

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Caracterización de la línea celular Swan 71

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología

Rocío Amorín – 172633

Valentina Goldberg – 159285

Karina Krysztal – 153778


Tutor: Josefina Louge

2015

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Nosotras, Rocío Amorín, Valentina Goldberg y Karina Krysztal, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:


- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el Proyecto de Grado;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotras;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Rocío Amorín



Valentina Goldberg



Karina Krysztal

Montevideo, 13 de Abril del 2015.

AGRADECIMIENTOS

A Josefina Louge por la paciencia y por guiarnos durante el proyecto. A Ema por secretar hCG.

A Gil Mor por habernos donado la línea celular Swan 71, sin la cual este proyecto no podría haber sido realizado.

A Horacio Cardoso por su contribución en el proyecto, en el cual participó de forma activa. No solamente nos permitió acudir al laboratorio Genodiagnosis, donde nos facilitó el uso de las instalaciones para entrenarnos en la metodología de cariotipo, sino que también nos capacitó en el tema y nos donó reactivos.

A José Badano, por permitirnos utilizar la línea celular NIH3T3 donada por él, que permanecía almacenada en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT.

A Mariela Bollati del Institut Pasteur de Montevideo por donarnos un reactivo muy importante para el proyecto.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT por ayudarnos en dudas y procedimientos.

Rocío agradece:

A mi familia por apoyarme siempre y permitirme realizar esta carrera.

A María, Marcela y Federico.

A las chicas, en especial Natalia, Angeline, Lía, Antonella, Giuliana y Carolina.

A mis compañeras y amigas Valentina y Karina, por realizar este proyecto conmigo.

A Josefina por su ayuda y apoyo.

Y por último, a todas aquellas personas que de cualquier manera me han acompañado en este proceso.

Valentina agradece:

A mi familia y mis amigas por bancarme en los peores momentos.

A mis compañeras de tesis y tutora por embarcarse en este proyecto conmigo.

Karina agradece:

A mi familia por siempre apoyarme y creer en mí. A mi madre, por ser el apoyo incondicional y mi compañera todos los días. A mis hermanos, que aunque no están presentes me acompañaron durante todo el camino. A mi tía, por cuidarnos y estar siempre pendiente de que estemos bien.

A Josefina, Rocío y Valentina por este proyecto y por enfrentar juntas todos los contratiempos.

A mis amigas.

ABSTRACT

El presente trabajo consiste en la caracterización de un clon de la línea celular Swan 71 almacenado en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT. Swan 71 es una línea celular de trofoblastos humanos, en particular citotrofoblastos extravelosos, la cual es una célula con fenotipo proliferativo e invasor. El interés de validar una línea celular surge debido a que de lo contrario se reduce completamente la fiabilidad de los resultados de una investigación.

Considerando esto, y junto con el creciente interés en el estudio de trofoblastos humanos, se creyó necesario realizar tal caracterización con el fin de validar los resultados de los trabajos a llevarse a cabo con esta línea celular, asegurando así confiabilidad. Con el presente trabajo, se pretende contribuir a futuro en la investigación de la fertilización asistida mediante el estudio de los procesos de invasión del embrión y la posible estimulación de dicho mecanismo.

Para ello, se estudió la tasa de crecimiento de la línea celular en diferentes concentraciones de SFB determinando diversos parámetros tales como velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación. Por otra parte, se analizó la morfología celular a distintas densidades y el contenido cromosómico mediante la realización de un cariotipo. Se evaluó la excreción de hCG empleando dos métodos distintos así como la presencia de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en muestras de sobrenadante de cultivo celular. A su vez, se realizó un análisis de contenido de ADN y ciclo celular de la población mediante citometría de flujo.

Se observó que la línea celular tiene un tiempo de duplicación en promedio de 1,5 días y una velocidad de crecimiento de $0,46 \text{ días}^{-1}$. La morfología de la línea celular se asemeja a la de un trofoblasto primario con características de citotrofoblastos tanto vellosos como extravelosos. Los resultados del contenido cromosómico mostraron un cariotipo principalmente pentaploide con diversas aberraciones cromosómicas. Por otro lado, no se observó presencia de hCG en el sobrenadante de cultivo con las metodologías empleadas, pero sí se observó actividad de las MMP-2 y MMP-9 en el mismo. El análisis mediante citometría de flujo, mostró que la población pasa un largo período en la fase S del ciclo celular.

De esta manera, se logró cumplir con los objetivos de caracterizar a la línea celular Swan 71 a un pasaje promedio entre 17 y 27.

PALABRAS CLAVE

Caracterización. Cariotipo. Citometría de flujo. Citotrofoblasto extraveloso. Gonadotropina Coriónica humana. Línea celular Swan 71. Metaloproteasas. Morfología. Parámetros de crecimiento. Validación.

ABREVIATURAS

CTEV: Citotrofoblasto Extravelloso.

CTV: Citotrofoblasto Velloso.

CV: Coeficiente de Variación.

DMEM: del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ELISA: del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.

EDTA: del inglés, *Ethylenediaminetetraacetic Acid*.

FDA: del inglés, *Food and Drug Administration*.

FISH: del inglés, *Fluorescence in situ Hybridization*.

FSC: del inglés, *Forward-Scattered Light*.

hCG: del inglés, *Human Chorionic Gonadotropin*.

HLA-G: del inglés, *Human Leukocyte Antigen G*.

hTERT: del inglés, *Human Telomerase Reverse Transcriptase*.

IP: Ioduro de Propidio.

IVF: del inglés, *In Vitro Fertilization*.

MCB: del inglés, *Master Cell Bank*.

MEC: Matriz Extracelular.

MHC: del inglés, *Major Histocompatibility Complex*.

MMP: del inglés, *Matrix Metalloproteinase*.

NRK: del inglés, *Normal Rat Kidney*.

PBS: del inglés, *Phosphate Buffered Saline*.

PFA: Paraformaldehído.

SBF: Suero Fetal Bovino.

SD: del inglés, *Standard Deviation*.

SDS: del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate*.

SDS-PAGE: del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis*.

SSC: del inglés, *Side Scattered Light*.

SV40: del inglés, *Simian Vacuolating Virus 40*.

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano.

UN: del inglés, *unknown*.

WCB: del inglés, *Working Cell Bank*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Cultivo celular	10
1.1.1 Senescencia, inmortalización y transformación de líneas celulares.....	10
1.2 Trofoblastos y su rol en la implantación	12
1.3 Línea celular Swan 71.....	14
1.4 Caracterización de una línea celular	15
1.4.1 Ensayos morfológicos	17
1.4.2 Ensayos citogenéticos	17
1.4.3 Ensayos enzimáticos y proteicos.....	18
1.4.4 Ensayos inmunológicos	18
1.4.5 Análisis de contenido de ADN y ciclo celular	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo general.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. METODOLOGÍA	21
3.1 Reactivos generales	21
3.2 Líneas celulares	21
3.3 Procedimientos básicos	21
3.3.1 Tripsinización	21
3.3.2 Recuento celular	22
3.3.3 Mantenimiento de los cultivos	22
3.3.4 Congelación y descongelación	22
3.4 Curvas de crecimiento	23
3.5 Análisis Morfológico.....	24
3.5.1 Estudio de Morfología a diferentes densidades en microscopio invertido	24
3.5.2 Estudio de Morfología a diferentes densidades en microscopio de contraste de fase.....	24
3.6 Cariotipo.....	24
3.7 Determinación del contenido de ADN mediante citometría de flujo.....	25
3.8 Detección de hCG en sobrenadante de cultivo	26
3.8.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	26
3.8.1.1 Sobrenadante con SFB	26
3.8.1.2 Sobrenadante sin SFB	27

3.8.1.3 Tinción.....	27
3.8.2 Inmunocromatografía	27
3.9 Zimograma	27
4. RESULTADOS OBTENIDOS	29
4.1 Curvas de crecimiento	29
4.1.1 Curvas obtenidas de cultivos complementados con 10% SFB.....	29
4.1.2 Curvas obtenidas de cultivos complementados con 5% SFB.....	31
4.1.3 Observaciones empíricas durante el desarrollo del cultivo.....	34
4.2 Análisis morfológico.....	34
4.2.1 Morfología general.....	34
4.2.2 Estudio de morfología a diferentes densidades en microscopio invertido	35
4.2.3 Estudio de morfología a diferentes densidades en microscopio de contraste de fase	37
4.3 Análisis del contenido cromosómico	37
4.4 Análisis mediante citometría de flujo	42
4.5 Detección de hCG en sobrenadante de cultivo	47
4.5.1 Electroforesis SDS-PAGE	47
4.5.2 Inmunocromatografía	49
4.6 Detección de metaloproteasas	50
5. DISCUSIÓN	53
6. ANÁLISIS ECONÓMICO	56
7. CONCLUSIÓN.....	58
7.1 Conclusión general.....	58
7.2 Conclusiones específicas.....	58
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUCCIÓN

El trabajo a continuación surge a partir del interés de una empresa en la investigación de los mecanismos de invasión e implantación en el útero materno durante el embarazo. Para posibilitar dicha investigación, se aborda la caracterización de un clon de la línea celular Swan 71, constituida por citotrofoblastos de primer trimestre de embarazo, almacenado en el banco celular del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay. Esto se lleva a cabo con el fin de validar sus características e identificar y registrar desviaciones para, de esta forma, asegurar resultados confiables y reproducibles.

1.1 Cultivo celular

Se entiende como cultivo celular eucariota de animales superiores al mantenimiento *in vitro* de células tomadas de un tejido original, de un cultivo primario o de una línea celular. Los cultivos primarios se obtienen directamente de la disgregación de fragmentos de órganos o tejidos y son considerados como tales hasta el primer subcultivo. Su obtención es laboriosa, no todas las células sobreviven, pues están sujetas a estrés considerable, requieren condiciones de cultivo específicas y suelen contaminarse con facilidad. La ventaja de este tipo de cultivos es que mantienen las características del tejido original.

Dada la heterogeneidad del cultivo primario de origen, se requieren sucesivos subcultivos para alcanzar una línea celular homogénea. Estas líneas celulares son generalmente diploides y mantienen cierto grado de diferenciación, sin embargo, poseen un número de divisiones restringido a 50 ± 10 (1).

Considerando la corta vida útil previamente mencionada de las líneas celulares y los cultivos primarios, se ha impulsado al establecimiento de líneas celulares inmortalizadas como herramienta para la investigación, proceso que consiste en la generación de una línea celular capaz de ser propagada por un período de tiempo indeterminado (2).

1.1.1 Senescencia, inmortalización y transformación de líneas celulares

La senescencia se define como un arresto irreversible del crecimiento celular. Este proceso está controlado por un grupo de genes que regulan negativamente al ciclo celular poniendo fin a la proliferación de las células. Ha sido demostrado un vínculo entre el fin de este potencial replicativo y el progresivo acortamiento de los telómeros, indicando que, una vez alcanzado una determinada longitud de los mismos, se activa el fenotipo celular de senescencia (3). Sin embargo, es posible desviar la senescencia celular mediante la inmortalización. Se cree que la misma es un proceso de varios pasos que implica la inactivación de un número de genes reguladores del ciclo celular, tales como los genes que codifican para Rb y p53. Generalmente se utiliza el gen SV40 LT para inducir la inmortalización. El producto de dicho gen, un antígeno T, une Rb y p53, lo cual no solamente extiende la vida útil proliferativa sino que también restringe la actividad de vigilancia del ADN de genes como el p53. Esto permite un aumento en la inestabilidad genómica y en la posibilidad de generar mutaciones adicionales que resultan favorables para la inmortalización (4).

En el contexto del presente trabajo se hace necesario diferenciar entre los términos inmortalización y transformación. La inmortalización *per se* no implica el desarrollo de un control del crecimiento aberrante y malignidad; durante este proceso se retiene la inhibición por contacto, la limitación de la proliferación por la densidad celular y la dependencia de anclaje. Sin embargo, algunos aspectos de control del crecimiento son anormales y existe un probable aumento de la inestabilidad genómica (4).

Se le llama transformación de una línea celular a la introducción espontánea o inducida de cambios fenotípicos heredables en una célula. En la transformación de una línea celular se observan tres clases principales de cambios fenotípicos: la inmortalización de la línea, aberraciones en el control del crecimiento debido a la falta de muerte celular por inhibición de contacto y malignidad (4).

Las principales características que se observan en una línea celular al transformarla incluyen: morfología celular alterada (menor adherencia, células más redondeadas, mayor relación núcleo/citoplasma), variación en las tasas de crecimiento (decrecimiento del tiempo de duplicación), menor dependencia de factores de crecimiento, así como un aumento de la heteroploidía y aneuploidías (5). Dichas transformaciones no son deseables ya que alteran la biología de la célula original, por lo que es necesario tenerlos en cuenta a la hora de utilizar una línea celular transformada para cualquier tipo de análisis o ensayo científico.

A fin de encontrar una metodología capaz de revertir dichas transformaciones, Yamada *et al.* (6) llevaron a cabo un estudio en el cual restauraron la morfología de la célula original en ciertas líneas celulares transformadas, mediante el tratamiento con una proteína de la superficie celular de fibroblastos embrionarios de pollo. Las células control fueron tratadas con *buffer* y luego se compararon con las células tratadas con la proteína mencionada.

En la figura 1 se muestra la morfología alterada de la línea celular NRK (del inglés, *Normal Rat Kidney*) (Figura 1.A) transformada con el virus sarcoma de Kirsten y la morfología normal de la misma línea restaurada (Figura 1.B). Comparando ambas figuras, es posible observar que las células tratadas con *buffer* (control) en lugar de la proteína en cuestión exhiben la morfología típica de una línea transformada previamente mencionada, pues las células se observan redondeadas, con núcleos de mayor tamaño y menor adherencia.

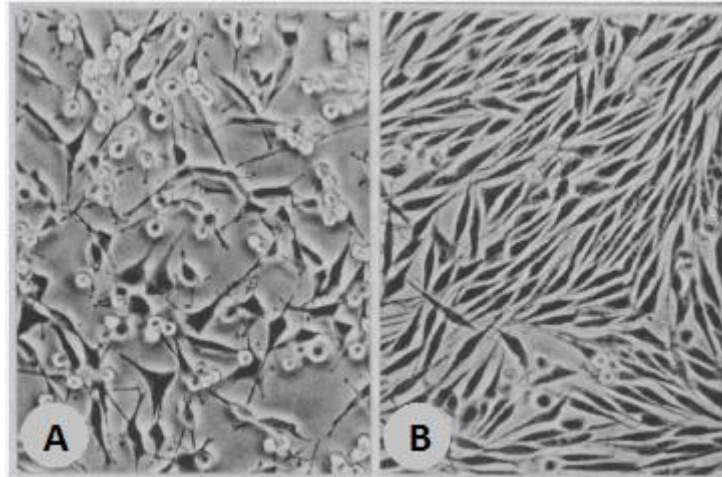


Figura 1. Células NRK transformadas con virus sarcoma de Kirsten. Tratadas con *buffer* (A), o proteína de superficie celular de fibroblastos embrionarios de pollo (B) Adaptado de Yamada *et al.*, 1976 (6).

Otra estrategia empleada para la inmortalización es la transfección del gen de la telomerasa con un promotor regulable (4). La telomerasa es un complejo de ribonucleoproteínas capaz de sintetizar las repeticiones en los extremos terminales de los telómeros. Al transfectar las células con el gen hTERT, codificante para el componente catalítico de la holoenzima telomerasa, se observa un mantenimiento de los telómeros por encima de la longitud basal y un desarrollo de inmortalidad de la línea celular. Esta es una prometedora técnica de inmortalización ya que no necesariamente implica los cambios fenotípicos asociados con la transformación celular previamente mencionados (3, 4).

1.2 Trofoblastos y su rol en la implantación

La placenta humana es un órgano fetal que resulta fundamental tanto para el desarrollo del embrión como para que el embarazo sea llevado a término con éxito. Durante el primer trimestre de embarazo, la placenta presenta estructura vellosa, contiene vasos sanguíneos fetales y macrófagos en un centro de tejido conectivo mesenquimático, rodeado de una capa de citotrofoblastos mononucleares que a su vez se encuentran rodeadas por una capa continua de sincitiotrofoblasto multinucleado. Este órgano posee un rol importante en la implantación, y actúa como interfase entre la madre y el feto (7).

La etapa de implantación representa una transición en el proceso del embarazo, durante el cual el blastocisto adopta una posición fija y comienza a relacionarse fisiológicamente con el útero. Dicha etapa siempre involucra una interacción directa del trofoblasto del blastocisto con el epitelio luminal del útero. La adhesión de los trofoblastos a las células uterinas se ve involucrada en el anclaje inicial del blastocisto a la superficie apical del epitelio uterino (Figura 2). Luego de que el mismo se rompe, la penetración avanza mediante el flujo de los trofoblastos a través del epitelio y de su lámina basal, a tejidos estromales. Durante las primeras etapas de este proceso, los trofoblastos parecen estar anclados lateralmente al epitelio intacto. La adhesión en etapas sucesivas de la implantación puede estar involucrada en el flujo del citoplasma de trofoblastos a los tejidos, alrededor de glándulas uterinas, penetración de vasos sanguíneos, entre otros (8).

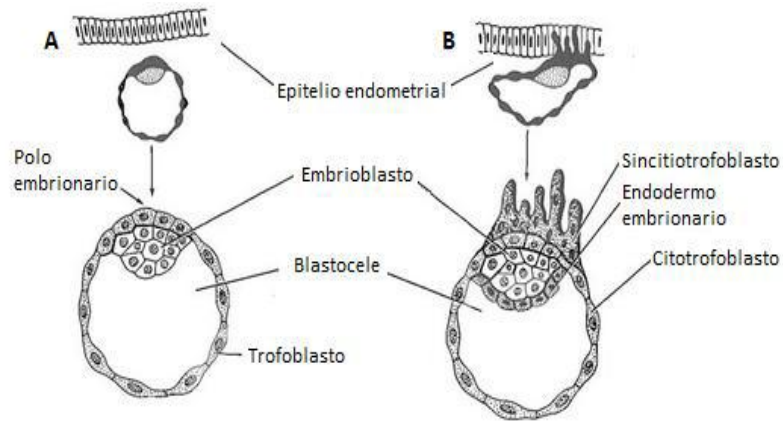


Figura 2. Invasión del epitelio endometrial. Blastocisto al sexto día de embarazo (A), blastocisto al séptimo día de embarazo (B). Adaptado de Pansky, 1982 (9).

Durante la invasión uterina, los trofoblastos se diferencian en citotrofoblastos extravellosos (CTEV) o citotrofoblastos vellosos (CTV). El CTEV es una célula con fenotipo proliferativo e invasor, mientras que el CTV no posee capacidades invasoras y se diferencia a sincitiotrofoblasto, una célula multinucleada encargada del intercambio de gas y nutrientes entre el feto y la madre (10, 11).

La fusión de células de trofoblasto individuales para formar un sincitio es una característica prominente de la implantación y placentación. El sincitio parece tener propiedades que resultan ventajosas en el proceso de implantación. Aparentemente, posee un buen flujo de superficie, lo cual le permite no solamente formar proyecciones ectoplásmicas sino que también presenta actividad endocítica. El involucramiento de una gran masa de citoplasma puede facilitar el flujo de dicho sincitio en espacios irregulares, además de permitirle rodear completamente células individuales y glándulas (8).

La investigación de los procesos en los que participan los trofoblastos se ha visto restringida por la falta de un modelo celular adecuado. En los últimos tiempos, se han desarrollado una gran cantidad de líneas celulares empleando diferentes métodos (Tabla 1). Sin embargo, se ha visto que las mismas poseen características fenotípicas diferentes. Se han generado varias líneas celulares utilizando, por ejemplo, Simian Virus 40 (SV40), pero se ha demostrado que este procedimiento induce anomalías cariotípicas y fenotípicas. Una alternativa utilizada son las líneas celulares coriocarcinómicas derivadas de trofoblastos, no obstante, estas células son malignas y tumorigénicas. Por lo tanto, los resultados obtenidos de estos estudios, si bien son valiosos, deben ser interpretados con cautela (12).

