

Ensayos in vitro para cuantificar la actividad biológica de citocinas

In vitro assays to quantify the biological activity of cytokines

Ayerin Carrodegua-González¹, Andrés Zúñiga-Orozco²,
María Victoria Ortiz-Cruz³

Fecha de recepción: 3 de marzo de 2021
Fecha de aprobación: 6 de agosto de 2021

Carrodegua-González, A; Zúñiga-Orozco, A; Ortiz-Cruz, M.V. Ensayos in vitro para cuantificar la actividad biológica de citocinas. *Tecnología en Marcha*. Vol. 35-2. Abril-Junio 2022. Pág 152-166.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v35i2.5638>

- 1 Investigadora independiente en Biología, Mayabeque, Cuba.
Correo electrónico: ayerim2009@gmail.com
 <https://orcid.org/0000-0001-5890-4174>
- 2 Docente e Investigador. Carrera Ingeniería Agronómica. Universidad Estatal a Distancia (UNED). San José, Costa Rica.
Correo electrónico: azunigao@uned.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0001-8214-4435>
- 3 Reserva de la Biosfera, Sierra del Rosario, ECOVIDA, CITMA, Artemisa, Cuba.
Correo electrónico: mvortiz2697@gmail.com
 <https://orcid.org/0000-0001-9140-0971>



Palabras clave

Ensayos biológicos; líneas celulares; contaminación; potencia biológica; fármacos, paralelismo.

Resumen

Las citocinas son moléculas de bajo peso molecular que son fundamentales en la respuesta inflamatoria e inmune y en numerosos procesos biológicos y celulares. Son el ingrediente activo de numerosos fármacos, producidos para tratar diferentes enfermedades; muchas de las cuales están relacionadas con el funcionamiento del sistema inmune. Estos medicamentos, antes de ser comercializados, deben cumplir con una serie de requisitos, entre los que se encuentra, la cuantificación de la actividad biológica. Este parámetro se mide a través de ensayos biológicos *in vivo* e *in vitro*, siendo estos últimos los más utilizados por su mayor rapidez y versatilidad. Los ensayos *in vitro* son realizados en locales con todo el equipamiento necesario y el personal con la suficiente experiencia para llevarlos a cabo. Existen muchos factores que pueden influir en la calidad de estos métodos analíticos, los cuales se deben mantener bajo un estricto control para la aprobación final del ensayo. Por tales razones, el objetivo de esta revisión es reunir las bases teóricas para la realización de ensayos *in vitro* para cuantificar la actividad biológica de citocinas, así como los factores que influyen en la calidad de estos.

Keywords

Bioassays; cell lines; contamination; biological potency; drugs; parallelism.

Abstract

Cytokines are low molecular weight molecules that play a fundamental role in the inflammatory and immune response and in numerous biological and cellular processes. They are the active ingredient in many drugs, produced to treat different diseases, many of these related to the immune system. These drugs, before being marketed, must meet a series of requirements, among which is the quantification of biological activity. The biological activity of cytokines is measured through *in vivo* and *in vitro* biological tests, the latter being the most widely used due to their greater speed and versatility. *In vitro* tests are carried out in places with all the necessary equipment and personnel with sufficient experience to carry them out. There are many factors that can influence the quality of these analytical methods, which must be kept under strict control for approval. For these reasons, the objective of this review is to gather the theoretical bases for conducting *in vitro* assays to quantify the biological activity of cytokines, as well as the factors that influence their quality.

Introducción

Las citoquinas o citocinas son moléculas de bajo peso molecular que poseen la capacidad de modular la función de células y tejidos. Principalmente son producidas por los leucocitos, aunque algunas de ellas son secretadas por otros tipos celulares. Las citoquinas, además de tener un papel fundamental en la respuesta inflamatoria e inmune, están implicadas en numerosos procesos biológicos como la hematopoyesis, embriogénesis y angiogénesis, así como en diferentes procesos celulares como mitosis, diferenciación, migración o incluso muerte celular. Las citocinas también, han sido utilizadas como ingrediente activo para la elaboración de diversos fármacos de gran importancia para el tratamiento de diferentes enfermedades [1, 2, 3].

Los productos biotecnológicos obtenidos utilizando citocinas como ingrediente activo, necesitan contar con una serie de requisitos para ser comercializados, los cuales se comprueban analizando los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFAs) y los Productos Terminados (PT) de dichos fármacos. La cuantificación de la actividad biológica es uno de los parámetros principales para comprobar la calidad de los productos con el fin de permitir su uso clínico y comercialización [4]. Para medir la actividad biológica, se utiliza un gran número de métodos basados en ensayos biológicos [5]. Un paso importante en la realización de estas técnicas consiste en evaluar cuál tipo de ensayo es el más adecuado [6]. Con este objetivo, los analistas deben basarse en consideraciones científicas, económicas, estadísticas y prácticas [4].

Generalmente, los métodos utilizados para el cálculo de la actividad biológica de un producto farmacéutico, son los ensayos *in vitro* basados en líneas celulares establecidas debido a que son más ventajosos y menos variables que los ensayos *in vivo* [7, 8, 9]. Los ensayos *in vitro* se cuantifican mediante diferentes métodos de revelado, de los cuales el más recomendable por su sencillez y bajo costo es el método colorimétrico [10]. Este se basa en añadir un colorante a las células y posteriormente medir la absorbancia mediante un lector espectrofotómetro [11]. Los ensayos biológicos se deben realizar en áreas asépticas que posean las condiciones adecuadas y el personal con la experiencia necesaria para llevar a cabo estas técnicas analíticas [4].

