

Influencia del campo magnético estacionario en el cultivo de Hidridoma Inluences of the stationary magnetic field in the cultivation of Hidrodoma

Dra. María Lina Jiménez Pardo ¹, Dr. Roberto Bolaños Escofet ², Lic. Héctor Alvarez Castillo ³, Lic. Ubaldo Torres Romo ⁴, Lic. María Aurora López Flores ⁵, Dra. Nilda Sánchez Treto ⁶.

RESUMEN

Se aplicó un campo magnético estacionario con una intensidad de 4×10^{-3} Tesla durante 1 hora por seis días a cultivos celulares del hidridoma IOR-R3.

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos a una densidad celular de 2×10^4 , y fueron mantenidas bajo condiciones de crecimiento exponencial a 37 grados Celsius y atmósfera de CO₂ al 5 %. Se emplearon dos placas testigos y dos fueron sometidas a campo magnético. Durante el tiempo de exposición las placas testigos se mantuvieron a igual temperatura que las sometidas al campo.

Se analizó el crecimiento celular, viabilidad y concentración de inmunoglobulinas G obteniéndose mejores resultados en las células expuestas a campo magnético.

PALABRAS CLAVES: MAGNETISMO, HIBRIDOMAS

1. Profesora de Agentes Biológicos FCM C. de Ávila.
2. Investigador FCM Ciego de Ávila.
3. Profesor de Física ISP Ciego de Ávila.
4. Profesor de Bioquímica FCM Ciego de Ávila.
5. Profesora de Bioestadística y Computación FCM.
6. Profesora de Anatomía FCM C. de Ávila.

INTRODUCCION

Los efectos biológicos de los campos magnéticos han sido estudiados desde la antigüedad. Las primeras teorías sobre su repercusión en el organismo humano fueron de forma empírica, pero estudios posteriores permitieron conocer de sus influencias a nivel celular, comprobándose que pueden ser variadas e influyen en los diversos procesos que se llevan a cabo en las células.

La interacción de campos magnéticos con membranas celulares, como un mecanismo aceptable para efectos fisiológicos, ha sido propuesta por varios autores (Labes, 1966; Aceto et al; 1970), ellos observaron que las mismas tienen propiedades similares a un cristal líquido y los campos magnéticos podían actuar en la fluidez de las membranas y otras propiedades.

Estudios realizados en Salmonella y cultivo de linfoblastos humanos (Stopek et al; citados por Polk y Postow, 1988) exponiéndolos a campo magnético de 10 T durante 4 horas, no demostraron efectos mutagénicos o tóxicos para ningún tipo de células.

En cultivos de células mamarias expuestas a campo magnético de 0.1 a 0.3 T no se reportaron efectos mitogénicos (Edelman et al; 1979).

En células cultivadas de carcinomas humanos y de linfoma Burkitt sometidas a campo magnético de hasta 1.15 T (Chandra y Stefani, 1979) no se reportaron afectaciones en el crecimiento celular.

Investigaciones realizadas en linfocitos humanos los cuales fueron sometidos a pulsaciones magnéticas de 50 Hz, 1.05 mT durante 24 y 48 horas no causaron demora significativa en la proliferación celular, no así en aquellos que fueron expuestos continuamente a pulsaciones magnéticas, los cuales demostraron una reducción significativa en la proliferación celular (Khalil, 1991).

Si bien los efectos de campos magnéticos de baja frecuencia no provocan alteraciones mutagénicas, mitogénicas o retardo del crecimiento celular es necesario tener en cuenta la intensidad del campo, la intensidad de la corriente y el tiempo de exposición.

Estas consideraciones nos han llevado a comenzar investigaciones de los posibles efectos del campo magnético estacionario en cultivos de hidridomas murinos. Este trabajo aborda precisamente estudios

iniciales sobre sus influencias en el cultivo del hibridoma IOR-R3 con el objetivo de determinar sus efectos en el crecimiento celular, viabilidad y producción de inmunoglobulinas G, lo cual nos posibilitará una valoración futura de la utilización del campo magnético estacionario en cultivos de hibridomas y producción de anticuerpos monoclonales.

MATERIALES Y METODO

Hibridoma

El hibridoma IOR-R3 secretor del anticuerpo monoclonal (AcM) 73 del tipo IgG2a reconoce al receptor del factor de crecimiento epidérmico. Este AcM brinda la posibilidad de una mejor valoración pronóstica en algunos tumores.

Los experimentos reportados en este trabajo se ejecutaron con células provenientes de un mismo lote de congelación del Banco de Trabajo del laboratorio.

Medio base para el cultivo

En nuestros ensayos se empleó como medio base RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 15 mM HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 26 mM de bicarbonato de sodio, 0.05 mM de 2-mercaptoetanol y 10% de suero fetal de ternera (Tecnoma).

Condiciones de cultivo

Las células se sembraron en placas de 24 pozos a una concentración celular inicial de 2×10^4 células en 1 ml de medio de crecimiento, para el experimento se utilizaron cuatro placas las que fueron mantenidas en condiciones de crecimiento exponencial a 37 grados Celsius y atmósfera de CO₂ al 5 %.

Dos placas fueron sometidas a campo magnético estacionario con una intensidad del campo de 4×10^{-3} T durante 1 hora a una temperatura ambiente de 28 grados Celsius, los dos restantes se mantuvieron a igual temperatura, pero sin ser sometidas al campo magnético.