Tabla 1. Líneas celulares existentes de trofoblastos. Origen de las líneas celulares y su forma de inmortalización en los casos correspondientes.

Línea Celular	Origen
BeWo (ATCC® CCL-98™)	Coriocarcinoma humano
JAR (ATCC® HTB-144™)	Coriocarcinoma humano
JEG-3 (ATCC® HTB-36™)	Coriocarcinoma humano
Swan 71 (12)	Placenta humana – infección con hTERT
AC1M-32 (13)	Coriocarcinoma humano
TEV-1 (14)	Placenta humana – expresión de E6 y E7 de HPV
HTR8/ (15)	Placenta humana – expresión de SV40

La línea celular Swan 71 (Tabla 1) surgió con el fin de superar diversas limitaciones fundamentales en la investigación de los procesos en los que participan trofoblastos. Tales limitaciones incluyen la dificultad y los cuestionamientos éticos asociados a la obtención de muestras de pacientes para realizar cultivos primarios y la necesidad de cantidades celulares adecuadas para llevar a cabo experimentos.

1.3 Línea celular Swan 71

Swan 71 es una línea celular de trofoblastos del primer trimestre de embarazo inmortalizada mediante la infección con hTERT, gen codificante para la enzima telomerasa. Esta fue generada por el departamento de biología molecular, celular y de desarrollo de la Universidad de Yale, Estados Unidos (12).

Esta línea celular presenta determinadas características fenotípicas asociadas a los trofoblastos, dentro de las cuales se encuentran la expresión de citoqueratina 7, vimentina, HLA-G y Gonadotropina Coriónica humana (hCG). La expresión de vimentina está asociada con las propiedades invasivas de los trofoblastos extravelllosos. La línea celular en cuestión exhibe propiedades invasoras en matrigel, en las cuales la vimentina cumple un papel importante. Por otro lado, el rol de la molécula HLA-G consiste en la prevención de la respuesta inmune de las células *Natural Killer* maternas (12).

Es característica de trofoblastos la expresión de la hormona hCG, la cual es secretada en grandes cantidades por los sincitiotrofoblastos. Es necesaria para el mantenimiento del embarazo debido a que interactúa con el cuerpo lúteo, promoviendo de esta manera la secreción de progesterona para sostener el crecimiento del feto (16, 17). Dicha hormona está compuesta por dos subunidades unidas mediante enlaces disulfuro. La subunidad hCG β , con un peso molecular de 22,2kDa, confiere especificidad biológica e inmunológica mientras que la hCG α , con un peso molecular de 14,5kDa (16), es común a todas las hormonas glicoproteicas (18).

Aunque la hormona hCG es excretada a lo largo de todo el embarazo, las concentraciones de la misma en la orina aumentan exponencialmente en el primer trimestre de embarazo, para luego decrecer a menos de la mitad de la concentración pico (19). De esta forma, los *tests* comerciales de

embarazo pueden diagnosticar al mismo en etapas tempranas mediante la detección de esta hormona.

Otra característica fenotípica asociada a la línea celular Swan 71 es la expresión de metaloproteasas de matriz o MMP (del inglés, *Matrix Metalloproteinase*). Las MMP son una familia numerosa de proteasas que se subdivide en cinco grupos distintos de acuerdo a las diferencias estructurales que presentan: colagenasas, estromelisin, gelatinasas, matrilisinas y metaloproteasas de matriz tipo membrana; y tienen como función principal la remodelación de la matriz extracelular (MEC) (20, 21). Estas enzimas son expresadas por el trofoblasto durante el proceso de invasión, ya que degradan el colágeno tipo IV. El mismo es considerado un componente principal de la membrana, y por lo tanto, estas enzimas son fundamentales para invadir el útero materno (22). Para que las MMP lleven a cabo su función, deben ser activadas mediante la acción de otras MMP, otras proteasas, o mediante un cambio conformacional (20, 21). Son las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9 respectivamente) las más estudiadas en la clínica humana tanto en procesos fisiológicos como patológicos (20, 21, 23).

Tal como se mencionó previamente, los trofoblastos, particularmente los citotrofoblastos extravelosos, invaden el epitelio uterino materno a fin de formar la placenta y establecer las interacciones materno-fetales necesarias para el desarrollo normal del feto. Dada esta propiedad de los mismos, resulta de gran interés el estudio de diferentes factores en su estimulación, pues de haber algún factor que presente una clara estimulación del proceso de invasión se podría contribuir al aumento de la tasa de éxito de la Fertilización *In Vitro*, la cual actualmente es cercana al 30% (24).

Es por esto que la línea celular Swan 71 constituye una herramienta prometedora para el estudio de los procesos de invasión e implantación del cigoto ya que según lo reportado en bibliografía retiene las características de trofoblastos primarios (12).

De todas formas, teniendo en cuenta que la línea celular no está disponible para ser adquirida en un centro de referencia, resulta fundamental realizar una caracterización completa de la misma a fin de validar la información disponible en cuanto al comportamiento de dicha línea.

1.4 Caracterización de una línea celular

Caracterizar una línea celular es vital, no solamente para probar su funcionalidad, sino también para garantizar su autenticación, confirmar su origen y probar su correlación con el tejido original. A su vez, la caracterización permite determinar si la línea fue transformada e indica si la misma es propensa a variación fenotípica e inestabilidad genética (4).

A su vez, resulta esencial probar la autenticidad de una línea celular para descartar la posibilidad de que ésta haya sido contaminada con otra línea celular existente, o erróneamente identificada debido a una confusión en su manejo o un mal etiquetado. Mientras que la criopreservación de una línea celular extiende su vida útil y disponibilidad, al mantener más de una línea celular en un mismo laboratorio aumenta el riesgo de contaminación cruzada entre líneas celulares, por lo cual resulta fundamental la autenticación de la línea previo a su uso (4).

Siempre que se reciba a partir de una organización que no sea un centro de referencia o se establezca una nueva línea celular, es necesario realizar estudios de caracterización y validación. En caso de que la línea se adquiera de un organismo de referencia, resulta fundamental exigir que se presente la documentación pertinente que pruebe la validez de la línea e incluya estudios de caracterización (4).

Cada vez que se utilice una línea celular, ya sea como una herramienta de investigación o con fines comerciales, es de extrema importancia que ésta sea validada. En la industria, la validación es requerida legalmente por varios organismos de acuerdo al país en el que se lleve a cabo el desarrollo en cuestión. Al utilizar líneas celulares para la investigación, si bien la ley no solicita su validación, el uso de líneas celulares que no están validadas de manera apropiada reduce la confiabilidad y la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

La generación de un sistema de banco celular se realiza a su vez con el fin de asegurar un suministro de células para su uso durante los diferentes ensayos a llevar a cabo. Se implementa un sistema de banqueo que consiste en un MCB (del inglés, *Master Cell Bank*) y un WCB (del inglés, *Working Cell Bank*), lo cual presenta como ventaja la capacidad de una caracterización detallada de la línea celular y una disminución de la probabilidad de contaminación, tanto por agentes adventicios como por contaminación cruzada, aumentando a su vez la capacidad de detección de los contaminantes mencionados (25).

La creación de bancos celulares asegura que los resultados sean reproducibles y brinda continuidad tanto a la investigación como a los procesos de producción. Este proceso permite de alguna manera mantener al mínimo los cambios en componentes sub-celulares como ácidos nucleicos y proteínas, es decir, estabilizar genéticamente la línea celular con la que se trabaja. La exposición de la misma a temperaturas criogénicas permite, en términos prácticos, detener el tiempo reduciendo la chance de contaminación y la varianza genética.

No es suficiente con obtener una cantidad de células adecuadas para llevar a cabo un proceso de investigación o producción, es necesario asegurar que se trabaja con la línea celular adecuada y que mantiene determinada estabilidad a sucesivos pasajes. La FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) (25) establece que es necesario un riguroso análisis que demuestre que el patrón de crecimiento, apariencia morfológica y marcadores específicos se mantienen estables desde el MCB hasta la línea de uso. Adicionalmente, se debe probar que la misma está libre de contaminantes tales como virus, bacterias, micoplasma, o incluso otra línea celular. Estos análisis constituyen un proceso de caracterización y validación de la línea celular.

Según la bibliografía (4), se plantean varios requerimientos para cumplir con el objetivo de obtener una completa caracterización celular, y estos incluyen: confirmar la ausencia de contaminación cruzada (también llamado autenticación), confirmar especie y tejido de origen, determinación de transformación de la línea celular y vulnerabilidad a inestabilidad genética, entre otras.

Las metodologías existentes para realizar estos requerimientos son amplias e incluyen ensayos morfológicos, genéticos, citológicos, enzimáticos, proteicos e inmunológicos. Es mediante estos ensayos, aplicados por separado o en conjunto, que se puede identificar y caracterizar una línea

celular y sus marcadores únicos. Algunos ejemplos de estos marcadores son: aberraciones cromosómicas específicas, moléculas de MHC (del inglés, *Major Histocompatibility Complex*), huellas de ADN, deficiencias enzimáticas, entre otras.

1.4.1 Ensayos morfológicos

El análisis morfológico posee la ventaja de ser la técnica más simple y directa, ya que es fácilmente visualizable tanto en cultivo como en preparados fijados y teñidos. Sin embargo, esta metodología presenta la desventaja de no tomar en cuenta la variabilidad morfológica que puede presentar una línea celular bajo diferentes condiciones, densidades o medios de cultivo.

Diferentes características morfológicas tales como tamaño y forma celular y de sus organelos pueden ser analizados y medidos estadísticamente. Para analizar estas características comúnmente se utiliza un microscopio óptico, debido a que resulta fácil acceder al mismo y es simple de utilizar. Sin embargo, la microscopía electrónica permite una lectura de la superficie e interior de la célula mucho más profunda aportando datos relevantes a la morfología celular.

1.4.2 Ensayos citogenéticos

Se le llama citogenética al estudio del funcionamiento y estructura de los cromosomas celulares. Esta área posee diferentes alcances para el estudio del cromosoma que abarcan desde la determinación de la cantidad de cromosomas existentes en una línea celular hasta el estudio de cada cromosoma.

El cariotipo es la técnica más utilizada dentro de este campo de investigación para la identificación de especie y sexo dentro de una línea celular. Realizar esta técnica requiere de un cultivo celular arrestado en la etapa de metafase para obtener una visualización de los cromosomas condensados, a partir de esto se generan preparados que son procesados para su posterior análisis.

Este procesamiento puede involucrar una gran variedad de tinciones y bandeos cromosómicos, siendo la más usada es el bandedo G. Este consta en el uso de Tripsina para la digestión de las proteínas cromosómicas, dejando visible un patrón de bandas característico de la secuencia de ADN subyacente. Es a partir de este bandedo que se logran identificar los diferentes cromosomas con el fin de agruparlos (4).

Otro método frecuentemente usado para el estudio de cromosomas es el de FISH (del inglés, *Fluorescence in situ Hybridization*). Esta técnica consta del uso de sondas altamente específicas para especie y cromosoma las cuales poseen un elemento de fluorescencia y se hibridan a regiones altamente específicas y conservadas dentro de cada cromosoma. El resultado permite visualizar la presencia de los cromosomas mediante la fluorescencia de las sondas.

Estas técnicas, entre otras menos frecuentemente utilizadas, permiten no solamente la identificación entre especie y género sino que también la detección de aneuploidías y heteroploidías, las cuales ayudan a definir la inestabilidad genética de una línea celular (26).

1.4.3 Ensayos enzimáticos y proteicos

De acuerdo a su linaje, cada línea celular expresa diversas proteínas o enzimas diferentes, características de la misma, que dependiendo de su diversidad pueden ser utilizadas como marcadores proteicos específicos. No solamente expresan diferentes proteínas, sino que se reconocen diferentes alelos codificantes para una misma enzima que pueden ser identificados, por ejemplo, mediante su resolución electroforética. Este análisis es, además de sencillo, extremadamente confiable a la hora de diferenciar entre diferentes individuos de una misma especie. A nivel de expresión, las proteínas diferenciales pueden ser expresadas constitutivamente o de forma inducida, por lo que a la hora de la caracterización es necesario realizar controles de expresión y de inducción para asegurar que los resultados obtenidos son confiables (4, 27).

1.4.4 Ensayos inmunológicos

La caracterización inmunológica es sencilla de realizar siempre y cuando se cuente con el material adecuado, es decir, anticuerpos específicos. Los ensayos más comunes son ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e *immunostaining*. La técnica de ELISA se basa en la unión antígeno-anticuerpo para detectar presencia de antígenos en muestras mediante reacciones colorimétricas. Por otro lado, el *immunostaining* detecta antígenos en la superficie celular mediante anticuerpos conjugados directa o indirectamente a fluorocromos o enzimas con un producto visible. Estos ensayos son mayoritariamente utilizados con el fin de detectar antígenos específicos de superficie celular que permitan diferenciar la línea (4, 27).

A su vez, es posible la inmunodetección de hormonas o enzimas secretadas por la línea celular al medio de cultivo. Analizando el sobrenadante celular se puede, ya sea mediante *tests* comerciales o ensayos simples tales como *Western Blot*, utilizar anticuerpos específicos para la detección de marcadores que son característicos de cada línea celular y dependen de su linaje.

1.4.5 Análisis de contenido de ADN y ciclo celular

Los análisis de ADN son quizás la forma más directa de identificar una especie celular, e incluso posibilitan la distinción entre diferentes clones de una línea. Estos involucran enfoques tales como la detección de regiones altamente repetitivas características de cada individuo, la hibridación de sondas a secuencias únicas de ADN, la determinación de secuencias tándem de diferentes loci, la medida del contenido de ADN celular y el análisis del ciclo celular. Esto lleva a una buena caracterización, aunque estas técnicas son costosas y requieren de equipos especializados (4).

El ciclo celular es el mecanismo por el cual se reproducen las células eucariotas, este consiste en la duplicación del material genético y componentes celulares para una posterior separación y por ende duplicación de la célula. El ciclo está representado por cuatro fases llamadas: G_1 , S, G_2 y M. Durante la fase S se da la duplicación del material genético, y durante la fase M la división celular; G_1 y G_2 son dos etapas intermedias donde se da crecimiento celular, duplicación de organelos y simultáneamente funcionan como puntos de monitoreo del ciclo, pudiendo entrar en estados de reposo (G_0) si la situación no es favorable para la duplicación (28).

El estudio del ADN resulta un buen enfoque para la caracterización de la línea, pues posibilita la determinación de los parámetros del ciclo de división celular de la línea y las posibles ploidías que el mismo presenta. Esto se logra mediante la medición del contenido de ADN dentro de cada célula a lo largo de un período de tiempo determinado. Para esto se utiliza un citómetro de flujo, equipo que mide características específicas de las células, entre las cuales se encuentran la intensidad de la fluorescencia, tamaño y anomalías morfológicas (29, 30).

La medida del contenido de ADN a través de citometría de flujo es posible gracias a la habilidad del Ioduro de propidio de unirse de manera estequiométrica al ADN bajo condiciones apropiadas, pues el equipo evalúa el núcleo de las células teñidas de manera individual para analizar su contenido de ADN. Los resultados se obtienen en forma de histograma en el cual la fluorescencia emitida por cada núcleo celular es directamente proporcional a su contenido de ADN. A su vez, el ancho del pico obtenido permite determinar la homogeneidad de la población celular estudiada (31).

Este análisis resulta útil para determinar la presencia de células aneuploides en una población, así como para determinar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular y estimar la fracción de la población que se encuentra en crecimiento. Para la determinación de la ploidía se utiliza el índice de ADN, el cual expresa la diferencia del contenido de ADN entre la muestra y la fluorescencia del ADN utilizado como estándar (31).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Caracterizar un clon de la línea celular Swan 71 estableciendo sus características principales para asegurar resultados consistentes y confiables en posteriores investigaciones con dicha línea.

2.2 Objetivos específicos

- Generar bancos maestro y de trabajo de la línea celular Swan 71.
- Evaluar los parámetros de crecimiento de la línea en distintas condiciones de cultivo.
- Realizar un análisis morfológico.
- Analizar el contenido cromosómico.
- Evaluar la expresión proteica y enzimática de la línea celular.
- Analizar el ciclo celular mediante determinación del contenido de ADN.

3. METODOLOGÍA

3.1 Reactivos generales

El medio de cultivo DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) *High Glucose* con Piruvato de Sodio y L-Glutamina utilizado es de la empresa GE Healthcare, y el Suero Fetal Bovino (SFB) empleado para suplementarlo es de Capricorn Scientific.

La polilisina empleada, al igual que la Tripsina-EDTA (0,05% Tripsina, 0,02% EDTA en PBS) y la solución de Penicilina-Estreptomicina (10.000 unidades/mL de Penicilina y 10mg/mL de Estreptomicina) pertenecen a la empresa Sigma-Aldrich (US). También se obtuvieron de la misma compañía Metanol Anhidro y Formaldehído 37%, Azul de Tripán y Ioduro de Propidio.

Además, para el análisis morfológico se emplearon Glicerol y Glicina, ambos provenientes de la empresa Amresco, y el colorante Giemsa de la compañía Biopur.

Para la elaboración de diferentes buffers y soluciones empleadas en cultivo celular se utilizó KCl y KH_2PO_4 provenientes de Merck y Na_2HPO_4 y NaCl ambos de la compañía Carlo Erba. Se obtuvo de la misma compañía el TRIS.

Los reactivos Bromuro de Etidio y Colcemida utilizados para cariotipo, al igual que las soluciones de Tripsina (Tripsina 0,25%, NaH_2PO_4 , NaCl) y de tinción del bandeó G (Giemsa, NaH_2PO_4 , KH_2PO_4) fueron gentilmente donados por Horacio Cardoso del laboratorio Genodiagnosis.

Los centricones utilizados para la concentración de muestras pertenecen a Amicon, mientras que los *test* comerciales de embarazo fueron adquiridos de AccuMed.

3.2 Líneas celulares

La línea celular Swan 71 fue amablemente cedida por el departamento de biología molecular, celular y de desarrollo de la Universidad de Yale. Fue recibida una botella T25 (25cm² de superficie), a partir de la cual se creó un MCB compuesto por seis criotubos en pasaje 12 con una concentración de $1,25 \times 10^6$ células/mL.

La línea celular continua de fibroblastos murinos NIH3T3 donada por José Badano, del Laboratorio de biología molecular del Institut Pasteur de Montevideo fue utilizada para diversos controles durante la totalidad de este trabajo.

3.3 Procedimientos básicos

3.3.1 Tripsinización

Para el proceso de tripsinización se procedió a la remoción del medio de cultivo y posterior lavado con PBS 1x. Luego se agregó una solución de Tripsina-EDTA en una proporción de 20μL por cm² de la

superficie de cultivo, y se incubó a 37°C durante al menos 5 minutos. Pasado este tiempo se comprobó el estado de las células al microscopio, y una vez que se observó que se encontraban despegadas, rápidamente se neutralizó con medio completo (DMEM complementado con 10% de SFB).