Existen muchos factores que pueden influir negativamente en los resultados de un ensayo *in vitro*, los cuales deben ser estrictamente controlados para obtener resultados verídicos. Entre esos factores se encuentran, las contaminaciones, el diseño de la placa de cultivo y el manejo de las células durante el ensayo. El conocimiento de estos factores y la base teórica sobre las cuales se realizan los ensayos de actividad biológica son recursos necesarios con los que debe contar todo el personal que se incorpora a los laboratorios de control de la calidad en los diferentes centros de producción de fármacos. Existe mucha información sobre estas técnicas analíticas, pero se encuentra muy poco sintetizada y fragmentada en múltiples fuentes bibliográficas [4, 6, 11]. Debido a las razones anteriores, el objetivo del presente estudio es reunir las bases teóricas para la realización de ensayos *in vitro* para cuantificar la actividad biológica de citocinas, así como los factores que influyen en la calidad de estos.

Citocinas como blancos de los ensayos de actividad biológica

Las citocinas son un grupo de proteínas de rápido crecimiento que controlan el mantenimiento y la actividad del sistema inmune [12]. Las cuales presentan un amplio rango de actividad biológica sobre un gran número de tipos de células, sobre las cuales pueden inducir proliferación, diferenciación y maduración (figura 1) [1, 2]. Estas moléculas pueden ser producidas principalmente por células dendríticas y fagocitos mononucleares [1] y actúan en vivo en un gran complejo de proteínas interactuantes para lograr el control del sistema inmune [13]. Diferentes células pueden secretar la misma citocina, y solo una de estas moléculas puede afectar severamente distintos tejidos; esta propiedad es llamada pleiotropía [14].

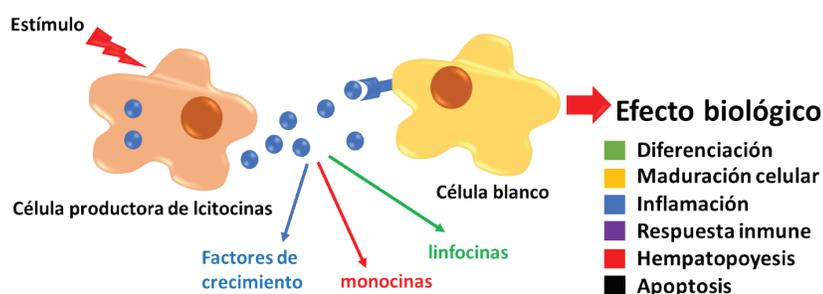


Figura 1. Principales efectos biológicos de las citocinas sobre las células blanco

Estas moléculas frecuentemente actúan en cascadas de señalización; es decir, una citocina estimula a la célula blanco a producir más citocinas, se unen a receptores específicos y activan mensajeros intracelulares que regulan la transcripción de genes [14]. Están involucradas en procesos inflamatorios, responsables de las infecciones [15, 16]. Además, se ha demostrado que son importantes en la patogénesis de muchos desórdenes clínicos y presentan un alto potencial para el tratamiento de un amplio rango de enfermedades [2, 11]. También, se ha demostrado su importancia en la respuesta inmune ante la infección por COVID-19 [17, 18, 19, 20].

Las citocinas pueden ser divididas en clases funcionales; por ejemplo, algunas citocinas son primariamente factores de crecimiento linfocíticos, otras funcionan como proinflamatorias o antiinflamatorias, y muchas otras se encargan de la respuesta inmune ante antígenos [21]. Uno de los grupos de citocinas más utilizados como ingrediente activo en la fabricación de fármacos, son los factores de crecimiento, los cuales son una familia de proteínas que actúan principalmente sobre tejidos no hematopoyéticos [22]. Como las hormonas clásicas, los factores de crecimiento son moléculas relativamente pequeñas, altamente solubles y de estructura compacta [23, 24].

Existen tres familias de factores de crecimiento bien caracterizadas, basadas en su estructura y actividad biológica. La primera familia está representada principalmente por el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas y el Factor de Crecimiento Derivado de Fibroblastos. En la segunda familia se incluye el Factor de Crecimiento Epidérmico y el Factor de Crecimiento Transformante Beta. La última familia, la constituyen los factores de crecimiento tipo insulínicos [25].

¿Qué son los ensayos biológicos?

El desarrollo de materiales biológicos implica la valoración meticulosa de seguridad, eficacia y calidad. La calidad tiene que ser evaluada con el uso de una variedad de técnicas analíticas, inmunológicas y físico-químicas, mientras la seguridad y la eficacia son establecidas a través de estudios de toxicidad y pruebas clínicas [26].

Los ensayos biológicos (EB) son importantes como señalizadores de seguridad, ya que pueden medir la potencia y pueden ilustrar eficacia como una medida directa de actividad biológica [5]. Los EB son técnicas mediante las cuales se puede medir una propiedad de una sustancia por la respuesta que produce en un sistema biológico [8, 27]. Estos ensayos pueden ser de varios tipos: desde ensayos *in vivo* hasta ensayos *in vitro* que utilizan líneas celulares establecidas [11].

Los ensayos *in vivo* pueden proveer información invaluable acerca de la actividad biológica de citocinas, así como también una valoración útil de su potencia biológica [28, 29]. Sin embargo, tales pruebas pueden ser de muy alto costo, implican gran número de animales, y son a menudo imprecisas y trabajosas de realizar [27, 30, 31]. Por tanto, estos métodos han sido mayormente reemplazados por ensayos *in vitro* que requieren cultivos primarios de células o líneas celulares continuas [6, 32].

Ensayos biológicos *in vitro*

Para los ensayos *in vitro*, como consecuencia de su extenso uso, existe un amplio rango de soporte tecnológico disponible y comparados con los ensayos *in vivo*, presentan las siguientes ventajas [13, 31].

- Presentan menor cantidad de variables incontrolables.
- Son más económicos y controlables.
- Se produce menor variabilidad en la respuesta biológica.
- Evitan el uso de animales vivos.
- Presentan mayor capacidad de procesamiento.
- Son más adecuados para la automatización.
- Son más flexibles y rápidos.
- Presentan mayor rango de tecnologías disponibles.