A partir de las 24 horas de iniciado el cultivo se estimó el número de células y la viabilidad celular mediante el método de la cámara de Neubauer y concentración de Ig G según se describe a continuación.

Determinación de concentración de inmunoglobulinas G Para la cuantificación de las inmunoglobulinas G presentes en los sobrenadantes de cultivo se empleó el sistema inmunoenzimático de fase sólida que se produce en el Centro de Inmunología Molecular. Se recubrieron placas de microtitulación de polivinilo durante 18 horas a 4 grados Celsius, y en cámara húmeda, con 10 ul/pozo de una solución conteniendo anti IgG de ratón en carnero en tampón bicarbonato 0.1 M pH 9.6. Después de lavados con tampón fosfato salino (TFS)-Tween 20 al 0.05 %, las placas se incubaron 1 hora a 37 grados Celsius con las muestras a

ensayar resuspendidas en TFS-Tween 20 y Suero de ternera al 5 %.

Después de lavados con TFS-Tween 20 al 0.05 %, las placas se incubaron 1 hora a 37 grados Celsius a 10 ul/pozo de anti IgG de ratón en carnero, conjugada con fosfatasa alcalina, en TFS-Tween 20-Suero de ternera 5 %. La reacción se reveló con 10 ul/pozo de la solución de 4-Methylumbelliferyl Phosphate después de incubado 30 minutos a temperatura ambiente y se procedió a determinar la fluorescencia a 492 nm en un equipo SUMA.

Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de los signos (Bernard, 1988) y se estableció la correlación 73 entre los diferentes índices estudiados y tiempo de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 se observa de forma comparativa los resultados en cuanto a la producción de inmunoglobulinas G de las células magnetizadas y no magnetizadas. Se aprecia un incremento en las células magnetizadas con una diferencia significativa para $p < 0.01$.

En la figura 2 se observa el crecimiento de las células no sometidas y sometidas a campo magnético estacionario del cultivo de hibridoma IOR-R3 en placa de 24 pozos con una densidad celular inicial de 2×10^4 células. Al comparar los resultados se muestra un ligero incremento en las células sometidas a

campo magnético. Se encontraron diferencias significativas para $p < 0.01$ entre las células magnetizadas y no magnetizadas.

Aunque no en hibridomas, otros autores (Chandra y Stefani, 1979) reportaron no haber observado afectaciones en el crecimiento de células de carcinomas expuestas a campo magnético de corriente directa.

En la línea celular cultivada por nosotros hubo un crecimiento constante en el número de células a partir de iniciado el cultivo tanto en las magnetizadas como en las no magnetizadas, sobre lo cual pudiera haber influido, en el caso de las magnetizadas, el ser sometidas a un campo magnético estacionario. Estudios realizados en cinco especies de bacterias (Moore, 1979) expuestas a campo magnético de variación lenta y corriente directa de hasta 0.09 T se reportó tanto estimulación como retardo del crecimiento celular.

Investigaciones realizadas sobre los efectos de pulsaciones magnéticas de baja frecuencia en tejidos humanos y animales plantean que las mismas actúan a nivel de la membrana celular y modulan receptores lo cual es esencial para el crecimiento celular y síntesis del DNA (Satake, 1990).

En la figura 3 se muestra el comportamiento de la viabilidad en células magnetizadas y no magnetizadas.

Observamos que la viabilidad de las células magnetizadas se mantuvo estable a partir del tercer día no así en las no magnetizadas donde hubo un ligero decrecimiento en el cuarto día. Se encontraron diferencias significativas para $p < 0.01$ entre las células magnetizadas y no magnetizadas.

CONCLUSIONES

1-El crecimiento celular fue significativamente superior en las células expuestas a campos magnéticos estacionarios ($p < 0.01$).

2-La viabilidad celular fue significativamente superior en las células sometidas a campos magnéticos estacionarios ($p < 0.01$).

3-La producción de 7S inmunoglobulinas G totales fue significativamente mayor en las células expuestas a campos magnéticos estacionarios ($p < 0.01$).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aceto H, Tobias AC, Silver IL. "Some studies on the biological effects of magnetic fields, IEEE Trans. Magn G 1970;368.
2. Bernar Ostle. Estadística aplicada. Editorial Científico Técnica, 1988.
3. Chandra S, Stefani S. Effect of constant and alternating magnetic field on tumor in vitro and in vivo, in biological effects of extremely low frequency electromagnetic field. Conf 781016 U.S. Department of Energy 1979;436.
4. Edelman A, Teulon J, Puchalska IB. Influence of the magnetic field on frog sciatic nerve of Physics, New York 1975; 759.
5. Khalil AM. Ontogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and cell kinetics. Mutat Res 1991;247(1): 141-6.
6. More R L. Biological effects of magnetic fields: studies with microorganisms. Can. J. Microbiol 1979; 25: 1145.
7. Polk CH, Postow E. CRC Handbook of biological effects of electromagnetic fields. Boca Raton, Florida 1988;177-190.
8. Satake T. Effects of pulsed electromagnetic fields on osteoblast-Like cells. Alterations on intracellular Ca^{2+} . Kanagawa Shigaku 1990; 24(4): 692-701.