3.3.2 Recuento celular

El recuento celular se realizó en Cámara de Neubauer mediante el método de exclusión con Azul de Tripán. El mismo permite distinguir entre células vivas (refringentes) y muertas (azules) ya que éstas últimas presentan su membrana comprometida e incorporan el colorante. Se realizaron diluciones de las muestras en Azul de Tripán 0,4% en PBS y se cargaron en la cámara aproximadamente 10µL de la suspensión para proceder a su recuento. Los valores obtenidos fueron utilizados para calcular la concentración de células empleando la siguiente ecuación:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de cél}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ de células vivas contadas} * 10.000 * \text{inversa de la dilución}}{\text{cantidad de cuadrantes contados}}$$

Por otro lado, el porcentaje de células viables se calculó de la siguiente forma:

$$\text{viabilidad (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ de células vivas}}{n^{\circ} \text{ de células totales}} * 100$$

3.3.3 Mantenimiento de los cultivos

Las células fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de solución *stock* de Penicilina-Estreptomicina; a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. En algunos casos específicamente los cultivos se complementaron con 5% de SFB. Se monitorearon diariamente los recipientes de cultivo en el microscopio invertido (Unico IV951T) utilizando los objetivos (L-Plan) 10x y 40x, observando cambios de color en el medio y porcentaje de confluencia. El medio se reemplazó en promedio cada 2-3 días una vez alcanzado un color naranja-amarillo. Por otro lado, se subcultivaron las células al notar un porcentaje de confluencia de 80% de acuerdo a los procedimientos descritos en 3.3.1 y 3.3.2. Se emplearon para este fin recipientes de cultivo de 25cm² y 75cm² dependiendo de los rendimientos celulares requeridos en cada caso.

3.3.4 Congelación y descongelación

Para la correcta congelación de las células se utilizó un medio de criopreservación compuesto por 10% Dimetilsulfóxido (DMSO) y 90% SFB. Los criotubos preparados fueron enfriados en un recipiente con Isopropanol capaz de generar una rampa de temperatura de 1°C/minuto durante 24 horas a -80°C; luego fueron traspasados a un tanque de nitrógeno líquido.

En todos los casos se congelaron células en fase de crecimiento exponencial a las que se había cambiado el medio 24 horas previo al congelado y con una viabilidad mayor al 95% al momento de

realizar el procedimiento. Las mismas fueron procesadas de acuerdo a lo establecido en los puntos 3.3.1 y 3.3.2. Luego se centrifugaron a 200g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el volumen adecuado de medio de criopreservación para obtener una concentración mayor a 1×10^6 células/mL.

Para el descongelado, se tomó un criotubo del tanque de nitrógeno líquido a pasaje deseado y se lo llevó a 37°C en baño de agua. Previamente se alicuotaron 9mL de medio en un tubo falcon y 5mL de medio en una botella T25, los cuales fueron atemperados a 37°C. Una vez descongelado el criotubo, las células fueron transferidas al tubo falcon cuidadosamente a fin de evitar un posible *shock* osmótico pero lo suficientemente rápido como para no comprometer la viabilidad de las mismas. Luego, se centrifugó a 200g durante 5 minutos y el *pellet* resultante fue resuspendido en la T25 atemperada.

3.4 Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento fueron realizadas tanto en placa de 24-*wells* como en botellas T25. En el caso de las placas de 24-*wells* se partió de concentraciones iniciales de 5×10^3 , 2×10^4 y 1×10^5 células/mL. Por otro lado, en botella T25 se emplearon concentraciones iniciales de 6×10^3 y $1,2 \times 10^4$ células/mL. Asimismo, se probaron diferentes concentraciones de SFB en el medio, en este caso se utilizaron 5% y 10%.

Para la siembra se partió de una botella T25 o T75 con células en fase de crecimiento exponencial y se llevó a cabo el proceso de tripsinización según la sección 3.3.1. Luego se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer de acuerdo a la sección 3.3.2. Se ajustó la concentración celular de acuerdo lo establecido en cada caso para botellas y placas y finalmente se sembró en el recipiente correspondiente, tomando una alícuota de la muestra como tiempo 0. La cosecha se realizó utilizando el protocolo de tripsinización descrito en el punto 3.3.1, todos los días a la misma hora y por el mismo usuario, de forma tal de minimizar errores. Las células obtenidas se contaron según el protocolo descrito en el punto 3.3.2 por duplicado para las muestras de la botella T25 y por triplicado para las muestras de la placa de 24-*wells*. En todos los casos los ensayos se hicieron por triplicado.

La concentración celular por cm^2 se graficó en función del tiempo utilizando el programa GraphPadPrism 5 para obtener curvas de crecimiento celular, a partir de las cuales se calculó el tiempo de duplicación de las células (T_D) y su velocidad máxima de crecimiento (μ), de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\mu = \ln\left(\frac{X_f}{X_o}\right) / t \quad T_D = \frac{\ln 2}{\mu}$$

X_o = número inicial de células

X_f = número final de células

3.5 Análisis Morfológico

3.5.1 Estudio de Morfología a diferentes densidades en microscopio invertido

Se partió de una concentración de 5×10^4 células/mL en botellas T25 y en placas de 6-wells, y se evaluaron las muestras a dos y tres tiempos de cultivo diferentes respectivamente con el fin de obtener distintas densidades celulares. Posteriormente se realizó un protocolo de tinción que consistió en una fijación con Metanol Anhidro, seguido por tinción con Giemsa y sucesivos lavados con agua destilada primero y luego del grifo hasta observar al enjuague incoloro. Se obtuvieron micrografías previas y posteriores a la tinción con un microscopio invertido (Unico IV951T) utilizando los objetivos (L-Plan) 10x y 40x para evaluar y registrar el crecimiento celular a diferentes densidades.

3.5.2 Estudio de Morfología a diferentes densidades en microscopio de contraste de fase

Se adaptó la técnica para poder emplear un microscopio no invertido de contraste de fase de mayor poder de resolución. Para esto, se colocaron 12 cubreobjetos redondos de 12mm de diámetro dentro de placas de 24-wells y se les agregó una solución de polilisina 0,05mg/mL. Se dejó secar durante 24 horas en una estufa 37°C. Durante el ensayo se probaron diferentes condiciones de siembra a fin de obtener los mejores resultados posibles, para esto, se sembraron sucesivamente tres placas. La primera con 1×10^4 , 5×10^3 y $2,5 \times 10^3$ células en 100µL de medio; 1×10^4 , 5×10^3 y $2,5 \times 10^3$ células en 75µL para la segunda y 4×10^4 , 2×10^4 , 1×10^4 y 5×10^3 células en 70µL para la tercera placa. Cada concentración se evaluó a dos tiempos diferentes (24 y 48 horas), con y sin tinción.

Para los cubreobjetos sin teñir, se realizó una fijación con solución formaldehído 4% en PBS durante 15 minutos, seguido por tres lavados con PBS-glicina 100mM. Por otro lado, para los cubreobjetos teñidos se empleó el protocolo descrito en la sección 3.5.1.

Los cubreobjetos fueron montados de manera invertida en un portaobjetos sobre una gota de solución de Glicerol 80% en PBS y sellados con esmalte. Estos preparados fueron observados con un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse e100) y se obtuvieron micrografías utilizando los objetivos (Nikon BE Plan) 10x, 40x y 100x empleando aceite de inmersión.

3.6 Cariotipo

El protocolo empleado fue adaptado a partir de un protocolo brindado por el Dr. Horacio Cardoso de la empresa Genodiagnosis, con el fin de utilizarlo con una línea celular creciendo en botella.

Se partió de células en fase de crecimiento exponencial en una botella T75. Se las arrestó mediante el agregado de 150µL de Colcemida y 21µL de Bromuro de Etidio para obtener una mejor lectura del bandeo cromosómico y se colocaron en estufa a 37°C con 5% CO₂ durante 2,5 horas. Pasado este período, las células fueron colectadas mediante una tripsinización (según sección 3.3.1) y centrifugadas a 200g durante 5 minutos, el *pellet* fue resuspendido en una solución hipotónica (KCl 0,075M) atemperada a 37°C.

La suspensión se fijó con tres gotas de Metanol:Ácido Acético en relación 3:1 a -20°C , y nuevamente se centrifugó a 200g durante 5 minutos. El *pellet* fue resuspendido en el mismo fijador, y a partir de este se realizaron los preparados. Para este fin se dejó caer una gota de la suspensión sobre un portaobjetos ensayando diferentes distancias hasta encontrar la óptima para una buena resolución cromosómica.

Finalmente se colocaron los preparados del cariotipo en una estufa a $97,5^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Los mismos fueron luego colocados en la solución de Tripsina 0,25%, NaH_2PO_4 y NaCl durante 8 segundos, luego de los cuales se realizaron dos lavados con Etanol 70%. La tinción se llevó a cabo con una solución de NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , y Giemsa durante 5 minutos, seguido de un lavado con agua destilada y secado a temperatura ambiente.

Los preparados fueron procesados con la ayuda del Dr. Horacio Cardoso, de la empresa Genodiagnosis. Los mismos fueron observados empleando un microscopio de contraste de fase (Olympus CX31) y se tomaron fotografías. Luego se convirtieron las imágenes a escala de grises y se pasaron a formato .fit. Posteriormente, se utilizó el programa SmartType versión 1.0.0, para obtener de esta manera el cariotipo ordenado según el tipo de cromosoma.

3.7 Determinación del contenido de ADN mediante citometría de flujo

A fin de realizar el análisis de ciclo celular y obtener una aproximación de la ploidía de la línea en estudio mediante citometría de flujo, se llevaron a cabo diferentes protocolos. Se sembraron placas de seis pocillos a una densidad de 4×10^5 células/mL cuando las células se hallaban en fase de crecimiento exponencial. Se realizó un primer intento de arresto con colcemida pero no se obtuvieron resultados concluyentes. Se empleó entonces otro protocolo en el que una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial, se reemplazó el medio de mantenimiento por medio sin SFB para iniciar un arresto celular en G_0 por privación de nutrientes. Luego de 24 horas, se realizó el cambio a medio completo para re-iniciar el ciclo celular en forma sincronizada y observar su progreso.

Las muestras fueron cosechadas a tiempo 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas; luego fueron fijadas por al menos 2 horas con 1 mL de etanol 70% a 4°C . Se utilizó la línea celular NIH3T3 como control. Una vez obtenidas todas las muestras se procedió a centrifugar para eliminar el Etanol y resuspender las mismas en PBS para su posterior coloración. Se incubaron luego con RNasa libre de DNasa a una concentración de $100\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 15 minutos a 37°C , con el objetivo de evitar la tinción del ARN con el colorante empleado. Como último paso, se realizó la tinción con IP a una concentración de $50\mu\text{g}/\text{mL}$ durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras fueron procesadas en un citómetro CyAn™ ADP Analyzer equipado con un láser de 488nm. Se colectaron en promedio 10.000 eventos en la región de interés (R1) por muestra, definida en el gráfico de FSC (del inglés *Forward- Scattered light*) vs. SCC (del inglés *Side-scattered light*) donde queda representada la complejidad interna vs. el tamaño celular. Se graficó también área de IP vs. ancho de pulso a fin de descartar los dobletes (excluyéndolos de la región R2), y finalmente se creó un histograma del área de IP teniendo en cuenta las regiones R1 y R2 mencionadas

previamente. A fin de aumentar la sensibilidad se programó el canal de IP en *trigger*. Las adquisiciones y parte del análisis posterior se realizaron empleando el programa Summit versión 4.3.

Para determinar el porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular se empleó el programa ModFit LT versión 4.1.7. Se realizaron las mismas gráficas que en el caso anterior y se aplicó el modelo *Marquardt nonlinear least-squares analysis* para el ajuste matemático que permite adaptar la distribución de las poblaciones G_0/G_1 y G_2/M a curvas gaussianas. Esto se realiza con el fin de calcular el porcentaje de células de dichas distribuciones en forma precisa.

Es importante destacar que la calidad de un histograma de ADN se estima a partir del ancho del pico de ADN de las células en G_1 . Esto se mide mediante el CV del pico y se calcula a partir de la desviación estándar (SD). Cuanto menor es el CV de los picos en el histograma de ADN, más precisa es la medición de la ploidía y mejor será la estimación del porcentaje de células en los diferentes compartimentos del ciclo celular. En general se considera que los resultados son pobres en cuanto a que no son precisos si el CV es mayor al 6% en las células que se encuentran en G_0/G_1 .

3.8 Detección de hCG en sobrenadante de cultivo

Se realizaron dos tipos de ensayos diferentes para la detección de la expresión de hCG de la línea celular Swan 71. En primera instancia se trabajó con una electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% para observar el perfil proteico de expresión de la línea celular, y en segunda instancia se realizó una inmunocromatografía (*test* comercial de detección de hCG). Esta técnica se basa en el movimiento por capilaridad de la muestra a ensayar. La misma se agrega en la almohadilla de muestra donde hay anticuerpo anti-hCG marcado con oro coloidal que se solubiliza y se une a la hCG presente en la muestra. El complejo hCG-anticuerpo se une a otro anticuerpo anti-hCG inmovilizado en la zona de reacción. Por otro lado, el anticuerpo anti-hCG no unido a hCG de la muestra, se une a hCG inmovilizado en la zona de control, validando el ensayo.

En cada ensayo se utilizó orina de primer trimestre de embarazo como control positivo y sobrenadante de cultivo celular de NIH3T3 como control negativo. Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de cultivos celulares a pasaje medio (pasajes 17-27) y condicionados por al menos 24 horas.

3.8.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizaron los ensayos de electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida. Para esto se utilizaron muestras de sobrenadantes con y sin SFB. En todos los casos se realizaron las corridas electroforéticas a 120V con amperaje libre con 40 μ L de muestra por pocillo excluyendo el caso del marcador de peso molecular, del cual se sembraron 8 μ L. El marcador de peso molecular utilizado fue el AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder.

3.8.1.1 Sobrenadante con SFB

A continuación se describe la obtención de las muestras sembradas. Se trataron las muestras de sobrenadante de NIH3T3 y Swan 71 mediante la centrifugación a 4000g durante 15 minutos con un

centricón de 30kDa. Del mismo modo se procesaron dos muestras de orina de donantes embarazadas empleadas como control. A su vez, el resultante de las muestras de NIH3T3 y Swan 71 fue nuevamente tratado mediante la centrifugación con un centricón de 100kDa, en este caso se conservó el eluido.

3.8.1.2 Sobrenadante sin SFB

Se trataron tres muestras de orina y las muestras de sobrenadante de NIH3T3, Swan 71 sin suero mediante la centrifugación a 4000g durante 15 minutos con un centricón de 30kDa, se conservó la porción concentrada. Del mismo modo se procesaron tres muestras de orina de donantes embarazadas empleadas como control.

3.8.1.3 Tinción

Se realizaron simultáneamente las tinciones con Plata y Azul de Coomassie siguiendo protocolos adaptados de Sambrook & Russell (32). Brevemente, para la tinción con Azul de Coomassie se sumergió el gel en dicha solución colorante durante aproximadamente una hora, y luego se decoloró con una solución de Metanol, Etanol, Ácido Acético y agua destilada. Por otro lado, para la tinción con Plata, se fijó el gel durante al menos 30 minutos en una solución de Etanol y Ácido Acético, y luego se incubó durante 15 minutos en la misma solución más diluida. Se realizaron sucesivos lavados con agua y se dejó un minuto en una solución de Tiosulfato de Sodio. Luego de una serie de lavados, se tiñó con una solución conteniendo Nitrato de Plata durante 20 minutos. Se procedió al revelado del gel por unos pocos minutos en la solución reveladora, y por último, se frenó la reacción con la solución de detención. Todas las fotos obtenidas a partir de los geles fueron capturadas con E-Gel® Imager de Life Technologies.

3.8.2 Inmunocromatografía

Se llevó a cabo el *test* de detección de hCG sobre cuatro muestras: orina de primer trimestre de embarazo, sobrenadante de NIH3T3, sobrenadante de Swan 71 sin tratar y sobrenadante de Swan 71 tratado como se describió en la sección 3.8.1.1.

3.9 Zimograma

Se llevó a cabo un zimograma con el fin de evaluar la expresión de las MMP-2 y MMP-9 en la línea celular Swan 71 a través de su actividad. Para esto, se utilizaron muestras de sobrenadante a pasaje 26 de dicha línea y muestras de sobrenadante NIH3T3 a pasaje 25 como control positivo de expresión. Las muestras fueron concentradas al igual que el ítem 3.8.1.1. Como control positivo de actividad enzimática, se utilizó colagenasa de Sigma-Aldrich (código C6885), donada gentilmente por Mariela Bollati del Institut Pasteur de Montevideo. Se emplearon dos concentraciones diferentes, 1mg/mL y 1ng/μL.

El protocolo utilizado, adaptado de Waas *et al.* (33), consistió en la corrida electroforética de un gel de poliacrilamida al 7,5% conteniendo 2mg/mL de gelatina como sustrato. Las muestras se cargaron con buffer de carga no reductor y no se hirvieron para mantener la actividad enzimática.

Los geles obtenidos fueron lavados 30 minutos a temperatura ambiente en Tritón X-100 2,5% (v/v), Tris-HCl 50mM, CaCl₂ 5mM y 0,1% Tritón X-100 (pH 7,8). Luego de los lavados, se los incubó toda la noche a 37°C en el mismo buffer con agitación y teñidos al día siguiente con Azul de Coomassie.

4. RESULTADOS OBTENIDOS

4.1 Curvas de crecimiento

Al trabajar con una línea celular es fundamental conocer sus características de crecimiento, es decir, parámetros tales como su velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación, densidad de saturación y rendimiento, entre otros. Esto permite el mantenimiento óptimo y el uso adecuado de la línea celular. En otras palabras, es necesario estudiar dichos parámetros a fin de definir los intervalos entre sucesivos subcultivos, cambios de medio, densidades de siembra adecuadas. Esto es debido a que tales parámetros varían entre las diferentes líneas y dependen de la velocidad de crecimiento y el metabolismo celular.

Al seleccionar el recipiente en el cual se llevará a cabo un cultivo, es necesario tener en cuenta factores tales como la masa celular requerida, la necesidad de ventilación, si el crecimiento se da en adherencia o en suspensión, la frecuencia de la toma de muestra y el tipo de análisis requerido (4). En el presente trabajo se realizaron curvas de crecimiento en dos recipientes distintos, botella y placa, para poder evaluar el crecimiento y rendimiento celular obtenido en cada caso, ya que a lo largo del mismo se emplearon ambos tipos de recipientes con diversos fines.

El método recomendado para determinar la densidad de siembra adecuada para los cultivos consiste en realizar curvas de crecimiento a diferentes densidades iniciales para determinar la concentración mínima que da lugar a una fase lag corta seguida de una fase de crecimiento exponencial notoria (4).

Se evaluaron varias condiciones de siembra inicial con el fin de determinar la siembra óptima para poder obtener datos que abarquen toda la curva de crecimiento celular (*data not shown*). Una vez determinado el valor de la siembra óptima, se repitió la curva de crecimiento para el mismo a fin de calcular los parámetros deseados y estudiar el comportamiento de la línea. A su vez, todos los recuentos se realizaron por duplicado o triplicado. Las curvas mostradas son representativas de cada condición en la cual se llevó a cabo el experimento.

Si bien en general se expresan los resultados en células/mL, se muestran las curvas de crecimiento en valores de densidad celular (células/cm² vs. tiempo), para posibilitar la comparación de aquellos resultados obtenidos a partir del experimento realizado en placa con los obtenidos al llevarlo a cabo en botella.

4.1.1 Curvas obtenidas de cultivos complementados con 10% SFB

Se analizó el crecimiento de la línea celular mediante una curva de crecimiento con una concentración inicial de 2×10^4 células/mL (1×10^4 células/cm²) utilizando 10% de SFB en placa de 24-wells (Figura 3). Esta concentración de SFB corresponde a las condiciones sugeridas de cultivo de la línea y por tanto fueron las condiciones utilizadas para su mantenimiento. A su vez, las caracterizaciones reportadas de la misma fueron hechas en las condiciones mencionadas.