En los ensayos basados en líneas celulares, el sujeto biológico estimulado por el fármaco a evaluar, es un cultivo de células provenientes de líneas celulares establecidas (comerciales) derivadas generalmente de la sangre, médula espinal o tejidos de organismos superiores (cuadro 1) [32].

Cuadro 1. Ejemplos de ensayos de actividad biológica de Citocinas y Factores de Crecimiento basados en el uso de líneas celulares [11].

Citocina	Línea celular	Origen	Tipo de ensayo	Curva dosis respuesta
IL-2	CTLL-2	Células T citotóxica murina	Proliferación celular	0,1 - 20 UI
IFN	Hep-2/ Virus mengo	Carcinoma laríngeo humano/Picornavirus murino	Antiviral	0.1 - 16 UI
IFN	Daudi	Células linfoblastoides humanas	Inhibición de la proliferación celular	1pg – 100 pg
G-CSP	GNFS-60	Leucemia mieloide murina	Proliferación celular	0.4 – 100 UI
TFN	L-929	Fibroblasto murino	Citotoxicidad	0.2 – 4 UI
FCE	3T3 A31	Fibroblasto murino	Proliferación celular	0.1 – 20 UI

La cuantificación de la actividad biológica de citocinas se puede realizar a través de varios tipos de ensayos *in vitro*:

Ensayos de proliferación y anti proliferación celular: son los bioensayos más versátiles basados en líneas de células para la mayoría de las citocinas [33, 34]. En estos métodos, los grados de citocinas son estimados debido a su habilidad para estimular o inhibir la proliferación de las células [6].

Ensayos Antivirales: se basan en un sistema célula-virus donde se evalúa un producto por su capacidad de proteger a las células ante los efectos citopatogénicos del virus empleado. La actividad antiviral potente de algunas citocinas constituye el principio básico de estos ensayos. Los procedimientos involucran la incubación de células susceptibles con citocinas antes la adición de un virus y estimar el incremento en la supervivencia de la célula debido a una reducción en el efecto del virus [35].

Ensayos Citotóxicos: se basan en el efecto citotóxico que posee un producto sobre las células de la línea empleada [36, 37].

Métodos de revelado

En los diferentes tipos de ensayos, es necesario cuantificar, la cantidad de células resultantes debido a la acción de la citocina que se evalúa. Para esto, se utilizan reveladores que pueden ser tinciones o sustancias que provocan reacciones químicas observables en la célula. Los diferentes métodos de revelado se exponen a continuación:

Colorimétrico: es uno de los métodos más utilizados por ser muy práctico y barato [10, 38]. Se emplean diferentes colorantes que se incorporan a las células vivas, las cuales posteriormente se leen en un lector fotométrico a una longitud de onda determinada que depende del colorante empleado [39]. Después de añadido el colorante, se puede apreciar en las placas de 96 pocillos a simple vista, un gradiente de intensidad de color proporcional a la concentración celular, en caso de que se trate de ensayos de factores de crecimiento en los cuales la proliferación celular aumenta por la adición de la citocina [40]. En este tipo de ensayo, la concentración celular que se observa depende de la dosis del fármaco aplicada. En los pocillos de la placa de cultivo, donde se añade una mayor concentración de citocinas, se observa que el color desarrollado es más intenso, en correspondencia con los pocillos donde la concentración es menor (figura 1).

Los reveladores de los ensayos colorimétricos pueden ser: Sal de Tetrazolium (MTT), Alamar Blue, Cristal violeta (CV), Negro amido y Rojo neutro [11].

Radioactivo: en estos ensayos se utiliza timidina tritiada, la cual se incorpora al ADN celular y es leída posteriormente en un contador de radioactividad [41].

Ensayos que utilizan MTT como revelador: uno de los reactivos que más se utilizan para evaluar proliferación celular, es la sal de tetrazolium (MTT). Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 [41] y modificado por Denizot y Lang en 1986 [42]. Durante esta técnica, el MTT es reducida por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color rojo (formazán) (figura 2B). Posteriormente, los cristales de formazán deben ser disueltos con el uso de un solvente [43]. Primeramente, se suponía que la reducción de la sal de tetrazolium solo se debía a los procesos mitocondriales durante la cadena respiratoria, pero actualmente se sabe que también están implicadas las fracciones citoplasmáticas y microsomales [44, 45].

Este método permite determinar la actividad mitocondrial de las células tratadas, de forma que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán reducido. Es una prueba muy sensible y muestra linealidad en un amplio rango de concentraciones [41]. Este revelador implica menos afectaciones durante los ensayos, pues al consistir en una reacción química, no requiere que se deseche contenido de las placas ni que estas sean lavadas, lo cual disminuye la manipulación y la posible pérdida de las células.

Ensayos que utilizan como revelador Cristal Violeta: la técnica de Cristal Violeta se basa en la tinción de las células con una solución de este colorante (figura 2A). Esto nos permite cuantificar mediante un lector espectrofotométrico la densidad óptica (DO) de la placa [46]. Con este método, la manipulación de las células es muy estresante, pues para teñirlas, primeramente,

es necesario desechar el contenido de las placas con lo cual pueden sufrir daños. Después de teñir las placas es necesario el lavado de estas para eliminar los excesos de colorante, proceso que también provoca la pérdida de muchas células.

