanalytical study. *J Adhes Dent* 2008 10(2):105-111.
6. Carini R, Autelli R, Bellomo G, Dianzani MU, Albano E. Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxins. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 206: 180-185.
7. Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron Probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res* 1999 253:454-462.
8. Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1995 5: 21-26.
9. Slot LA, Lauridsen AMB, Hendil KB. Intracellular protein degradation in serum-deprived human fibroblasts. *Biochem J* 1986 237: 491-498.
10. Kulkarni GV, McCulloch AG. Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci* 1994 107: 1169-1179.
11. Abe T, Hara Y, Abe Y, Aida Y, Maeda K. Serum or growth factor deprivation induces the expression of alkaline phosphatase in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1998 77(9): 1700-1707.
12. Leicht M, Marx G, Karbach D, Gekle M, Köhler T, Zimmer Heinz-Gerd. Mechanism of cell death of rat cardiac fibroblasts induced by serum depletion. *Mol Cell Biochem* 2003 251: 119-126.
13. Boraldi F, Annovi G, Paolinelli-Devincenzi C, Tiozzo R, Quaglino D. The effect of serum withdrawal on the protein profile of quiescent human dermal fibroblasts in primary cell culture. *Proteomics* 2008 8: 66-82.
14. De Castro M, Orive G, Gascón AR, Hernandez RM, Pedraz JL. Evaluation of human serum albumin as a substitute of foetal bovine serum for cell culture. *Int J Pharm* 2006 310: 8-14.
15. Martinsson T, Haegerstrand A, Dalsgaard Carl-Johan. Ropivacaine and lidocaine inhibit proliferation of non-transformed cultured adult human fibroblasts, endothelial cells and keratinocytes. *Agents Actions* 1993 40: 78-85.
16. Tipton DA, Lyle B, Babich H, Dabbous MKh. In vitro cytotoxic and anti-inflammatory effects of myrrh oil on human gingival fibroblasts and epithelial cells. *Toxicology in vitro* 2003 17: 301-310.
17. Faria G, Celes MRN, De Rossi A, Silva LAB, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured L929 fibroblasts. *JOE* 2007 33(6): 715-722.
18. Mariotti AJ, Rumpf DAH. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol* 1999 70(12): 1443-1448.
19. Flemingson, Emmadi P, Ambalavanan N, Ramakrishnan T, Vijayalakshmi R. Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: an in vitro study. *IJDR* 2008 19(1):29-35.
20. Seravalli EP, Lear E, Cottrell JE. Cell membrane fusion by chloroprocaine. *Anesth Anal* 1984 63: 985-990.
21. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex* 2011 27: 52-62.
22. Committee for Proprietary Medical Products. Note for guidance on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medical products. The European Agency for the Evaluation of Medical Products, <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003675.pdf> 2003.