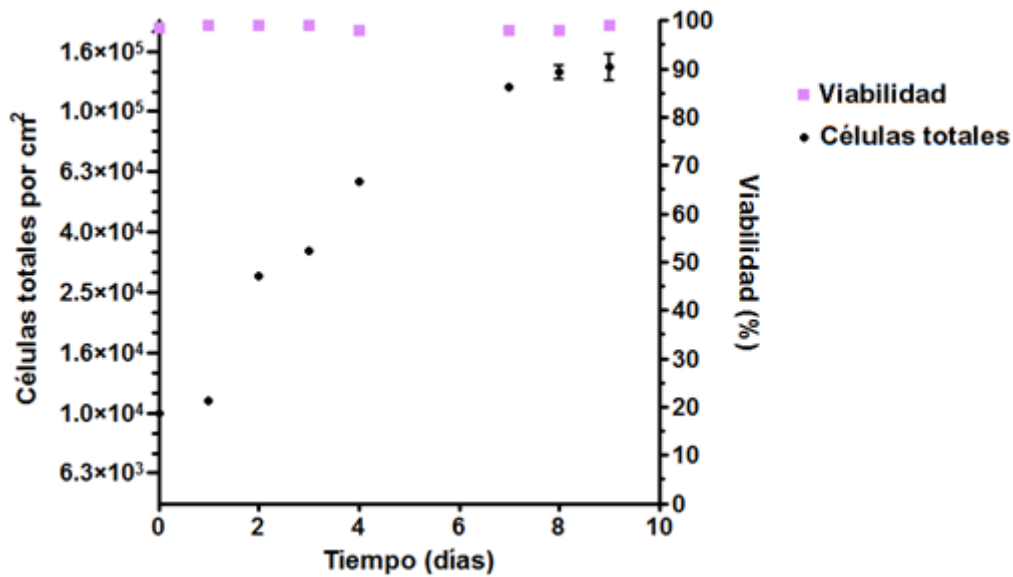


Figura 3. Evaluación del crecimiento en cultivo complementado con 10% SFB en placa de 24-wells. Gráfico del aumento del número celular en Células/cm² vs. Días, en el eje de la derecha se representa la viabilidad en porcentaje a lo largo del tiempo. Siembra inicial de 1X10⁴ células por cm². Obtenido a partir del programa GraphPad Prism 5.

La gráfica obtenida muestra una fase lag relativamente corta seguida de una fase exponencial pronunciada en la que se evidencia el aumento de aproximadamente un orden de magnitud (1x10⁴ a 1x10⁵) en el número de células en cinco días de cultivo.

Es posible que al alcanzar el último día del ensayo las células ya hubieran alcanzado el *plateau*, sin embargo, para poder afirmar esto hubiera sido necesaria la toma de otra muestra al día siguiente. A su vez, se observó un mantenimiento de la viabilidad celular a lo largo de experimento.

Las curvas realizadas en estas condiciones arrojaron resultados muy similares por lo que se calculó, en promedio, el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento, siendo los mismos 1,3 días y 0,53 días⁻¹ respectivamente.

Por otro lado, se analizó el crecimiento de la línea celular mediante una curva de crecimiento con una concentración inicial de 3x10⁴ células/botella (1,2x10³ células/cm²) utilizando 10% de SFB en botella T25 (Figura 4).

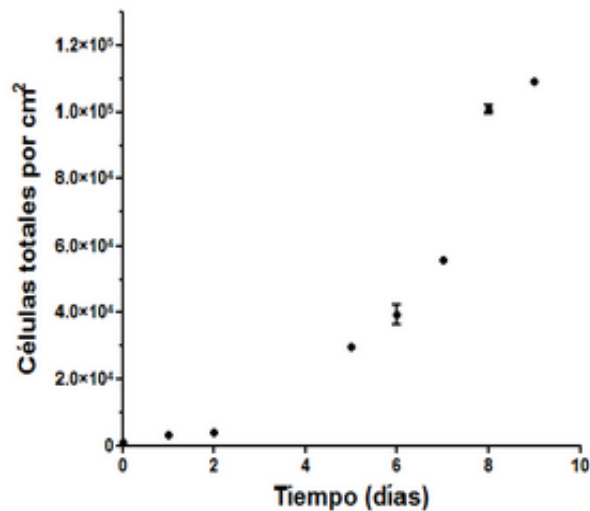


Figura 4. Evaluación del crecimiento en cultivo complementado con 10% SFB en botella T25. Gráfico de curva de crecimiento en Células/cm² vs. Días. Siembra inicial de $1,2 \times 10^3$ células por cm². Obtenido a partir del programa GraphPad Prism 5.

La figura 4 corresponde a una curva de crecimiento realizada en una botella T25 con una cantidad inicial de 3×10^4 células/botella ($1,2 \times 10^3$ células/cm²). Debido a un error de registro, no se cuenta con datos de viabilidad para esta curva. En la misma es posible observar una fase lag pronunciada con un crecimiento celular mínimo, lo cual puede deberse a la densidad celular baja al momento de la siembra. Luego, se observa una fase exponencial más tardía que la presentada en la curva realizada en placa. Parece haber un *plateau* comenzando el noveno día, pero sería necesario otro dato para confirmarlo.

Las curvas realizadas en estas condiciones arrojaron resultados muy similares por lo que se calculó, en promedio, el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento, siendo los mismos 1,7 días y 0,41 días⁻¹ respectivamente.

4.1.2 Curvas obtenidas de cultivos complementados con 5% SFB

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento utilizando 5% de SFB con el fin de evaluar el comportamiento celular frente a una reducción de la concentración de SFB en el medio de cultivo.

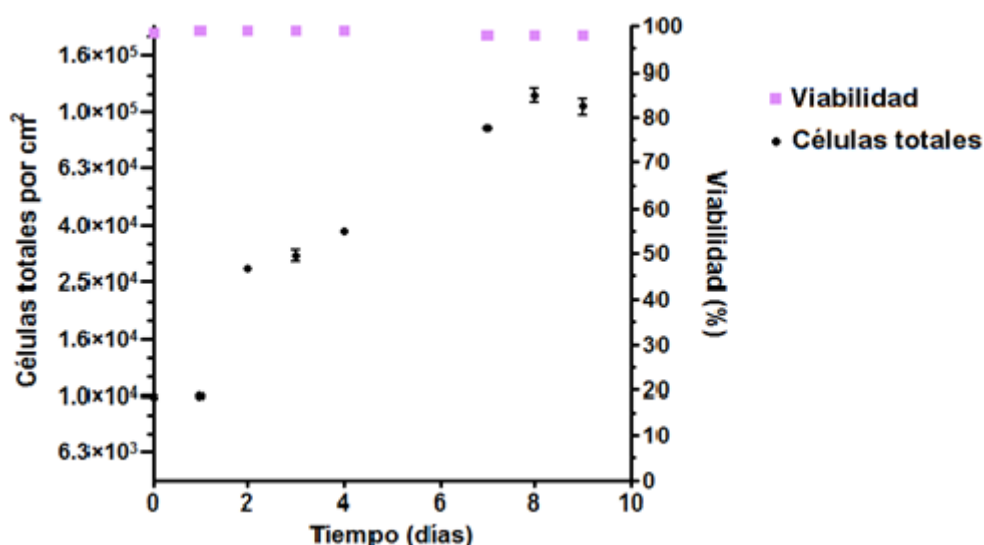


Figura 5. Evaluación del crecimiento en cultivo complementado con 5% de SFB en placa de 24-wells. Gráfico de curva de crecimiento en Células/cm² vs. Días. Siembra inicial de 1x10⁴ células por cm². Obtenido a partir del programa GraphPad Prism 5.

En la figura 5 se observa que las células logran adaptarse al crecimiento con 5% de suero luego de una fase lag comparable a la obtenida para la curva realizada con 10% SFB en el mismo tipo de recipiente, que se corresponde con una curva de crecimiento celular típica. A su vez, se observa una fase exponencial relativamente larga similar a la obtenida con 10% de SFB, así como el mantenimiento de la viabilidad celular a lo largo del experimento.

Las curvas realizadas en estas condiciones arrojaron resultados muy similares por lo que se calculó, en promedio, el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento, siendo los mismos 1,6 días y 0,44 días⁻¹ respectivamente.

En el séptimo día del experimento, luego de dos días sin tomar muestra ni cambiar el medio, el medio de cultivo de la curva con 10% SFB se notó considerablemente más acidificado que el de la curva con 5% SFB, lo cual indicaría un mayor crecimiento celular. La acidez del medio es un indicador del estado metabólico de las células, ya que el lactato producido a partir del consumo de glucosa es el responsable de la misma. Al consumir glucosa del medio, la célula la convierte en piruvato mediante la glucólisis y luego lo reduce a lactato mediante la enzima lactato deshidrogenasa.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos a partir de las curvas de crecimiento realizadas.

Tabla 2. Parámetros obtenidos a partir de las curvas de crecimiento. Comparación entre curvas de crecimiento realizadas en botella y placa a diferentes concentraciones de SFB.

Concentración de suero	Recipiente utilizado	Velocidad máxima de crecimiento	Tiempo de duplicación	Máxima densidad celular alcanzada (cél/cm ²)
5%	Placa 24-wells	0,44 días ⁻¹	1,6 días	105.000
10%	Placa 24-wells	0,53 días ⁻¹	1,3 días	140.000
10%	Botella T25	0,41 días ⁻¹	1,7 días	180.000

Se observó que el rendimiento óptimo se obtiene para la curva de crecimiento realizada en botella (Tabla 2). Por otro lado, la velocidad máxima de crecimiento obtenida en los tres casos es similar, lo que permite la elección del recipiente a utilizar en el cultivo de acuerdo a las necesidades del caso sin que se vea afectada la velocidad de crecimiento. Lo mismo ocurre con el caso del tiempo de duplicación.

De acuerdo a lo reportado en bibliografía las líneas celulares normales usualmente dejan de dividirse cuando alcanzan alta confluencia, a causa de a los cambios morfológicos que se dan debido a la limitación de espacio y la falta de factores de crecimiento. Sin embargo, las mismas se detienen en la fase G_1 de crecimiento y se deterioran muy poco, pudiendo permanecer así durante dos o tres semanas. Por otro lado las células transformadas y ciertas líneas embrionarias se deterioran con rapidez a altas densidades si no son subcultivadas (4). Esto se verificó en línea celular Swan 71. Al realizar las curvas de crecimiento, se notó que las células comienzan a morir una vez que alcanzan confluencia alta. Se observó durante el monitoreo que la morfología se altera, las células se deterioran, liberan componentes al medio, se despegan y mueren.

A su vez, se observó que las células pueden crecer adecuadamente en una concentración de SFB del 5%, es decir, con una concentración de SFB reducida, a diferencia de otras líneas celulares. El requerimiento de bajas concentraciones de SFB es una característica que poseen las líneas celulares transformadas (4).

El SFB promueve la proliferación y fijación celular mediante factores de crecimiento, de adhesión, y hormonas (4, 5). Dentro de los sueros existentes para suplementar un cultivo celular, el SFB es el más utilizado debido a que presenta bajas cantidades de inmunoglobulinas y altas concentraciones de factores de crecimiento. Sin embargo, la utilización de SFB presenta varias desventajas, tales como la gran variación lote a lote, lo cual se puede traducir en un problema respecto a la reproducibilidad de los distintos ensayos; la falta de conocimiento sobre ciertos componentes (nutrientes, proteínas, factores de crecimiento peptídicos, hormonas, minerales y lípidos), cuyas concentraciones y acciones no han sido totalmente determinadas, que pueden tener un efecto considerable sobre el crecimiento celular; la posibilidad de restricciones de la disponibilidad del suero, dadas por diversos factores como sequía en las zonas de cría de ganado, propagación de enfermedades entre el ganado, la dificultad de purificación de productos en presencia de suero, la facilidad de contaminación del suero con virus, que si bien pueden ser inofensivos para el cultivo celular, representan un factor desconocido adicional fuera del control del operador; y su costo, pues ciertamente el suero constituye la mayor parte del costo de una botella de medio (4).

En vista de las desventajas mencionadas y de que, según los resultados obtenidos, la línea celular Swan 71 puede crecer con concentraciones de SFB del 5% manteniendo un tiempo de duplicación apenas más alto que a concentraciones mayores (10%), y una densidad celular menor (Tabla 2), se recomienda a quien utilice esta línea realizar su mantenimiento con bajas cantidades de SFB.

Sin embargo, es importante destacar que debido a que las en reportes previos se utilizó medio completo con 10% SFB, se decidió realizar la caracterización de las células con ese porcentaje de SFB para poder comparar los resultados obtenidos con dichos reportes. A su vez, es posible asegurar un

crecimiento veloz que permite contar con las células necesarias al momento de comenzar con cada experimento planteado en los tiempos establecidos.

4.1.3 Observaciones empíricas durante el desarrollo del cultivo

Las células mostraron gran sensibilidad a los cambios de concentración de CO₂ en la atmósfera, particularmente una disminución del CO₂, causa la muerte rápida de los cultivos.

Por otro lado, tal como se mencionó previamente en la sección 4.1.2 se comprobó que las células son sensibles a la densidad del cultivo. Una vez alcanzado el 95-100% de confluencia, las células se desprenden masivamente del sustrato, el medio vira rápidamente al naranja-amarillo y el cultivo muere inmediatamente.

4.2 Análisis morfológico

4.2.1 Morfología general

El estudio de la morfología de una línea celular es fundamental, tanto para establecer y comprobar sus características típicas como para determinar situaciones anormales. Esto es debido a que las células se ven alteradas morfológicamente cuando sufren períodos de estrés tales como necesidad de cambio de medio o subcultivo, uso de medio inadecuado, contaminación bacteriana o incluso toxicidad proveniente de algún componente en el medio. De todas maneras, es importante destacar que la observación al microscopio de cultivos vivos es más importante y valiosa que la observación de cultivos teñidos ya que proporciona una impresión más real de la plasticidad del cultivo (4).

La línea celular Swan 71 muestra una morfología tipo-fibroblasto, es decir, una célula bipolar con una longitud mayor a su ancho. Las mismas poseen un núcleo céntrico con más de tres nucleolos y una membrana nuclear bien definida. Por otro lado, el citoplasma celular está pobremente definido y presenta variedad de tamaños, lo cual es coherente con lo reportado para trofoblastos primarios (34) (Figura 6). A su vez, en la figura 6.B es posible apreciar el citoplasma grisáceo característico de tinción con Giemsa así como el núcleo violeta y los nucleolos azulados.

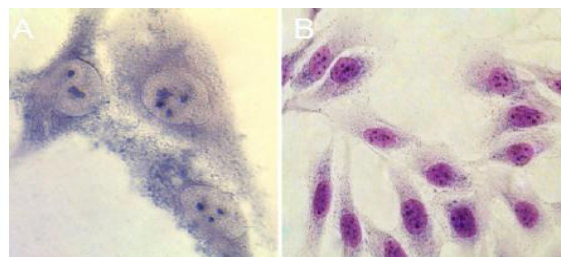


Figura 6. Células Swan 71 pasaje 22 con tinción de Giemsa. Imágenes obtenidas a partir de microscopio de contraste de fase. Imagen con objetivo 100x (A). Imagen con objetivo 40x (B).

Según lo reportado en bibliografía los citotrofoblastos extravellosos son células mononucleadas, lo cual se ha comprobado en esta línea celular. Sin embargo, estas retienen la habilidad de fusionarse espontáneamente generando complejos multinucleados llamados "sincitios" tal como se muestra en la figura 7.

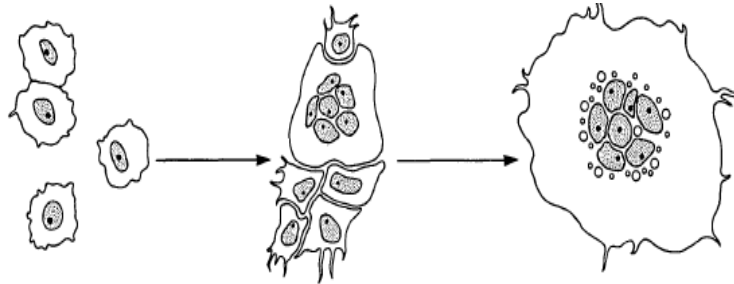


Figura 7. Esquema de formación de sincitios en células de citotrofoblasto humanas (34).

La característica mencionada es propia de los citotrofoblastos vellosos, ya que los mismos se diversifican a sincitiotrofoblastos, de todos modos esta característica se observa ocasionalmente en esta línea celular, como se muestra en la figura 8.

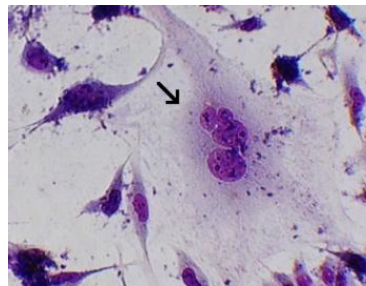


Figura 8. Sincitio celular de Swan71. La flecha indica la presencia de un sincitio celular. Micrografía en botella T25 teñida con Giemsa obtenida con microscopio invertido con objetivo 40x.

La figura 9 muestra la morfología de la línea celular en pasaje 10 reportada previamente (12). Al compararla con la foto obtenida a partir de células en pasaje 22 (Figura 6), se aprecia que la morfología celular se mantiene a pasajes sucesivos.

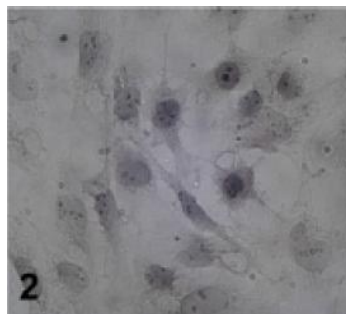


Figura 9. Células Swan 71. Tinción con Giemsa, objetivo 40x. Adaptado de Straszewski-Chavez *et al.* (12).

4.2.2 Estudio de morfología a diferentes densidades en microscopio invertido

La familiarización con la línea celular de trabajo y su morfología a diferentes densidades ayuda a identificar con más facilidad una contaminación cruzada o alteraciones inducidas por estrés. Los resultados obtenidos a continuación representan la morfología celular a diferentes densidades en una botella T25. Se aprecia cierta dificultad para lograr una diferenciación morfológica y de densidad de crecimiento en células sin tinción debido a la falta de contraste (Figura 10.A y 10.B). Por tal motivo se realizó la coloración con Giemsa descrita en la sección 3.5.1 que se muestra en las figuras

10.C y 10.D. Allí se observa más fácilmente un aumento de densidad celular entre los diferentes días de incubación, con el aumento de sincitios celulares.

Al aumentar la densidad celular en líneas finitas, se observa que la proliferación se detiene una vez alcanzada la confluencia. Si bien ciertas líneas celulares transformadas tienden a perder la inhibición por contacto y crecimiento una vez alcanzada la confluencia (4, 35), éste no es el caso de la línea celular Swan 71, ya que se observó que cuando alcanzan condiciones de alta confluencia, se lleva a un redondeo celular e incluso despegue de la monocapa.

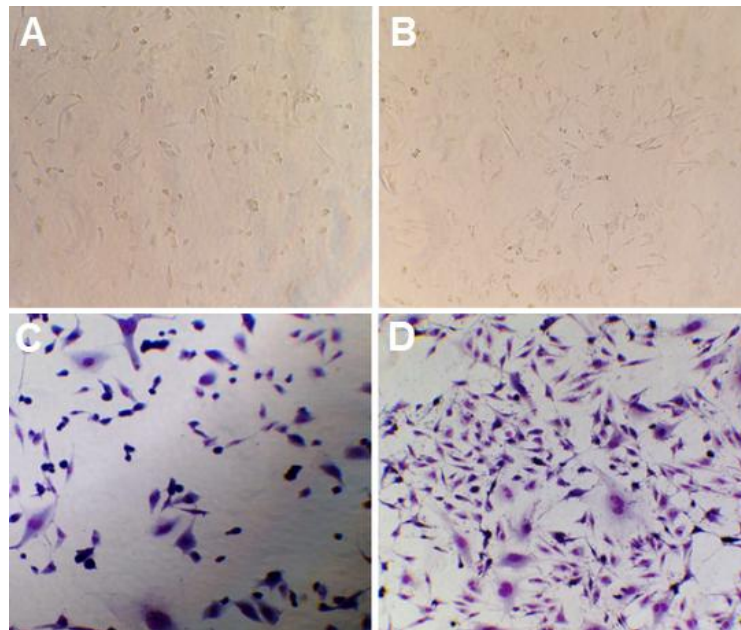


Figura 10. Morfología de la línea celular Swan 71 a diferentes densidades de cultivo. Imágenes obtenidas en microscopioinvertido a partir de botellas T25, objetivo 10x. Densidad baja sin tinción (A), densidad alta sin tinción (B), densidad baja con tinción (C), densidad alta con tinción (D).