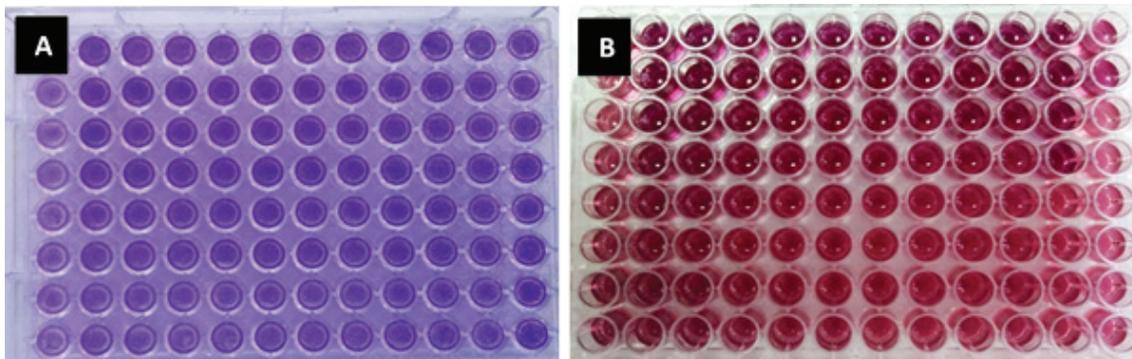


Figura 2. Placas de 96 pocillos reveladas con Cristal Violeta (A) y MTT (B). En este diseño, se colocó una mayor concentración de citocinas en los pocillos superiores, por lo cual se observa una disminución de la proliferación celular en los pocillos inferiores.

Factores que pueden influir en la calidad de los ensayos in vitro basados en líneas celulares

1. Contaminaciones por agentes microbianos

Los ensayos biológicos basados en líneas celulares pueden ser afectados principalmente por contaminación por agentes microbianos como producto de una mala manipulación, lo cual puede ser muy común [47, 48, 49]. Si durante un ensayo aparecen síntomas de contaminación, tanto en los frascos como en las placas de cultivo; es necesario recurrir a un nuevo cultivo celular. Las contaminaciones pueden provocar afectaciones graves en la respuesta de las células y por tanto se obtienen resultados muy variables [50].

2. Diseño de la placa de cultivo

Los ensayos biológicos deben contar con un diseño adecuado de las placas de cultivo porque durante la incubación pueden ocurrir afectaciones en el borde de la placa [47]. Durante su diseño es importante colocar las muestras aleatoriamente, sin utilizar los pocillos del borde. Las afectaciones que ocurren en el borde de la placa durante la incubación se deben al mayor intercambio que sufren estos pocillos con el ambiente de la incubadora y la posición que ocupe la placa dentro de esta [4].

3. Factores relacionados con el manejo de las células

Otros factores que pueden afectar los ensayos biológicos son: el tipo de célula que se utiliza (si son adherentes o no), la descongelación, densidad, confluencia, frasco utilizado en el cultivo, requerimiento de suero, condiciones de cultivo (temperatura, CO₂, humedad, tiempo), conteo de células, determinaciones de salud de la células y estabilidad de la línea celular. También se deben tener en cuenta, la calidad de la muestra a analizar, el diseño del ensayo, la documentación, el personal encargado, el equipamiento y las instalaciones [4].

Por otra parte, la descongelación de las células puede afectar los resultados de un ensayo de actividad biológica, pues constituye un proceso muy drástico [52], esto se debe a que inicialmente, se encuentran almacenadas a temperaturas de -196°C en nitrógeno líquido y

pasan directamente a un baño con 37°C y, por tanto, es inevitable que ocurra muerte celular [54]. En los EB las células deben ser mantenidas con una confluencia menor del 90%. A una confluencia mayor que este valor, muchas células se desprenden por el contacto con células vecinas [40].

En muchos ensayos biológicos para el control de citocinas, se utilizan células de anclaje (se adhieren a la superficie del frasco), por tanto, se necesita una enzima que pueda escindir las proteínas de unión para poder expandir y realizar el conteo. Para esto se utiliza la tripsina, una enzima que rompe enlaces peptídicos en las proteínas de adhesión [50]. Debido a esto, las células quedan en suspensión con una forma redondeada y con diferente morfología (figura 3). Es importante tener en cuenta que, la acción de la tripsina durante un tiempo prolongado de exposición provoca la muerte celular, lo cual crea la necesidad de una buena manipulación de los cultivos para que no ocurran daños morfológicos y detritos celulares [48].

En algunos ensayos de actividad biológica de citocinas, se frecuenta estresar las células antes de añadirle el fármaco para que su respuesta sea óptima. El estrés celular consiste en mantener las células durante 24 horas sin Suero Fetal Bovino (SFB). Durante este proceso, las células sufren porque no se les administra suero, lo cual provoca un cese de la proliferación debido a que este contiene factores de crecimiento necesarios para el crecimiento [50]. Para esto, primeramente, es necesario desechar el medio de mantenimiento de las células y poder administrarles medio sin suero. Durante este paso es necesario eliminar los residuos de SFB mediante lavados con Tampón Fosfato Salino (PBS) o de lo contrario, este puede interferir en la respuesta celular que debe resultar de la adición de los fármacos. Durante este paso, se pierden células que no se encuentran adecuadamente adheridas a la superficie de las placas. Este proceso afecta la concentración celular a la cual deben encontrarse las células en el momento de administrarles los fármacos, lo cual no implica afectaciones en la respuesta proliferativa de las células [11].