El análisis morfológico a diferentes densidades en placa de 6-wells muestra resultados similares. Se presenta nuevamente la dificultad para discernir densidad celular en las muestras sin tinción (Figura 11.A, 11.B y 11.C), sin embargo, en las muestras teñidas (Figura 11.D, 11.E y 11.F) se observa que se alcanza una densidad de crecimiento aún mayor que en botella T25, transcurridos los mismos tiempos de cultivo. Esto se debe a la superficie disponible en cada cada recipiente, si bien la botella T25 posee mayor capacidad, se precisa de un mayor intervalo de tiempo para alcanzar confluencia.

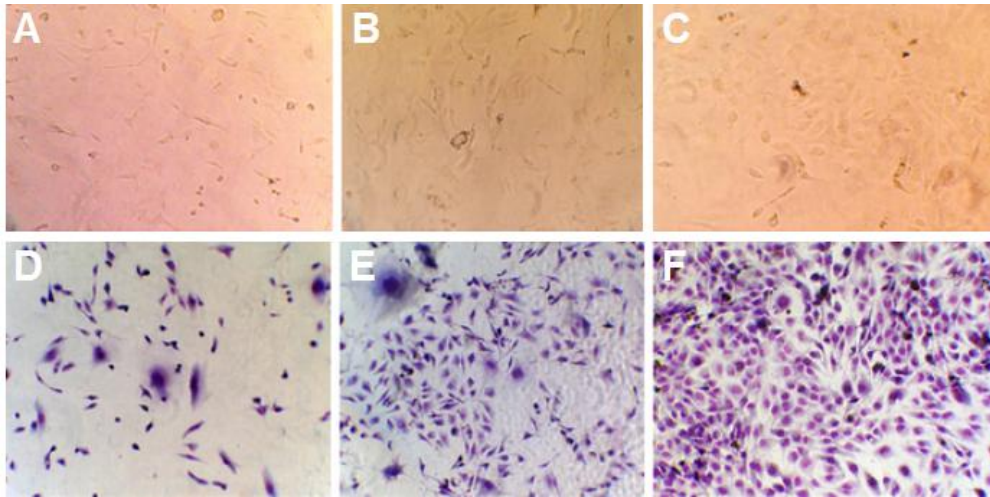


Figura 11. Morfología de la línea celular Swan 71 a diferentes densidades de cultivo. Imágenes obtenidas en microscopio invertido a partir de placas 6-wells, objetivo 10x. Densidad baja sin tinción (A), densidad media sin tinción (B), densidad alta sin tinción (C), densidad baja con tinción (D), densidad media con tinción (E), densidad alta con tinción (F).

4.2.3 Estudio de morfología a diferentes densidades en microscopio de contraste de fase

A partir de este ensayo se lograron obtener imágenes con mejor calidad y definición (Figura 12) de la morfología a diferentes densidades corroborando los resultados obtenidos en el ensayo previo en placa y botella.

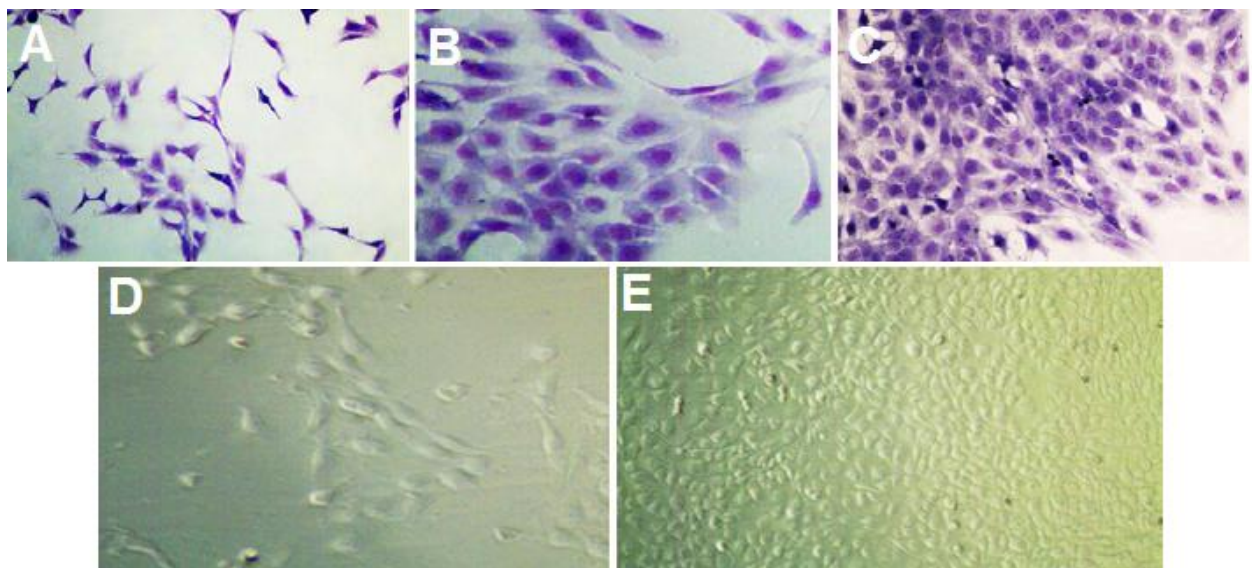


Figura 12. Morfología de la línea celular Swan 71 a diferentes densidades de cultivo. Imágenes obtenidas a partir de preparados de cubreobjetos polilisinados en microscopio de contraste de fase, objetivo 10x. Densidad baja con tinción (A), densidad media con tinción (B), densidad alta con tinción (C), densidad baja sin tinción (D), densidad alta sin tinción (E).

4.3 Análisis del contenido cromosómico

Como parte de la caracterización de la línea celular Swan 71, se llevó a cabo un análisis del contenido cromosómico mediante la realización de un cariotipo en el cual los cromosomas individuales se pueden identificar de acuerdo con el tamaño, la posición del centrómero y el patrón de bandas. Los

análisis citogenéticos permiten la identificación de cada cromosoma así como la determinación de las anomalías presentes (36).

En la figura 13 se muestra una imagen de los cromosomas metafásicos de una célula encontrada en uno de los preparados realizados para el análisis del cariotipo de la línea celular Swan 71.

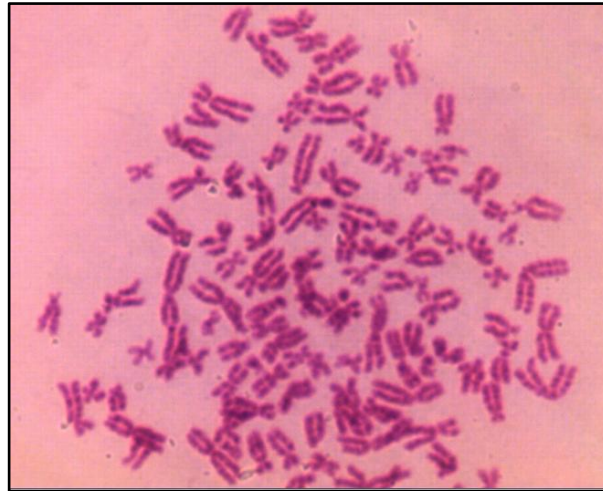


Figura 13. Cromosomas metafásicos de la Línea Celular Swan 71. Imagen obtenida de un cultivo a pasaje 27 con tinción de bandeado G tomada con el microscopio de contraste de fases Olympus CX31, objetivo 100x. Obtenida en el Laboratorio Genodiagnosis.

Se puede notar a simple vista que la línea celular Swan 71 presenta un cariotipo poliploide, lo cual es muy común en líneas transformadas, debido a la acumulación de anomalías en sucesivas divisiones.

Para un mejor análisis del cariotipo de la línea celular, se procesó la imagen con el programa SmartType versión 1.0.0, el cual facilita el ordenamiento de los cromosomas. A fin de emplear una cámara con resolución suficiente para obtener imágenes microscópicas con un bandeado cromosómico distinguible, se acudió a la empresa Genodiagnosis, en donde se llevó a cabo la clasificación cromosómica y el análisis del cariotipo bajo la supervisión del Dr. Horacio Cardoso, médico genetista. El resultado final se presenta en la figura 14 y en el gráfico de frecuencia de cromosomas (Figura 17).

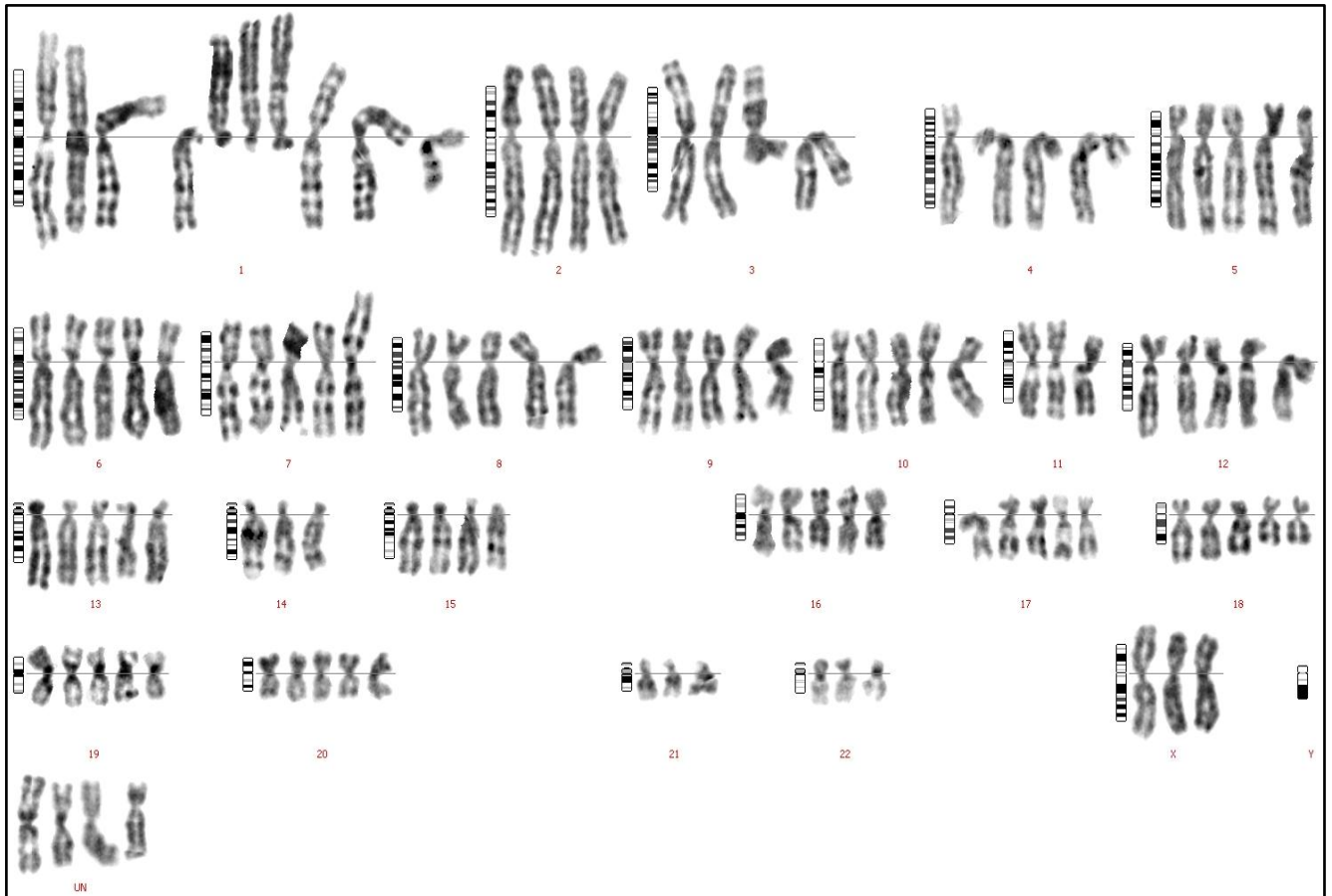


Figura 14. Cariotipo a pasaje 27 de la línea Celular Swan 71. Cromosomas metafásicos ordenados utilizando el programa SmartType según la clasificación estándar, numerados del 1 al 22 y con los cromosomas X e Y por separado. En la categoría UN se muestran aquellos cromosomas que no pudieron ser clasificados correctamente dentro de ninguno de éstos grupos. Por convención, el brazo corto (p) se coloca hacia arriba y el largo (q), hacia abajo (36).

En la figura 14 se observa un cariotipo mayoritariamente pentaploide; sin embargo, los grupos 11, 14, 21, 22 y X presentan tres copias de cada cromosoma y los grupos 2, 3, 4 y 15 presentan cuatro copias de cada cromosoma (en lugar de cinco). A su vez, se encontraron diez copias del cromosoma reconocido con el número 1, aunque muchos de éstos no tienen la estructura clásica de un cromosoma 1. Otros cuatro cromosomas no pudieron ser correctamente clasificados ya que el patrón de bandas no es el característico en ninguno de estos casos, por lo que los mismos se agruparon bajo la categoría UN (del inglés, *unknown*).

Las principales aberraciones cromosómicas se pueden notar en diversos cromosomas pertenecientes al grupo número 1. En cuatro de los mismos, hay una deleción de uno de los brazos (en tres de éstos el que falta es el brazo largo). Asimismo, también se presentan deleciones terminales en dos de los cromosomas pertenecientes a este grupo (Figura 14, octavo y noveno cromosoma empezando de la izquierda). Por último, un cromosoma de este grupo posee deleciones en ambos brazos (borde derecho).

Por otro lado, dentro del grupo número 7, el cromosoma que se encuentra sobre el borde derecho se corresponde con un isocromosoma, el cual está formado por dos copias del mismo brazo cromosómico. Éste es un cromosoma en el cual uno de sus brazos falta y el otro se encuentra “duplicado” respecto a su imagen especular (Figura 15) (26).

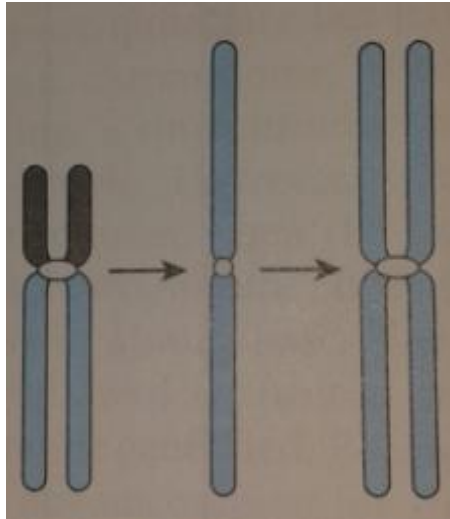


Figura 15. Representación de un isocromosoma. Adaptado de Nussbaum *et al.* (26).

A su vez, durante la observación de los preparados al microscopio, se notó la presencia de un cromosoma con apariencia de cromosoma dicéntrico (Figura 16). Es importante destacar que no es muy frecuente encontrar este tipo de aberración cromosómica. Un cromosoma dicéntrico es un cromosoma anómalo en el que dos segmentos cromosómicos, cada uno con un centrómero, se fusionan extremo con extremo y se pierden sus fragmentos acéntricos (26).



Figura 16. Cromosoma dicéntrico. Imagen obtenida con el microscopio de contraste de fases Olympus CX31, objetivo 100x.

Con el propósito de obtener una representación del contenido cromosómico que sea más fácilmente visualizable, se realizó un gráfico de barras donde se representa el número cromosómico (del 1 al 23 y UN) en función de su frecuencia (Figura 17).

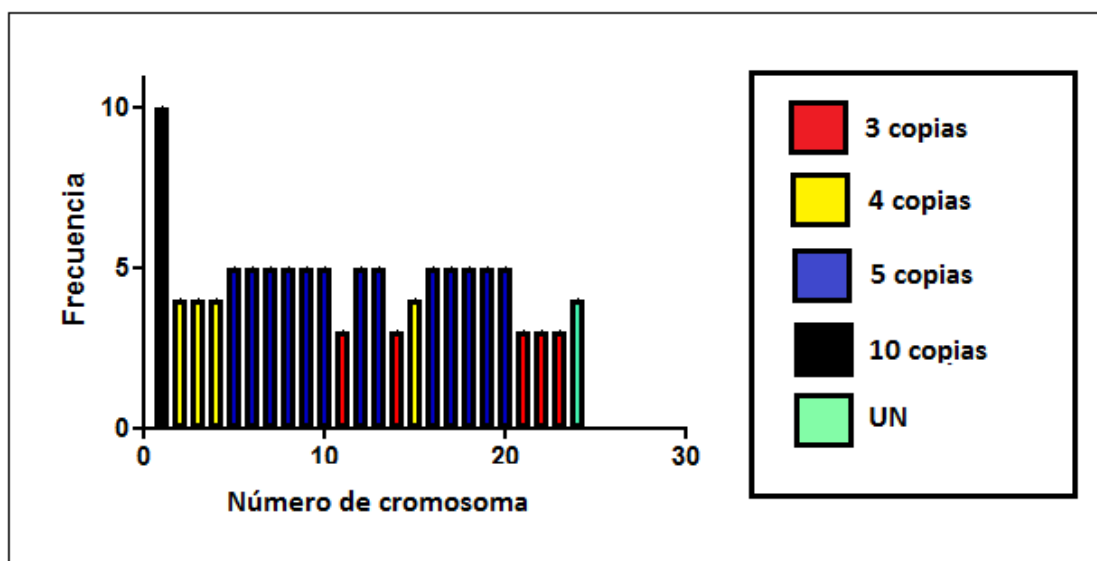


Figura 17. Frecuencias de cromosomas analizados. Gráfico de barras donde se representa el número de cromosoma (del 1 al 23 y UN) en función de su frecuencia realizado en el programa GraphPad Prism 5.

Para lograr una clasificación más precisa de dichos cromosomas, se podría llevar a cabo una técnica de citogenética basada en la hibridación *in situ* fluorescente conocida como FISH o alguno de sus derivados. Por ejemplo, mediante la utilización del FISH *multiplex* o M-FISH, se pueden visualizar todos los cromosomas homólogos pintados de un color distinto. Para ello, se utiliza un cóctel de 24 sondas de distinto color (generalmente el mismo se adquiere comercialmente) lo cual permite detectar y clasificar de manera rápida alteraciones numéricas. De esta manera, se podría distinguir a qué cromosoma corresponden cada uno de los que se encuentran agrupados bajo la categoría UN (37).

Existe un antecedente de un cariotipo realizado sobre esta misma línea celular en el que se trabajó con un cultivo a pasaje mayor que 30; el resultado muestra un cariotipo pentaploide con algunos cromosomas presentes en seis copias y once rearrreglos específicos (38).

Al comparar nuestros resultados con los publicados por Schellinger *et al.*, se puede notar una clara concordancia con los mismos a nivel general ya que en ambos casos el cariotipo es pentaploide. También en cuanto al número de cromosomas, debido a que en nuestro resultado el mismo es de 110 mientras que Schellinger *et al.* establecen que el número de cromosomas para Swan 71 se encuentra entre los 103 y los 119 cromosomas.