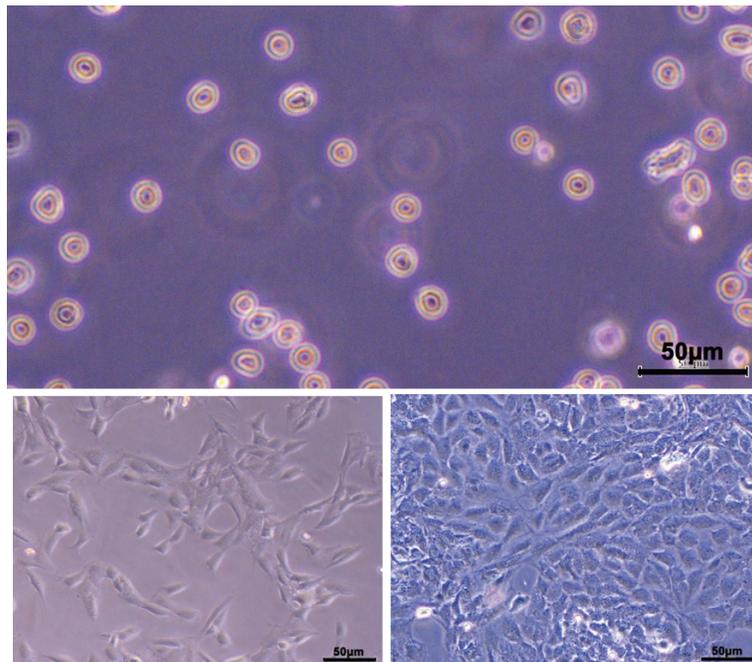


Figura 3. Fibroblastos durante un EB, cultivadas en medio DMEM con SFB al 10%. A: Células en suspensión acabadas de tripsinizar; se observa su forma redondeada. B: Células en cultivo durante 24h con una confluencia celular aproximada del 50%; se observa la forma alargada clásica de los fibroblastos. C: Células en cultivo durante 72h con una confluencia celular aproximada del 90%.

El factor más importante en cuanto a las células, que puede influir en los ensayos basados en líneas celulares es la generación que se utiliza, puesto que, el estado metabólico y la salud de las células tienen gran influencia en los resultados de los ensayos. Cuando se obtienen sucesivas generaciones que se compran de una línea comercial, su respuesta tiende a variar con el número de subcultivos que se realicen [6]. Por tanto, las células necesitan ser renovadas periódicamente por otras que provengan del primer grupo o la calidad del ensayo disminuye. Para asegurar alta calidad de los ensayos es necesario contar con bancos de células originalmente obtenidas, las cuales son congeladas para renovar los cultivos [51]. Cada descongelación no debe ser utilizada por más de tres meses [4].

Bancos de células

Se deben tener en cuenta varias consideraciones en el desarrollo de los bancos de células. El origen de la línea celular, ya sea obtenida del fabricante del producto, o adquirida por un colaborador, institución académica o una colección de cultivos debe tener documentación que detalle la historia de la línea celular, que justifique su aplicación para uso comercial. La propagación también debe ser documentada y descrita en detalle para permitir la recreación de una línea celular similar si fuera necesario. También debe ser documentada información acerca de la línea celular durante el desarrollo de los ensayos [52].

Es necesaria una extensiva caracterización para asegurar la calidad y longevidad del banco de células. Después de que la línea celular haya sido caracterizada, estará lista para crear los bancos y un sistema de bancos debe contener un Banco Primario y Bancos de Trabajo [53].

Banco de Células Primario (BCP): está formado por células bien caracterizadas que se obtienen a partir de la expansión controlada del vial de la casa comercial. Las células se conservan en nitrógeno líquido a -196°C . Estos bancos deben ser cuidadosamente preparados porque muchas células suelen ser sensibles a la criopreservación, descongelación y condiciones de cultivo. También deben ser sometidos a un extenso número de ensayos que permitan asegurar su identificación y caracterización antes de ser utilizados para la validación de estudios o para su uso regular en laboratorios [54].

Banco de Células de Trabajo (BCT): estos bancos se originan a partir de la expansión controlada del BCP. Se conservan igualmente en nitrógeno líquido a -196°C y se emplean en los ensayos biológicos *in vitro*. El tamaño de los bancos depende del crecimiento característico de las células, el número de células requerido para cada ensayo y de la frecuencia con que se realizarán los ensayos [50].

Estándar utilizado en los ensayos de actividad biológica

En los ensayos biológicos debe utilizarse una sustancia de referencia que debe ser un Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) o producto Terminado (PT) de calidad y pureza establecida, cuya potencia biológica ha sido medida en comparación con un estándar primario. A esta sustancia se le llama Material de Referencia (MR).

El MR es un agente crítico en los bioensayos porque de su calidad dependen los resultados de estas técnicas. Presenta propiedades suficientemente bien establecidas, por lo que puede ser utilizado como curva de referencia en la evaluación de un método de medición o para asignar valores a otros materiales [4].

El MR utilizado debe ser de la misma naturaleza de la citocina a ensayar, y necesita ser preparado de ser posible, por los mismos procesos del producto al cual se le desea comprobar su calidad [11]. El estándar se debe mantener bajo condiciones que preserven su potencia durante todo su uso. Hasta el fin del ensayo, el estándar debe ser almacenado bajo condiciones diferentes

al producto a analizar, por ejemplo, a diferente temperatura, en distintos frascos y a diferente formulación. También debe ser recalibrado contra un Material de Referencia Internacional para evaluar la validez de los valores de actividad biológica asignados en la calibración inicial. De esta forma se detectan problemas que podrían determinar la aptitud o no del MR para continuar con su uso [6].

Cálculo de la Potencia biológica

La actividad o potencia biológica son los efectos de una droga sobre un sistema biológico, los cuales pueden ser benéficos o adversos. Generalmente depende de la dosis en la que se aplica el fármaco.

El cálculo de la potencia biológica es el método utilizado para medir la calidad del fármaco en los ensayos de actividad biológica. Este se realiza a partir de los datos que se obtienen en los ensayos biológicos *in vitro*. Todo el análisis se hace mediante métodos estadísticos de Líneas Paralelas (LP). En este tipo de análisis, el título de la muestra se obtiene mediante la comparación de la curva dosis-respuesta de la muestra con la del estándar utilizado (figura 4) [26]. Por la variabilidad inherente de los ensayos biológicos, la potencia no es una medida absoluta y es calculada preferiblemente por la comparación con un MR.

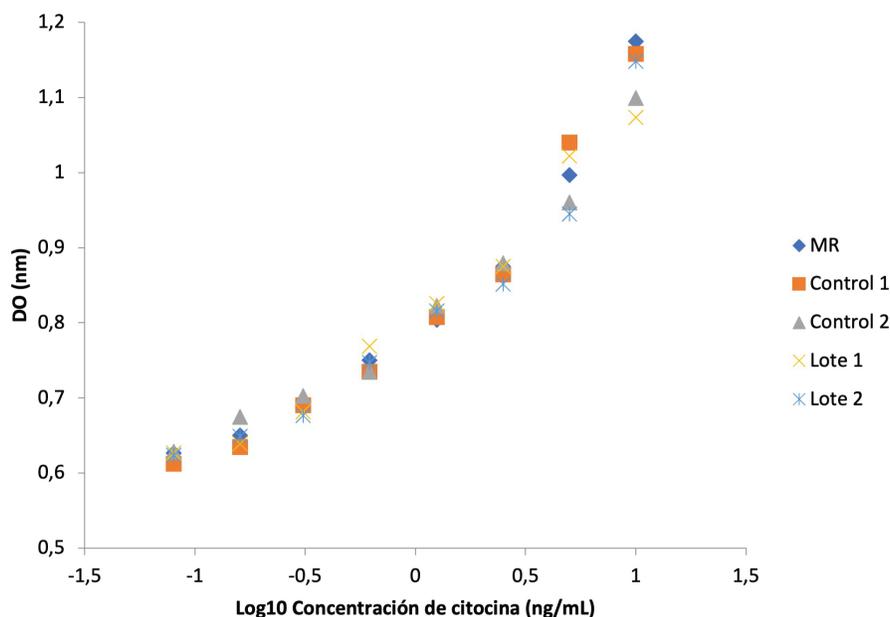


Figura 4. Curva dosis-respuesta obtenida en un EB *in vitro* donde se observa el comportamiento del fármaco (Lote 1 y 2), el Material de Referencia (MR) y Controles Positivos 1 y 2.

Cumplimiento de paralelismo

La prueba de paralelismo es una premisa indispensable para este tipo de cálculo. La muestra a evaluar se debe comportar como si fuese una dilución del MR. Es decir, que la función dosis-respuesta de uno pueda ser considerada como una magnificación del otro [55]. El cálculo de los resultados de cada ensayo consiste en ajustar las funciones logaritmo dosis contra transformación de la respuesta a rectas paralelas. La transformación de la respuesta se realiza para lograr linealizar la función dosis-respuesta [56].

El hecho de que los ensayos cumplan con el paralelismo, significa que los valores de potencia biológica obtenidos para las muestras analizadas puedan ser reportados [4]. El paralelismo es esencial para la validez del ensayo porque implica que la relación entre las dosis que producen un mismo efecto se mantiene constante con la dosis [57, 58]. De no ser así, no se podría definir la potencia, porque sería diferente para cada dosis [55]. El paralelismo mide que la respuesta de la muestra y el MR son iguales excepto por un factor. Eso es lo que se conoce como “Ensayo de Dilución” [4].

El paralelismo se evalúa mediante la comparación de la varianza residual del ajuste a rectas con una pendiente común con la varianza residual del ajuste a rectas con pendientes diferentes. Si las rectas no se apartan significativamente del paralelismo, el aumento de la varianza residual por emplear una pendiente común no será significativo [4]. Esta premisa se basa en la suposición de que tanto las muestras utilizadas como el MR muestran un comportamiento similar, debido a que contienen el mismo analito específico [4]. Por tanto, las curvas dosis-respuesta deben compartir parámetros comunes y solo deben diferenciarse en el desplazamiento horizontal [55]. Si no existiera paralelismo, no se podría interpretar el valor de potencia obtenido, lo que convierte a esta premisa en una condición indispensable para el cálculo de la potencia relativa de una sustancia mediante un ensayo de actividad biológica [4].

El paralelismo se evalúa sólo en el método de líneas paralelas. Para hablar de paralelismo, es necesario que las DO puedan ajustarse en función de la dosis a través de una línea recta, ya sea directamente o después de una transformación. Como la potencia se calcula como la exponencial de la diferencia de intercepto entre las pendientes, la estimación de los límites de confianza sólo será válida si se cumple la linealidad [55].

Cumplimiento de la linealidad

Para determinar si se cumple la linealidad se compara la varianza residual de la regresión con la varianza entre réplica (error puro). Si la varianza residual de la regresión no es significativamente mayor que la varianza entre réplicas, se considera que la regresión es lineal [55].

Por tanto, estos modelos presuponen linealidad de una relación dosis-respuesta. Una característica de los ensayos biológicos es que el comportamiento de la respuesta celular en función de la concentración no es una línea recta, por tanto, los datos obtenidos se deben ajustar mediante una regresión lineal. Una estrategia, para superar esta premisa consiste en seleccionar una región de la curva que sea lineal [4]. Debido a esto, la linealidad es indispensable para que sean válidos los cálculos estadísticos.

Análisis Estadístico

Gráficos de control en los ensayos de actividad biológica

Los gráficos de control constituyen una herramienta para asegurar que los ensayos se mantienen bajo control estadístico. Un requisito indispensable para tomar los ensayos como válidos es que el valor de potencia obtenido para los controles positivos se encuentre entre las ± 3 DS (Desviación estándar) [59]. Otra condición que indica que el ensayo se encuentra bajo control estadístico es el comportamiento de los valores de potencia obtenidos de los controles [4]. Estos se construyen tomando en cuenta los valores de potencia biológica del fármaco evaluado obtenidos en ensayos en años anteriores y comparándolos con los valores actuales. El objetivo principal es asegurarse de que el comportamiento de la actividad biológica del fármaco se encuentra dentro de los límites establecidos (± 3 DS del valor medio reportado)