Las líneas celulares continuas, en particular las tumorales, presentan una gran inestabilidad a nivel genético que les permite generar las mutaciones necesarias para alterar o suprimir los genes implicados en la vigilancia del ADN, tales como p53. Éstas suelen ser aneuploides y con frecuencia tienen un número de cromosomas entre di y tetraploides. A su vez, en las mismas se ve una considerable variación en el número de cromosomas entre células de una misma población (heteroploidía) (4).

A pesar de que se ha reportado que la línea celular Swan 71 conserva las características de trofoblasto primario de primer trimestre, a medida que aumentan los pasajes del cultivo celular, se

favorece la presencia de aneuploidías. Por lo tanto, es merced utilizar dicha línea celular con cautela a la hora de estudiar la biología normal de los trofoblastos, considerando también la necesidad de controlar la posible inestabilidad genética en células inmortalizadas utilizando el gen de la telomerasa (38).

4.4 Análisis mediante citometría de flujo

Se llevó a cabo un análisis del contenido de ADN mediante citometría de flujo con el fin de conocer la distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo celular: G_0/G_1 , S y G_2/M y estudiar su progresión a través de las mismas. Para ello, se realizó un arresto mediante el cual las células se sincronizaron. En primera instancia, el arresto celular fue realizado mediante el tratamiento con Colcemida, dicho arresto no funcionó de acuerdo a lo esperado, por lo que se repitió el ensayo arrojando mediante deprivación de SFB por 24 horas. Tal como se mencionó en la sección 3.7, una vez finalizado éste período, se reinició el ciclo celular cambiando el medio sin SFB a medio completo y se cosecharon las muestras a tiempo 0, 4, 16, 24, 32, 40 y 48 horas.

En general, para este tipo de ensayos, se utilizan como control interno líneas celulares diploides no humanas, como los eritrocitos de pollo, con el fin de determinar la ploidía de una línea celular utilizando al control como punto de comparación (29). En este caso no se realizó tal procedimiento; sin embargo, se decidió utilizar a la línea celular NIH3T3 como control externo principalmente por dos motivos: a) ya que posee un contenido de ADN tetraploide (39), similar al de Swan 71 -definido en este trabajo al realizar el cariotipo- y por ende, si se trabaja en idénticas condiciones constituye un buen punto referencia, y b) debido a que el ciclo celular de dicha línea ya ha sido estudiado y se sabe que si la técnica se realiza correctamente se obtienen resultados aceptables con coeficiente de variación (CV) menor a tres que permiten validar el ensayo. En nuestro ensayo, para todas las muestras procesadas, el CV fue menor al 4%, cumpliendo con los criterios de aceptación de la técnica utilizada.

En la figura 18 se presentan los resultados obtenidos en el análisis del contenido de ADN de las líneas celulares NIH3T3 y Swan 71. En la figura 18.A y 18.D se observan gráficos biparamétricos *Dot Plot* de SSC vs. FSC para ambas líneas, en los cuales se crea la región R1 de forma tal de seleccionar la población de interés. Por otro lado, en la figura 18.B y 18.E, se representa un *Dot Plot* del ancho de pulso vs. el área de IP, donde se selecciona la región R2, excluyendo los dobletes celulares.

El descarte de dobletes es fundamental para el análisis de ciclo mediante citometría ya que de lo contrario se sobreestima el número relativo de células en fase G_2/M del ciclo celular. Los dobletes se forman cuando dos células con contenido de ADN correspondiente a la fase G_0/G_1 se registran como un único evento y por lo tanto presentan contenido de ADN similar a una célula en la fase G_2/M . Las células en G_2/M tienen el doble de ADN que las de G_1 pero el diámetro nuclear es sólo un 25% mayor, por lo que dan un pico más alto pero más estrecho, esta diferencia es la que se emplea para realizar el descarte (40, 41).

La figura 18.C y 18.F muestra un histograma de eventos vs. ancho de pulso, donde se representa únicamente las regiones R1 y R2 (Figura 18.A, 18.B, 18.D, 18.E) combinadas. En este gráfico se

pueden distinguir los picos correspondientes a las células que se encuentran en las fases G_0/G_1 , S y G_2/M del ciclo celular.

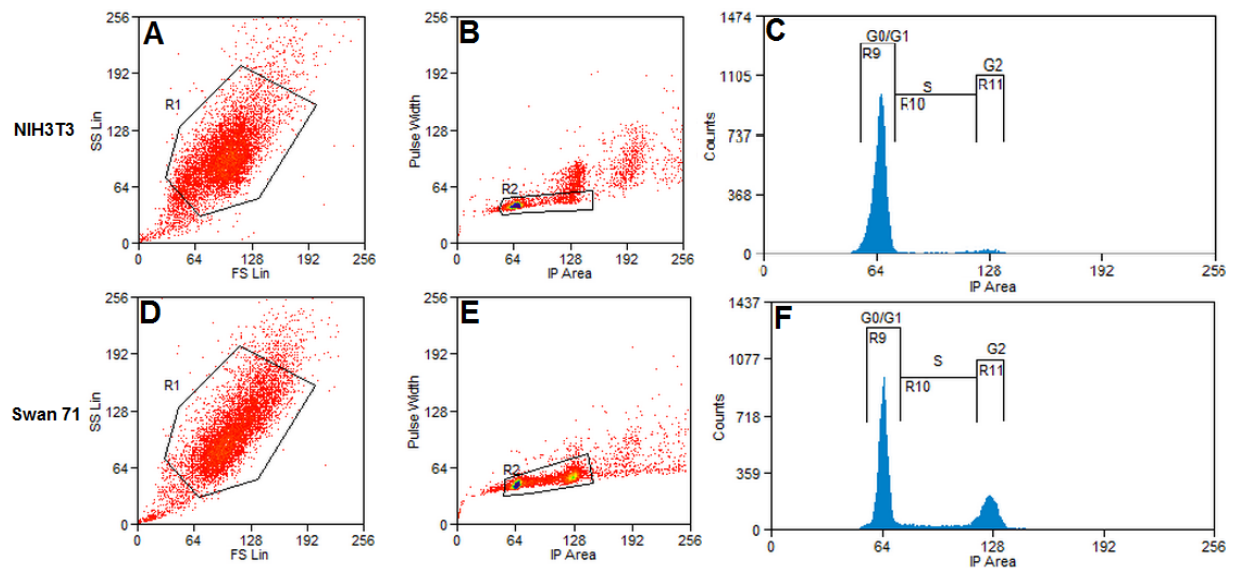


Figura 18. Comparación de análisis de contenido de ADN en NIH3T3 y Swan 71 a tiempo 0. Gráfico de puntos de SSC vs. FSC mostrando la región de interés R1 para NIH3T3 (A) y Swan 71 (D). Gráfico de ancho de pulso vs. IP área para descarte de dobletes donde se selecciona la región R2 que contiene las poblaciones G_0/G_1 ; S; G_2/M para NIH3T3 (B) y Swan 71 (E), e histograma de la región de interés (R1 y R2) para NIH3T3 (C) y Swan 71 (F).

En la figura 19 se presenta una superposición de los histogramas de eventos vs. ancho de pulso para NIH3T3 y Swan 71 a tiempo 0, donde es posible observar que bajo el mismo tratamiento ambas líneas celulares tienen un perfil similar, es decir, los picos G_0/G_1 coinciden. A su vez, el porcentaje de células de NIH3T3 en G_0/G_1 previo al arresto celular es del 61,67% y de 88,13% luego del arresto, a tiempo 0. En el caso de Swan 71 éste es de 43,14% previo al arresto y de 61,34% posterior al arresto, a tiempo 0 (Tabla 3). De esta forma se comprueba que el arresto celular funciona tanto para NIH3T3 como para Swan 71. Se destaca también, que si bien se logró el arresto de las células Swan 71, el porcentaje de células en la fase G_2 , sigue siendo considerablemente alto (Tabla 3, Figura 18.F).

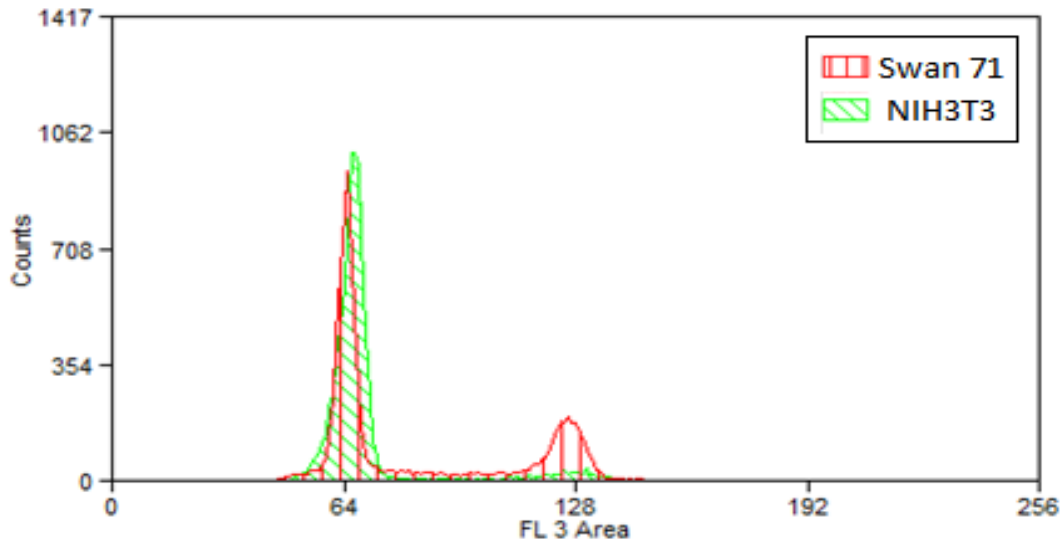


Figura 19. Comparación de análisis de contenido de ADN en NIH3T3 y Swan 71 a tiempo 0. Esquema de superposición de histogramas de las dos líneas celulares.

A fin de comparar los porcentajes de las poblaciones en la línea empleada como control (NIH3T3) vs. Swan 71, se construyó la tabla 3 donde se establecen los porcentajes de células en cada fase del ciclo.

Tabla 3. Porcentajes de células NIH3T3 y Swan 71 en cada etapa del ciclo celular. Resultados obtenidos a partir del procesamiento de datos arrojados por el citómetro de flujo con el programa ModFit versión 4.1.7.

	Porcentaje G ₀ /G ₁	Porcentaje S	Porcentaje G ₂ /M	CV
NIH3T3 sin arrestar	61,67%	28,36%	9,97%	3,91%
NIH3T3 t=0 post arresto	88,13%	8,89%	2,98%	3,79%
Swan 71 sin arrestar	43,14%	43,81%	13,05%	3,97%
Swan 71 t=0 post arresto	61,34%	13,29%	25,37%	3,64%

Esta reportado que una población celular eucariota promedio tiene un porcentaje de sus células cercano al 60% en la fase G₀/G₁ en condiciones normales (42, 43), lo cual es observado para las células NIH3T3 (tabla 3); sin embargo, no se observa esto mismo en las células Swan 71 (Tabla 3) donde el porcentaje de células en G₀/G₁ es menor.

La figura 20 muestra el análisis mediante citometría de flujo de aproximadamente 10.000 eventos de la línea celular Swan 71 sin arrestar obtenida a partir del software Summit v4.3. La figura 20.A corresponde con la representación gráfica del SSC vs. FSC. En la figura 20.C es posible observar que el pico correspondiente a las células en la etapa de G₀/G₁ es ancho y no muestra la distribución normal esperada, lo cual podría apuntar a la presencia de células aneuploides. Sin embargo, en la figura 18.F previamente descrita, en la que se representa al mismo histograma luego del arresto celular, la anomalía mencionada se ve corregida, por lo que se plantea la posibilidad de que esto sea debido al lento pasaje por la fase S del ciclo celular de esta línea.

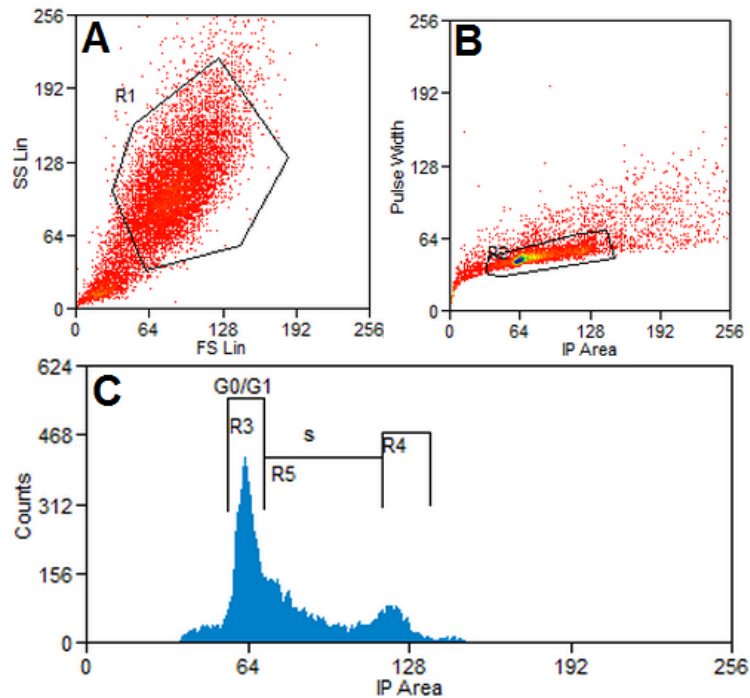


Figura 20. Análisis de ciclo de las células Swan 71 sin arrestar. Gráfico de SSC vs. FSC (A) y Ancho de pulso (*Pulse Width*) vs. área de IP (B), Eventos vs. área de IP.

Posteriormente, se realizó un estudio detallado de la progresión de la población a través del ciclo celular para lo que se tomaron muestras a distintos tiempos luego de la sincronización del mismo. En este caso, el análisis de los resultados se llevó a cabo empleando el programa ModFit LT 4.1.7 en el cual además de obtenerse los porcentajes en cada etapa del ciclo, se puede visualizar el porcentaje de CV así como la cantidad de eventos analizados, entre otros datos estadísticos. En la figura 21, se visualiza una representación de un histograma de eventos vs. área de IP correspondiente a una muestra obtenida a tiempo cero y procesada con el programa ModFit LT 4.1.7. La misma se representa a manera de ejemplificar la forma en la que se analizaron las diferentes muestras, para obtener así los porcentajes correspondientes de las distintas fases del ciclo. En ésta, se puede observar la distribución de la población celular de trabajo en las distintas fases del ciclo celular y los picos correspondientes a cada una de ellas.

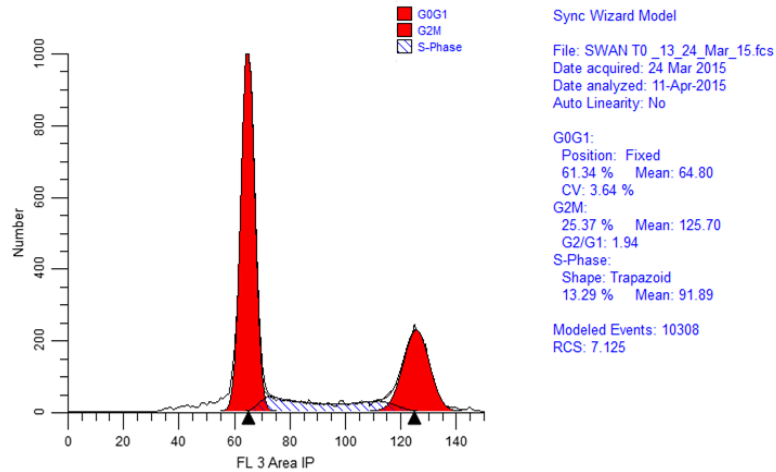


Figura 21. Histograma representativo del análisis realizado con ModFit versión 4.1.7. Se observa número de eventos vs. área IP para la línea celular a tiempo 0.

La tabla 4 muestra los diferentes porcentajes de distribución obtenidos como se mencionó previamente.

Tabla 4. Porcentajes de células en cada etapa del ciclo celular de la línea celular Swan 71 a diferentes tiempos del arresto celular.

t (horas)	Porcentaje G ₀ /G ₁	Porcentaje S	Porcentaje G ₂ /M	CV
0	61,34%	13,29%	25,37%	3,64%
4	35,42%	44,59%	19,99%	3,64%
16	36,15%	43,51%	20,34%	3,71%
24	31,85%	45,72%	22,43%	3,94%
32	37,35%	47,02%	15,63%	3,94%
40	61,66%	26,19%	12,15%	3,64%
48	53,02%	36,36%	10,62%	3,70%

Se sabe que en una célula eucariota promedio, la fase S del ciclo celular dura entre 10-12 horas, con una duración similar para la fase G₀/G₁, y alrededor de 1 hora para G₂/M (28); sin embargo, tal como se ve en la tabla 4, la fase S parece tener una duración superior a 10-12 horas, ya que una vez llevado a cabo el desarresto celular, las células avanzan hacia la fase S donde se mantienen hasta las 32 horas, notándose una disminución del porcentaje celular en dicha fase entre las 32 y 40 horas junto con un aumento de las células en fase G₀/G₁, indicando el inicio de un nuevo ciclo. Esto es consistente con los resultados obtenidos a partir de las curvas de crecimiento, en las que se obtuvo un tiempo de duplicación de entre 1,3 y 1,7 días, es decir entre 31,2 y 40,8 horas.

En resumen, las células Swan 71 presentan un ciclo lento, que involucra una fase S larga que alcanza una duración de al menos 24 horas. Las células de esta línea pasan la mayor parte del ciclo en la fase S, atravesando posteriormente una fase G₂/M corta antes de retornar a G₀/G₁.

Ya que la línea celular en cuestión posee un largo tiempo de duplicación, la fase S dura al menos 24 horas, por lo cual es posible que la privación de SFB durante 24 horas no sea suficiente para lograr un buen arresto. Se podría considerar realizar el ensayo con un arresto más prolongado siempre y cuando se tenga cuidado de que las células no mueran por causa de la privación.

El mismo caso se observó para la Colcemida, donde se resolvió que los tiempos de exposición a la misma tampoco fueron óptimos para alcanzar un completo arresto celular (*data not shown*), motivo por el cual se plantea una optimización de los tiempos de exposición con la misma.

4.5 Detección de hCG en sobrenadante de cultivo

4.5.1 Electroforesis SDS-PAGE

Para el estudio de hCG en el sobrenadante de Swan 71, se realizó una electroforesis SDS-PAGE con las diferentes muestras. Tal como se describe en la sección 3.8.1, los geles se realizaron por duplicado con el fin de evaluar los resultados con dos métodos de tinción diferentes y se mantuvo el siguiente orden de siembra: Marcador de peso molecular en los carriles 1 y 5, controles positivos de orina de donantes embarazadas en el primer trimestre tratados con un centricon de 30kDa en los carriles 2 y 3, sobrenadantes de las líneas celulares Swan 71 y NIH3T3 tratados con centricones de 30kDa y 100kDa y sobrenadantes de las líneas celulares Swan 71 y NIH3T3 sin tratar.

En los dos geles resultantes (Figuras 22 y 23), se observa en los controles positivos dos bandas fuertes, una cercana a los 90kDa y otra cercana a los 65kDa. La primera corresponde con lo esperado para la proteína de Tamm-Horsfall o Uromodulina, la cual se encuentra presente en la orina de mujeres embarazadas y tiene un peso aproximado de 85-90kDa (44-48). La segunda banda concuerda con lo reportado para la Albúmina, que posee un peso molecular de 68kDa. Se sabe que al menos 10mg de esta proteína son excretadas en la orina (49).

Se observa a su vez en uno de los controles positivos, una ligera banda alrededor de los 35kDa, correspondiente a la subunidad β de la hormona hCG. Bajo las condiciones desnaturizantes en las que se llevó a cabo esta electroforesis, la hormona hCG se divide en sus dos subunidades α y β . Debido a que un tercio de la hormona hCG está compuesto por carbohidratos, su movimiento electroforético se ve retrasado (17, 18, 50). Es por esto que la banda perteneciente a hCG β , subunidad que posee un peso molecular de 22,2kDa, podría encontrarse a la altura de 35kDa en una electroforesis SDS-PAGE (18, 51).