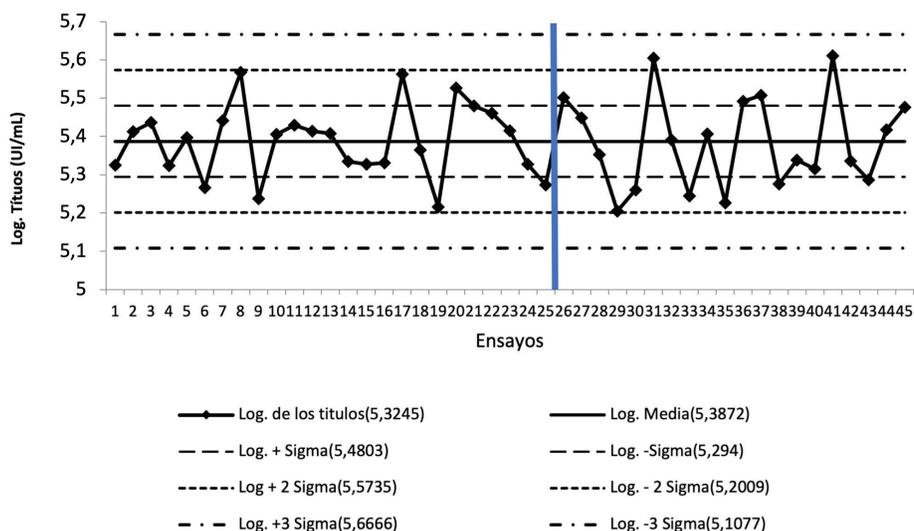


Figura 5. Logaritmo de los valores de potencia obtenidos en los ensayos de actividad biológica para un control positivo. Los valores que se reportan para los primeros 25 ensayos fueron obtenidos durante un tiempo. A partir del ensayo 25 se reportan los valores nuevos.

Conclusiones

- Las citocinas son proteínas con diversas funciones en el organismo, las cuales son utilizadas como ingrediente activo de numerosos fármacos; que antes de ser comercializados deben pasar por una rigurosa revisión de calidad realizada mediante ensayos biológicos *in vitro*.
- En los ensayos biológicos *in vitro*, suelen influir una serie de factores como: contaminaciones, diseño de la placa de cultivo y manejo de las células; los cuales deben mantenerse bajo un estricto control.
- Durante los ensayos *in vitro*, la potencia biológica del fármaco es calculada tomando como base un material de referencia con el mismo ingrediente activo, por lo que se asume que deben seguir el mismo comportamiento.
- Los gráficos de control constituyen una herramienta que permiten visualizar si el comportamiento del fármaco analizado se mantiene entre los umbrales deseados y bajo control estadístico.

Referencias

- [1] S. P. Commins, B. Larry y J. W. Steinke, "Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons and chemokines," *Allergy Clin Immunol J.* 125 (2), 53-72, 2009.
- [2] G. E. Feria, C. A. Leyva, W. Concepción, A. G. Castro y I. S. Larrea, Meza, "Papel de las citoquinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide," *Correo Científico Médico*, 24(1), 2020. <http://www.revcoomed.sld.cu/index.php/cocmed/article/view/3447/1778>
- [3] G. Scapigliati, F. Buonocore y M. Mazzini, "Biological Activity of Cytokines: An Evolutionary Perspective", *Current pharmaceutical design*, 12, 3071-81, 2006.
- [4] United States Pharmacopeia, Design and analysis of biological Assays (111), pp 108-120; (1010) Analytical Data-Interpretation and treatment, pp. 378-388, vol.1. (2014)

- [5] A. Mire-Sluis, y T. Gerrard, "Biological Assays: Their role in the development and Quality control of Recombinant Biological Medicinal Products", *Biologicals*, 24(3-4), 351-362, 1996.
- [6] R. S. Schrock, "Cell-Based Potency Assays: Expectations and Realities", *BioProcessing J.*, 11(3), 4-12, 2012.
- [7] P.Y. Kunz, C. Kienle, M. Carere, N. Homazava y R. Kase, "In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters". *Pharm Biomed. Anal. J.*, 106, 107-115, 2015.
- [8] L. Di, "Effects of Properties on Biological Assays", in: *Drug-Like Properties: Concepts, structure Design, and Methods*, pp 487-496, 2016.
- [9] C. Kienle, R. Kase y I. Werner, "Evaluation of bioassays and wastewater quality: In vitro and in vivo bioassays for the performance review in the Project" "Strategy MicroPoll", Swiss Centre for Applied Ecotoxicology, Eawag-EPFL, Duebendorf, 2011.
- [10] C. Woo, K. M. Park, S. Jun y P. S. Chang, "A reliable and reproducible method for the lipase assay in an AOT/isooctane reverses micellar system: Modification of the cooper-soap colorimetric method", *Food Chemistry*, 182, 236-241, 2015.
- [11] A. Mire-Sluis y L. Page, "Quantitative cell line based bioassays for human cytokines". *J. Immunol. Methods*, 187, 191-199, 1995.
- [12] A. Kumar y R. Sheela, "Longer period of oral administration of aspartame on cytokine response in Wistar albino rats", *Endocrinol Nutr.*, 62(3), 114-122, 2015.
- [13] A. Mire-Sluis y R. Thorpe, "Quantitative biological assays using cytokine responsive cell lines", *J. Immunol. Methods*, 123, 150-175, 1996.
- [14] C. M. Barros, R. K. Sakata, A. M. Issy, L. R. Gerola y R. Salomao, "Cytokines and Pain", *Rev Bras Anestesiol*, 61(2), 255-265, 2011.
- [15] Z. Díaz, M. Rodríguez, J. P. Yáñez, C. Álvarez, C. Rojas, A. Benítez, P. Ciuchi, G. monasterio y R. Vernal, "Variabilidad de la síntesis de citoquinas por células dendríticas humanas estimuladas con los distintos serotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*", *Rev. Clin. Peridonia Implantol. Rehabil. Oral*, 6(2), 57-56, 2013.
- [16] R. Velázquez, G. Gutiérrez, M. Urbán, N. Velázquez, T. I. Fortoul, A. Reyes y A. Consuelo, "Perfil de citosinas proinflamatorias y antiinflamatorias en pacientes pediátricos con síndrome de intestino irritable". *Rev. de Gastroenterología de México*, 80(1), 6-12, 2015.
- [17] G. T. López, M. L. P. Ramírez y M. S. Torres, "Participantes de la respuesta inmunológica ante la infección por SARS-CoV-2", *Alergia, asma e inmunología*, 29(1), 5-15, 2020.
- [18] U. Solis y J. P. Martinez, "Opciones terapéuticas al síndrome de liberación de citocinas en pacientes con la COVID-19". *Revista Cubana de Medicina Militar*, 49(3), e0200783.
- [19] M. M. Katsicas, "Tormenta de citoquinas y tormenta de información asociadas a COVID-19: consideraciones sobre el síndrome inflamatorio multisistémico en niños", *Arch Argent Pediatr*, 119(1), 4-5, 2021.
- [20] L. M. Filgueira, J. B. Cervantes, O. A. Lovelle, C. Herrera, C. Figueredo, J. A. Caballero, et al., "An anti-CD6 antibody for the treatment of COVID-19 patients with cytokine-release syndrome: report of three cases", *Immunotherapy*, 13(4), 289-95, 2021.
- [21] C. A. Dinarello, "Historical insights into cytokines". *Eur J. Immunol.* 37: 34-45, 2007.
- [22] F. G. Khallaf, E. O. Kehinde y A. Mostafa "Growth factors and cytokines in patients with long bone fractures and associated spinal cord injury", *J. of Orthopaedics*, 13(2), 69-75, 2016.
- [23] R. A. Brashaw, R. Fujii, H. Hondemarck, S. Raffioni, Y. Wu y M. A. Yarski, "Polypeptide growth factors: Structure, function and mechanism of action", *Pure & Appl. Chem.*, 66 (1), 9-14, 1994.
- [24] L. A. Díaz, Concheiro, C. Álvarez y C. A. García, "Growth factors delivery from hybrid PCL-starch scaffolds processed using supercritical fluid technology", *Carbohydrate Polymers*, 142, 282-292, 2016.
- [25] C. M. G. Silva, S. V. Castro, L. R. Faustino, C. Q. Rodríguez, I. R. Brito, R. Rossetto, M. V. A. Saraiva, C. C. Campello, C. H. Lobo, C. E. A. Souza, A. A. A. Moura, M. A. M. Donato, C. A. Peixoto y J. R. Figueiredo, "The effects of epidermal growth factor (EGF) on the in vitro development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles", *Research in Veterinary Science*, 94 (3), 453-461, 2013.
- [26] H. Gerónimo, "Establecimiento y Validación de Ensayos de Actividad Biológica para factores de crecimiento y citocinas, aplicados a la producción de Heberprot-P, IL-2 e IL-15", Tesis de maestría, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 2009.