En los carriles pertenecientes a los sobrenadantes de NIH3T3 y Swan 71 tratados se observa un perfil de bandas intensas posiblemente provenientes del SFB presente en el sobrenadante del medio. Es por esto que se plantea la realización de un nuevo SDS-PAGE 12% llevado a cabo con sobrenadantes de medio de cultivo sin SFB para obtener una mejor lectura del perfil proteico de estas líneas celulares.

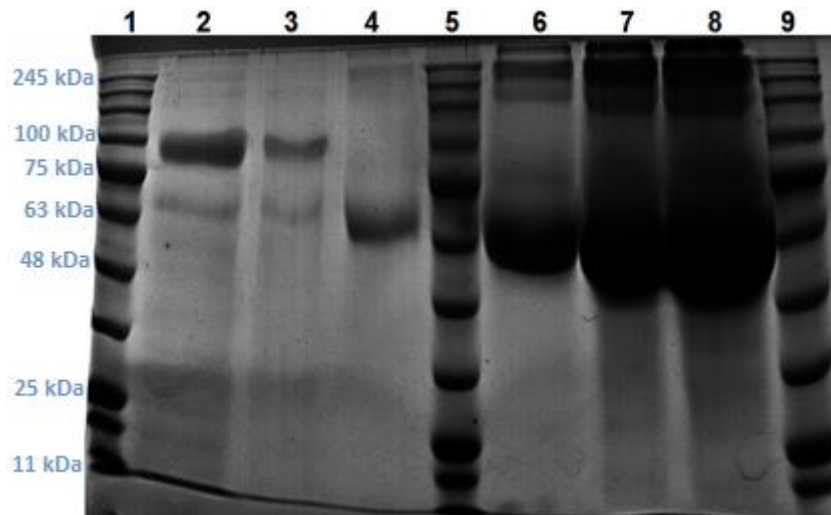


Figura 22. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 12% con tinción de Coomassie. Izquierda: Marcador de Peso Molecular AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder. Derecha: Carril 1 - Marcador de peso molecular. Carriles 2 y 3 - Muestras de orina de primer trimestre de embarazo tratada (control positivo). Carril 4 - Sobrenadante de la línea celular Swan 71 tratado. Carril 5 - Marcador de peso molecular. Carril 6 - Sobrenadante de la línea celular NIH3T3 tratado. Carril 7 - Sobrenadante de la línea celular Swan 71 sin tratar. Carril 8 - Sobrenadante de la línea celular NIH3T3 sin tratar. Carril 9 - Marcador de peso molecular.

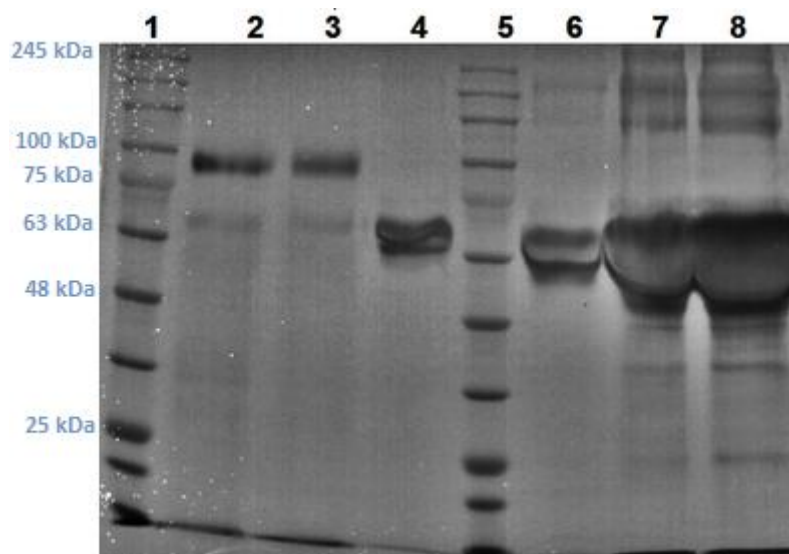


Figura 23. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 12% con tinción de Plata. Izquierda: Marcador de Peso Molecular AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder. Derecha: Carril 1 - Marcador de peso molecular. Carriles 2 y 3 - Muestras concentradas de orina de mujeres embarazadas en su primer trimestre (control positivo). Carril 4 - Sobrenadante de la línea celular Swan 71 tratado. Carril 5 - Marcador de peso molecular. Carril 6 - Sobrenadante de la línea celular NIH3T3 tratado. Carril 7 - Sobrenadante de la línea celular Swan 71 sin concentrar. Carril 8 - Sobrenadante de la línea celular NIH3T3 sin concentrar.

Se realizaron dos gels a partir de muestras de sobrenadante sin SFB, y ambos fueron procesados con tinciones diferentes. A continuación se presenta el gel con tinción de Azul de Coomassie (Figura 24), dado que el gel con tinción de Plata no presentó un buen bandeo. Se puede observar que en los carriles 1-3, los controles positivos de orina no muestran la banda a aproximadamente 35kDa anteriormente visualizada correspondiente a hCG β . A pesar de esto, se decide presentar los resultados a fin de mostrar el perfil proteico de la línea en estudio. Para esto, se observa en los

carriles 5-8 que aún sin presentar SFB, se aprecia un perfil proteico similar en los sobrenadantes de NIH3T3 y Swan 71, posiblemente debido a que ambas líneas celulares tienen orígenes embrionarios.

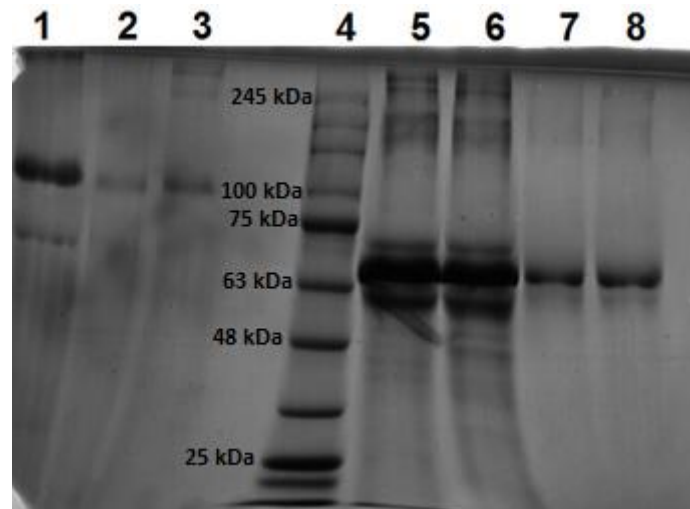


Figura 24. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 12% con tinción de Coomassie. Izquierda: Marcador de Peso Molecular AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder. Derecha: Carriles 1-3 - Muestras concentradas de orina de mujeres embarazadas en el primer trimestre (control positivo). Carril 4 - Marcador de peso molecular. Carril 5 - Sobrenadante de la línea celular Swan 71 sin suero, sin tratar. Carril 6- Sobrenadante de la línea celular NIH3T3 sin suero, sin tratar. Carril 7 - Sobrenadante de la línea celular Swan 71 sin suero, tratado. Carril 8 - Sobrenadante de la línea celular NIH3T3 sin suero, tratado.

4.5.2 Inmunocromatografía

Debido a que el trofoblasto es la principal fuente de hCG detectada tanto en suero como en la orina materna durante el embarazo, y considerando que se ha reportado que la línea celular Swan 71 es secretora de dicha hormona, se determinó realizar un *test* de detección de hCG comercial utilizando el sobrenadante de la línea celular. Esta aproximación para evaluar la secreción de hCG en el sobrenadante de cultivo tiene un límite de resolución diferente al proporcionado por el SDS-PAGE, ya que se basa en la detección de la hormona mediante un anticuerpo específico.

En la figura 25 se muestran los resultados obtenidos a partir del *test* comercial de detección de hCG. En la figura 25.C se observa que en el sobrenadante de Swan 71 a pasaje 17 no se detecta presencia de la hormona mediante este ensayo. A partir de esto se decide tratar la muestra, sin embargo, el resultado fue nuevamente negativo (Figura 25.D). Por otro lado, el control positivo de donante embarazada (Figura 25.A) y el control negativo de sobrenadante de cultivo de la línea celular NIH3T3 (Figura 25.B) resultaron de acuerdo a lo esperado, lo cual valida el ensayo.

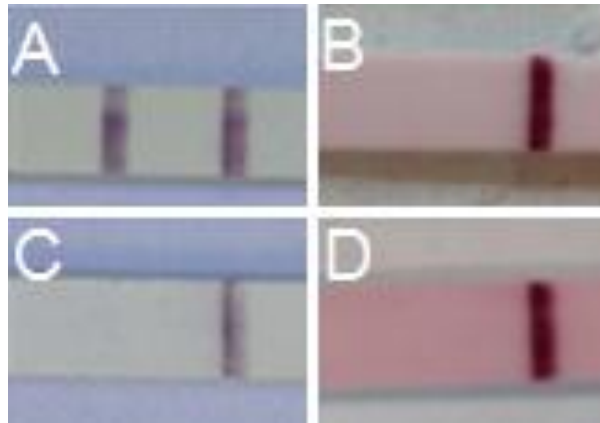


Figura 25. Test de detección de hCG. Control positivo: orina (A), Control negativo: sobrenadante de NIH3T3 (B), Sobrenadante de Swan 71 a pasaje 17 (C), Sobrenadante de Swan 71 a pasaje 21 tratado tres veces (D).

Para la línea celular Swan 71, está reportado que el sobrenadante de un cultivo de 5×10^6 células condicionado durante 48 horas, secreta hCG en una concentración de $3,70 \pm 0,14 \text{ mUI/mL}$, medido mediante un ensayo inmunométrico automatizado (12).

En este caso, se trabajó con sobrenadante de cultivo condicionado, pero es posible que dichos niveles de expresión sean muy bajos para ser detectados mediante el *test* de detección de hCG comercial utilizado (25 mUI/mL), incluso concentrando la proteína tres veces.

4.6 Detección de metaloproteasas

El zimograma se llevó a cabo con el fin de detectar la actividad de las metaloproteasas expresadas por la línea celular Swan 71, MMP-2 y MMP-9. Los citotrofoblastos, al igual que los fibroblastos, secretan metaloproteasas con el fin de remodelar la matriz extracelular (52). Es por este motivo que se utiliza sobrenadante de la línea celular NIH3T3, proveniente de fibroblastos embrionarios murinos, como control positivo de la expresión de metaloproteasas en sobrenadante de cultivo.

En la figura 26 se observa el resultado del zimograma, en el cual fueron sembrados los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares NIH3T3 y Swan 71 junto con un control positivo de colagenasa comercial. El ensayo reveló actividad enzimática en todos los sobrenadantes.

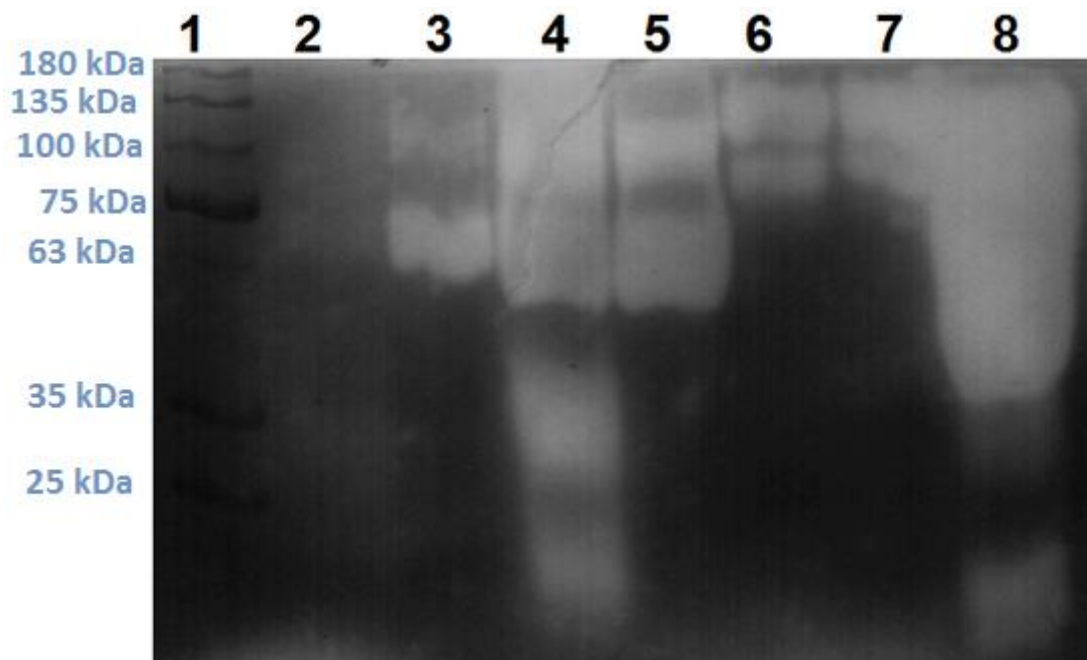


Figura 26. Zimograma con tinción de Coomassie. Izquierda: Marcador de Peso Molecular AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder. **Derecha:** Carril 1- Marcador de peso molecular. Carril 2- Sobrenadante de la línea celular Swan 71 tratado. Carril 3 - Sobrenadante de la línea celular NIH3T3 tratado. Carril 4 - Sobrenadante de la línea celular Swan 71 sin tratar. Carril 5 - Sobrenadante de la línea celular NIH3T3 sin tratar. Carril 6 - Colagenasa diluida 1/1000. Carril 7 - Colagenasa diluida. Carril 8 - Colagenasa concentrada (1 mg/mL).

El control positivo comercial de actividad enzimática utilizado, proviene de una mezcla de 10-18 enzimas secretadas por *Clostridium histolyticum*, por tanto su peso molecular aparente en una electroforesis está definida en un rango de entre 68 y 125kDa. En el carril 8, se observa una zona clara abarcando el rango de 35-180kDa, correspondiente a la actividad de la mezcla enzimática de la colagenasa. En el carril 6 y 7, donde fue sembrada la colagenasa diluida, se observa actividad enzimática en forma de dos bandas entre 180-135kDa, y 80-100kDa.

En los carriles correspondientes al sobrenadante de la línea celular Swan 71 (Carriles 2 y 4), se observa una intensa banda de actividad enzimática entre 80-100kDa correspondiente a la pro-MMP-9, la cuál posee un peso molecular de 92kDa. Este pro-péptido libera una enzima de 82kDa una vez clivado (MMP-9), el cual se ubica también dentro de la banda anteriormente mencionada. Por otro lado, se observa una banda entre 50-75kDa correspondiente a la MMP-2. La pro-MMP-2 (Zimógeno de MMP-2) presenta un peso molecular de 72kDa, y una vez clivada su peso se encuentra en el rango de 59-62kDa, todos los cuales se encuentran dentro del peso molecular de la banda descrita para MMP-2 (53, 54).

A su vez, por debajo de los 41kDa para el sobrenadante de Swan 71 sin tratar (Carril 4), se pueden observar dos bandas de identidad desconocida. Estas pueden corresponder a metaloproteasas degradadas que aún conservan actividad (55).

En los carriles 3 y 5, donde fue sembrado el sobrenadante de la línea celular NIH3T3 tratado y sin tratar respectivamente, también se observan bandas de actividad enzimática. La primera banda se encuentra entre 100-135kDa mientras que la segunda se encuentra entre 63-75kDa. Está reportado que la línea celular NIH3T3 al ser una línea fibroblástica secreta una variada cantidad de MMPs,

entre las cuales se encuentran las MMP-2 y 9 (56). Esto se corresponde con los pesos moleculares anteriormente descritos para estas enzimas, siendo la banda más pesada que se observa en estos carriles correspondientes a la MMP-9 y la más ligera a MMP-2.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó una caracterización completa de la línea celular Swan 71 obtenida gentilmente del Departamento de Biología Molecular, Celular y de Desarrollo de la Universidad de Yale, Estados Unidos. El abordaje de dicha caracterización incluyó la evaluación de diversos parámetros de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo así como la realización de ensayos morfológicos, citogenéticos, enzimáticos, proteicos e inmunológicos. Por otro lado, se analizó el ciclo celular mediante la evaluación de su progreso utilizando un citómetro de flujo.

En primera instancia, se analizó la morfología de la línea celular. La misma presenta células bipolares con un largo considerablemente mayor a su ancho lo cual fue observado al microscopio con y sin tinción. Este tipo de células recibe el nombre de fibroblástica de acuerdo a la morfología presentada (4). En los cultivos realizados, se comprobó que los CTEV son células mononucleadas, lo cual se corresponde con los datos bibliográficos reportados previamente (57).

Si bien las células de la línea celular estudiada son CTEV, se observó que, a su vez, son capaces de formar sincitios, lo cual es característico de los CTV, que se diferencian a sincitiotrofoblastos. El hecho de que la línea celular en cuestión exhiba esta característica puede deberse a que los CTEV y la capa multinuclear del sincitiotrofoblasto poseen un origen común: el trofoectodermo (58).

Por otro lado, al comparar el estudio morfológico de la línea realizado a pasaje medio con el estudio a pasaje bajo reportado (12), se observó que la morfología se mantiene a pasajes sucesivos. Esto es coherente con la literatura, que reporta que las células inmortalizadas con el gen hTERT conservan mejor sus características originales como morfología nativa que aquellas inmortalizadas con virus (60).

Cuando se realiza una caracterización celular, resulta relevante es cuantificar su contenido genético. Es por ello que se realizó un estudio del cariotipo para así poder confirmar su ploidía. Este estudio se realizó en el laboratorio Genodiagnosis, bajo la tutoría de Horacio Cardoso. El resultado obtenido fue un cariotipo anormal, con hasta cinco copias de varios grupos de cromosomas, lo cual es coherente con el cariotipo reportado para la línea celular en cuestión, el cual también es pentaploide (38). A su vez, se encontraron aberraciones cromosómicas tales como deleciones, isocromosomas, y un cromosoma dicéntrico. Por otro lado, el análisis del ciclo celular mostró que la duración de la fase S para la línea estudiada es superior a lo normal, pues las células se mantienen en la fase S hasta las 32 horas una vez realizado el desarresto celular. Estos resultados se corresponden entre sí: el alto contenido cromosómico que presenta dicha línea celular se traduce en un ciclo celular lento en que las células de esta línea pasan la mayor parte del ciclo en la fase S en la cual se lleva a cabo la replicación. Este dato también es consistente a su vez con los resultados obtenidos a partir de las curvas de crecimiento, en las que se obtuvo un tiempo de duplicación de 31 a 41 horas aproximadamente.

Para obtener un dato más certero con respecto al ciclo celular, es conveniente realizar nuevamente el análisis mediante citometría de flujo pero en este caso, el tiempo de arresto por privación de suero debe ser de al menos 31 horas. De acuerdo a los resultados obtenidos en este nuevo procedimiento, se podrá evaluar con mayor fiabilidad la progresión a través de las distintas fases.

Con respecto al arresto mediante Colcemida, el mismo se llevó a cabo con el fin de sincronizar las células en la fase M de división celular (59). Sin embargo, no se logró una correcta sincronización en primera instancia (*data not shown*) por lo que se considera la posibilidad de que, al igual que con la privación de suero, los tiempos de exposición al tratamiento no fueron suficientes para lograr una sincronización eficiente de las células en la fase M. Esto se da debido a que se observa una fase S con una duración de al menos 32 horas y las células fueron expuestas a Colcemida durante 2,5 horas. De todas formas, se debe destacar que la Colcemida en sí no fue ineficiente ya que para la realización del cariotipo, el tratamiento con la misma mostró resultados exitosos.

En cuanto al análisis del contenido de ADN mediante la realización del cariotipo, con el fin de obtener datos que sean estadísticamente representativos, el mismo se debería repetir analizando cromosomas de más de una célula a partir de los preparados realizados. Cabe resaltar, igualmente, que los datos obtenidos presentan coherencia con los reportados por otro grupo de investigadores al estudiar el cariotipo de dicha línea celular.

Una herramienta utilizada para la caracterización de líneas celulares es la detección de proteínas expresadas por la misma, que sean características del linaje celular que les dio origen (4). Dado que la expresión de hCG es característica de los trofoblastos, se planteó su detección mediante dos métodos diferentes: electroforesis SDS-PAGE e inmunocromatografía.

En ambos ensayos no se detectó presencia de dicha hormona en las muestras. Esto se debe principalmente a la baja sensibilidad de los ensayos para el nivel de expresión de hormona reportada. A su vez, se estiman grandes pérdidas de la proteína de interés en el procesamiento de las muestras, debido tanto a adsorción de la proteína a la membrana del centrífugo, o un punto de corte mayor a los 30kDa indicados.

Al analizar los geles obtenidos como resultado de la electroforesis SDS-PAGE, no se observa presencia de bandas por debajo de los 50 kDa para las muestras concentradas. Esto posiblemente radica en el procesamiento de las muestras mediante el uso del centrífugo de 30kDa. Considerando lo mencionado, se debería repetir el tratamiento de las muestras utilizando un centrífugo de 10kDa, de manera de obtener un margen más grande entre el peso esperado para la proteína de interés y el corte del centrífugo. A su vez, se podría utilizar otros métodos de concentración de proteínas tales como la liofilización.

Con respecto a la inmunocromatografía, la muestra se debería haber concentrado más veces con el fin de alcanzar el límite de sensibilidad de la técnica dados los niveles bajos de expresión de hCG reportados para la línea celular en estudio.

Por otro lado, con respecto al análisis enzimático mediante la realización de un zimograma, a partir del ensayo se comprobó que la línea celular expresa las MMP-2 y 9, las cuales fueron visualizadas claramente en los geles realizados. Esto se corresponde con la bibliografía, pues está reportado que, sobre todo durante el primer trimestre de embarazo, los trofoblastos expresan tanto la MMP-2 como la MMP-9 (60, 61, 22). De todas formas, se debería realizar un *Western blot* para verificar la identidad de las metaloproteasa encontradas en la muestra así como para verificar si las bandas de

identidad desconocida que se ven por debajo de los 41kDa para el sobrenadante de Swan 71 sin concentrar, no son más que productos de degradación de las mismas.

6. ANÁLISIS ECONÓMICO

La caracterización de una línea celular es un proceso complejo que involucra técnicas variadas e insume muchas horas de trabajo que se traducen a su vez en costos elevados. De todas formas, es un proceso vital y necesario por el cual muchas empresas y laboratorios pagan grandes cantidades de dinero a organismos dedicados exclusivamente a ofrecer dicho servicio. Las líneas celulares adecuadamente caracterizadas son vitales para asegurar la fiabilidad de los resultados de una investigación o proceso de producción así como la reproducibilidad y consistencia de los mismos. Sin embargo, hay que destacar que en nuestro país no existe ningún centro de referencia en el cual se puedan adquirir líneas celulares certificadas o solicitar el servicio de caracterización de otras líneas.

Por este motivo, se debe subrayar la importancia del presente trabajo en cuanto al establecimiento de procedimientos y puesta a punto de diversas técnicas implicadas en la caracterización de una línea celular, las cuales podrían ser empleadas, con las modificaciones necesarias para cada caso en particular, tanto para otras líneas celulares que se reciban o que se generen en el laboratorio así como para la validación de líneas celulares ya banqueadas. El conocimiento generado tiene un gran valor y se podría aplicar como servicio en nuestro país para líneas celulares provenientes ya sea del Uruguay como de otros países de la región.

En particular, la caracterización de la línea celular Swan 71, disponible en el laboratorio de la Universidad ORT Uruguay permite su uso respaldado y confiable como herramienta para el estudio de los procesos de invasión del embrión así como de los mecanismos para su estimulación. Esta investigación es de suma importancia dentro del creciente campo relacionado con la infertilidad. Esto se debe a que la técnica de Fertilización *In Vitro* (IVF), una técnica de reproducción asistida, tiene asociada una alta tasa de riesgo provocada por fallas en la invasión del blastocisto debido a mecanismos de señalización celular pobremente entendidos (62).

A nivel mundial, más de 70 millones de parejas se ven afectadas por problemas de infertilidad. Es por esta razón que durante la última década, el uso de múltiples tecnologías de reproducción asistida ha aumentado en una tasa de 10,5% anual (63). En la figura 27, se muestra el costo marginal por ciclo de IVF, el cual va de U\$S 66.667 hasta U\$S 114.286 para el primer y para el sexto ciclo respectivamente. Se debe tener en cuenta que el costo aumenta debido a que con cada ciclo en el que la fertilización falla, la probabilidad de éxito del siguiente ciclo disminuye (64).

Table 3. Marginal Cost per Delivery with in Vitro Fertilization for the Base Case and Low- and High-Range Assumptions.

ASSUMPTION	DELIVERY RATE PER INITIATED CYCLE (%)	CUMULATIVE DELIVERY RATE (%)*	COST PER INITIATED CYCLE (\$)	MARGINAL COST PER DELIVERY (\$) [†]
Base case				
Cycle 1	12	12.0	8,000	66,667
Cycle 2	11	21.7	8,000	72,727
Cycle 3	10	29.5	8,000	80,000
Cycle 4	9	32.9	8,000	88,889
Cycle 5	8	41.0	8,000	100,000
Cycle 6	7	45.1	8,000	114,286
Low-range assumptions				
Cycle 1	14	14.0	7,720	55,143
Cycle 2	13	25.2	5,720	44,000
Cycle 3	12	34.2	5,720	47,667
Cycle 4	11	41.4	5,720	52,000
Cycle 5	10	47.3	5,720	57,200
Cycle 6	9	52.0	5,720	63,556
High-range assumptions				
Cycle 1	10	10.0	10,597	105,970
Cycle 2	9	18.1	10,597	117,744
Cycle 3	8	26.4	10,597	132,463
Cycle 4	7	29.9	10,597	151,386
Cycle 5	6	34.1	10,597	176,662
Cycle 6	5	37.4	10,597	211,940

*Sample calculation of the cumulative delivery rate: for cycle 3 in the base case, the rate is $1 - (0.88 \times 0.89 \times 0.90) = 0.295$.

[†]Marginal cost per delivery = $\frac{\text{cost incurred in cycle 1}}{\text{probability of delivery in cycle 1}}$

Figura 27. Costo marginal de fertilización *in vitro*. Adaptado de Neumann *et al.* (64).

Ciertas condiciones en las que se lleva a cabo la IVF se podrían mejorar si se contara con una masa crítica de resultados validados respecto a la estimulación de los mecanismos de invasión. La línea celular Swan 71 constituye un modelo celular adecuado y prometedor para tal fin. A modo de ejemplo, la transferencia de varios embriones es una práctica común ya que de ésta manera se busca mejorar la tasa de éxito; sin embargo, resulta en una mayor probabilidad de embarazo múltiple la cual es de 15-30% en IVF en relación con la de concepción espontánea correspondiendo a 1,05-1,35% (63, 65, 66).

Los embarazos múltiples que son consecuencia de la introducción de un mayor número de embriones, producen un aumento de los riesgos a corto y largo plazo tanto para la madre como para el bebé, entre los cuales se encuentra el parto prematuro, la hipertensión provocada por el embarazo, diabetes gestacional y hemorragia uterina, entre otros. Los riesgos asociados para los bebés comprenden prematuridad, muerte y discapacidades físicas, mentales o de desarrollo (66). Estas discapacidades llevan a una mayor duración en unidades de cuidados intensivos. Por esto se ha estimado que los cargos hospitalarios son cuatro veces mayores para gemelos y hasta 11 veces mayores para trillizos que aquellos asociados con un hijo único (64, 66).

Como resultado final, se podría no solamente contribuir a una mayor tasa de éxito en la IVF, sino que también reducir la cantidad de embriones que se transfieren por ciclo resultando en un menor riesgo tanto para la madre como para el hijo. A su vez, los costos serían considerablemente menores.

7. CONCLUSIÓN

7.1 Conclusión general

Se logró caracterizar la línea celular Swan 71 a un pasaje promedio entre 17-27 considerado como el rango de pasajes de trabajo.

7.2 Conclusiones específicas

Se realizó un MCB, el cual permite mantener la línea celular conservada en pasaje bajo, asegurando resultados confiables. A su vez, se generó un banco celular de trabajo que posibilita realizar todos los experimentos en el rango de pasajes anteriormente mencionados, pues brinda un *stock* celular constante.

En cuanto al mantenimiento celular, se concluyó que se debe cambiar el medio de cultivo cada 2-3 días y subcultivarlas antes de que alcancen un 80% de confluencia. Esto es debido a que al llegar a la confluencia, las células se desprenden masivamente del sustrato y mueren. Asimismo, se definió la siembra óptima de células para mantenimiento como 5×10^4 células/mL en botella T-25 y de 2×10^4 células/mL para la evaluación de crecimiento celular en placa de 24-*wells*.

Con respecto a la evaluación del crecimiento celular con distintas concentraciones de SFB, se probó que la línea celular es capaz de crecer con 5% de suero. Se observó que la línea celular tiene un tiempo de duplicación en promedio de 1,5 días y una velocidad de crecimiento de $0,46 \text{ días}^{-1}$.

La morfología celular mostró consistencia de acuerdo lo reportado para trofoblastos primarios.

Por otro lado, los ensayos citogenéticos mostraron un contenido cromosómico anormal. Se comprobó que su ciclo celular posee un pasaje lento por la fase S, reafirmando tanto que el contenido genético es anormal como que posee lentos tiempos de duplicación.

Para finalizar, no se observó expresión de hCG β con los métodos utilizados, y una presencia de las enzimas MMP-2 y 9 en los pasajes trabajados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614–636.
2. Luque A, González Granja A, González L, Tafalla C. Establishment and characterization of a rainbow trout heart endothelial cell line with susceptibility to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Fish Shellfish Immunol.* 2014;38(1):255–264.
3. Stewart S a, Weinberg R a. Senescence: does it all happen at the ends? *Oncogene.* 2002;21(4):627–630.
4. Freshney RI. *Culture of animal cells.* 6th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2010.
5. Castilho L, Moraes A, Augusto E, Butler M, editors. *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy.* New York, NY: Taylor & Francis; 2008.
6. Yamada KM, Yamada SS, Pastan I. Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness, and contact inhibition of movement to transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci.* 1976;73(4):1217–1221.
7. James JL, Stone PR, Chamley LW. Cytotrophoblast differentiation in the first trimester of pregnancy: evidence for separate progenitors of extravillous trophoblasts and syncytiotrophoblast. *Reproduction.* 2005;130(1):95–103.
8. Schlafke S, Enders AC. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod.* 1975;12(1):41–65.
9. Pansky, B. *Review of medical embryology.* New York, NY: Macmillan USA; 1982.
10. Tarrade A, Lai Kuen R, Malassiné A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, Evain-Brion D. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest.* 2001;81(9):1199–1211.
11. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* 2004;114(6):744–754.
12. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Alvero AB, Aldo PB, Ma Y, Guller S, Romero R, Mor G. The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71. *Placenta.* 2009;30(11):939–948.
13. Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod.* 2010;82(2):235–245.
14. Feng HC, Choy MY, Deng W, Wong HL, Lau WM, Cheung AN, Ngan HY, Tsao SW. Establishment and characterization of a human first-trimester extravillous trophoblast cell line (TEV-1). *J Soc Gynecol Investig.* 2005;12(4): 21–32.

15. Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res.* 1993;206(2):204–211.
16. Montagnana M, Trenti T, Aloe R, Cervellin G, Lippi G. Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics. *Clin Chim Acta.* 2011;412(17-18):1515–1520.
17. Stenman U-H, Alfthan H. Determination of human chorionic gonadotropin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013;27(6):783–793.
18. Stenman U-H, Alfthan H, Hotakainen K. Human chorionic gonadotropin in cancer. *Clin Biochem.* 2004;37:549–561.
19. Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem.* 1997;43(12):2233–2243.
20. Castillo J, Leira R, Blanco M. Metaloproteasas y lesión neurovascular. *Neurología.* 2004;19(6):312–320.
21. Higa R, Fornes D, Musikant D. Rol de las metaloproteasas en la gestación e impacto de la diabetes materna. *SAEGRE.* 2011;18(2):39–42.
22. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;2(59).
23. Arvelo F, Cotte C. Metaloproteasas en la progresión tumoral. Revisión. *Invest Clin.* 2006;47(2):185–205.
24. Medyannikova I V, Klinyshkova T V. Efficiency of treatment cycles for In vitro fertilization at climatic conditions of siberian region (Omsk , Russia). *World Appl Sci J.* 2012;19(8):1174–1181.
25. Director, Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals [Internet]. Washington DC, USA: Department of Health & Human Services, FDA; July 1993 [citado Mar 2015]. Disponible desde: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/UCM162863.pdf>
26. Nussbaum R, McInnes RR, Wbillard, HF. *Genetics in medicine.* 7th ed. Philadelphia, PA.: Saunders; 2007.
27. Celis J, editor. *Cell biology: a laboratory handbook Volume 1.* 2nd ed. Waltham, MA: Academic Press; 1997.
28. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 5th ed. New York, NY: Garland science, Taylor & Francis Group, LLC; 2007.
29. Darzynkiewicz Z, Juan G, Bedner E. Determining cell cycle stages by flow cytometry. In: Bonifacino J, Dasso M, Lippincott-Schwartz J, editors. *Current Protocols in Cell Biology.* New Jersey, Hoboken; 1999. p. 1070–1087.

30. BD Biosciences. Introduction to Flow Cytometry: a learning guide [Internet]. Minnesota: University of Minnesota Duluth; April 2000 [citado Marzo 2015]. Disponible desde: <http://www.d.umn.edu/~biomed/flowcytometry/introflowcytometry.pdf>.
31. Edmond, SKM. Determination of DNA index by flow cytometry [Internet]. Hong Kong: The Hong Kong Association of Blood Transfusion and Haematology; May 2002 [citado Mar 2015]. Disponible desde: <http://www.fmshk.com.hk/hkabth/em/200205.htm>
32. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
33. Waas ET, Lomme RMLM, DeGroot J, Wobbles TH, Hendriks T. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2002;86(12):1876–1883.
34. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss III JF. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*. 1986;118(4):1567–1582.
35. Pollack RE, Green H, Todaro GJ. Growth control in cultured cells: selection of sublines with increased sensitivity to contact inhibition and decreased tumor-producing ability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;60(1):126–133.
36. González JM. Técnicas y métodos de laboratorio clínico. 3rd ed. España: Elsevier Masson; 2010.
37. Eils R, Uhrig S, Saracoglu K, Sätzler K, Bolzer A, Petersen I, Chassery J, Ganser M, Speicher MR. An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet Cell Genet*. 1998;82(3-4):160-171
38. Schellinger MM, Drendel HM, Chakraborty S, McClintick JN, Sanders KL, Lee M-J, Reiter JL. [S-150] Cytogenetic features of human trophoblast cell lines Swan-71 and 3A-subE. Trabajo presentado en: 61st Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation; 2014 March 26-29; Florence, Italy.
39. Leibiger C, Kosyakova N, Mkrtchyan H, Gleis M, Trifonov V, Liehr T. First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. *J Histochem Cytochem*. 2013;61(4):306–312.
40. Omerod, MG. Flow cytometry: a basic Introduction. UK: Privately published; 2009 [citado Mar 2015]. Disponible desde: http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book.
41. Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol*. 2001;3(3):67–70.
42. Kasinathan P, Knott JG, Moreira PN, Burnside a S, Jerry DJ, Robl JM. Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos in vitro. *Biol Reprod*. 2001;64(5):1487–1493.
43. Moore a, Mercer J, Dutina G, Donahue CJ, Bauer KD, Mather JP, Etcheverry T, Ryll T. Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology*. 1997;23(1-3):47–54.

44. Nesselhut T, Rath W, Grospietsch G, Weber MH, Kuhn W. Urinary protein electrophoresis profile in normal and hypertensive pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 1989;246(2):97-105.
45. López-Cruz G, Reyes-Gomez U, Hernández-Cruz P. Proteína de Tamm-Horsfall: implicaciones clínicas en la vía urinaria. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son.* 2010;27(2):125-128.
46. Muchmore A V, Decker JM. Uromodulin. *J Biol Chem.* 1986;261(29):13404–13407.
47. Brown KM, Muchmore a V, Rosenstreich DL. Uromodulin, an immunosuppressive protein derived from pregnancy urine, is an inhibitor of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83(23):9119–9123.
48. Rindler MJ, Naik SS, Nanxin L, Hoops TC, Peraldi M-N. Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/uromuroid) Is a phosphatidylinositol-linked membrane protein. *J Biol Chem.* 1990;265(34):20784–20789.
49. Barratt J, Topham P. Urine proteomics: The present and future of measuring urinary protein components in disease. *Cmaj.* 2007;177(4):361–368.
50. Wu H, Lustbader JW, Liu Y, Canfield RE, Hendrickson W a. Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Structure.* 1994;2(6):545–558.
51. Gam L, Latiff A. SDS-PAGE electrophoretic property of human chorionic gonadotropin (hCG) and its β -subunit. *Int J Biol Sci.* 2005;1(3):103–109.
52. Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest.* 1999;103(9):1237–1241.
53. Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Neal D, Thomas D, Hanby A, Balkwill F. Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res.* 1993 Nov 15;53(22):5365-5369.
54. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94(6):2493-2503.
55. Novoa-Herrán SS. El IGF-II estimula la actividad de MMP-9 Y MMP-2. *Acta Biol Colomb.* 2011;16(1):121–131.
56. Kadomatsu K, Hagihara M, Akhter S, Fan QW, Muramatsu H, Muramatsu T. Midkine induces the transformation of NIH3T3 cells. *Br J Cancer.* 1997;75(3):354–359.
57. Aplin JD. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci.* 1991;99(4):681–692.
58. Brencsi III G, editor. Maternal fetal transmission of human viruses and their influence on tumorigenesis. New York City, NY: Springer; 2012.
59. Rieder CL, Palazzo RE. Colcemid and the mitotic cycle. *J Cell Sci.* 1992;102(3):387–392.

60. LaMarca HL, Nelson AB, Scandurro AB, Whitley GSJ, Morris CA. Human cytomegalovirus-induced inhibition of cytotrophoblast invasion in a first trimester extravillous cytotrophoblast cell line. *Placenta*. 2006;27(2-3):137–147.
61. Caniggia I, Lye SJ, Cross JC. Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. *Endocrinology*. 1997;138(9):3976–3986.
62. Carver J, Martin K, Spyropoulou I, Barlow D, Sargent I, Mardon H. An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. *Hum Reprod*. 2003 Feb;18(2):283-290.
63. Zhao Y, Brezina P, Hsu CC, Garcia J, Brinsden PR, Wallach E. In vitro fertilization: four decades of reflections and promises. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(9):843–852.
64. Neumann PJ, Gharib SD, Weinstein MC. The cost of a successful delivery with in vitro fertilization. *N Engl J Med*. 1994;331(4):239–243.
65. Wølner-Hanssen P, Rydhstroem H. Cost-effectiveness analysis of in-vitro fertilization: estimated costs per successful pregnancy after transfer of one or two embryos. *Hum Reprod*. 1998;13(1):88–94.
66. Jain T, Harlow BL, Hornstein MD. Insurance coverage and outcomes of in vitro fertilization. *N Engl J Med*. 2002;347(9):661–666.