- [27] D. Li, R. Zang, S. T. Yang, J. Wang y X. Wang, "Cell-based high-throughput proliferation and cytotoxicity assays for screening traditional Chinese herbal medicines", *Process Biochemistry*, 48(3), 517-524, 2013.
- [28] A. Jain, R. Jain y S. Jain, "Purification and Bioassay of Interleukin-1 and Interleukin-2 (IL-1 and IL-2)", in: *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*, Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY, 2020. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_26.
- [29] M. Walz, C. Höflich, C. Walz, D. Ohde, J. Brenmoehl, M. Sawitzky, A. Vernunft, U. K. Zettl, S. Holtze, T. B. Hildebrandt, et al., "Development of a Sensitive Bioassay for the Analysis of IGF-Related Activation of AKT/mTOR Signaling in Biological Matrices", *Cells*, 10(482), 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10030482>.
- [30] F. Pujol, N. Vigués, A. Guerrero, S. Jiménez, D. Gómez, M. Fernández, J. Bori, B. Valles, M. C. Riva, X. Muñoz y J. Mas, "Paper-based chromatic toxicity bioassay by analysis of bacterial ferricyanide reduction", *Analytica Chimica Acta*, 910, 60-67, 2016.
- [31] C. Darne, C. Coulais, F. Terzetti, C. Fontana, S. Binet, L. Gaté y Y. Guichard, "In vitro comet and micronucleus assays do not predict morphological transforming effects of silica particles in Syrian Hamster Embryo cells". *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 796, 23-33, 2016.
- [32] F. A. Groothuis, M. B. Heringa, B. Nicol, J. L. M. Hermens, B. J. Blaauboer y N. I. Kramer "Dose metric consideration in in vitro assays to improve quantitative in vitro-in vivo dose extrapolations", *Toxicology*, 332, 30-40, 2015.
- [33] S. Wang, J. M. M. J. G. Aarts, N. M. Evers, A. A. C. M. Peijnenburg, I. M. C. M. Rietjens y T. F.H. Bovee, "Proliferation assays for estrogenicity testing with high predictive value for the in vivo uterotrophic effect", *J. Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 128 (3-5), 98-106, 2012.
- [34] G. Eisenbrand, B. Pool-Zobel, V. Baker, M. Balls, B. J. Blaauboer, A. Boobis, A. Carere, S. Kevekordes, J. C. Lhuguenot, R. Pieters, J. Kleiner, "Methods of in vitro toxicology", *Food and Chemical Toxicology*, 40, 193-236, 2002.
- [35] S. Rubinstein, P. C. Familletti y S. Pestka, "Convenient assay for interferons", *J. Virol.*, 37, 755-758, 1981.
- [36] J. H. Fentem, "The use of human tissues in in vitro toxicology, Summary of general discussions", *Human Experimental Toxicology*, 13(2), 445-449, 1994.
- [37] M. Repetto, "*Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*", Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group, Tercera edición, pp.303-305, 2002.
- [38] P. Liu, K. Zhang, R. Zhang, H. Yin, Y. Zhou y S. Ai, "A colorimetric assay of DNA methyltransferase activity based on the keypad lock of duplex DNA modified meso-SiO₂@Fe₃O₄", *Analytica Chimica Acta*, 920, 80-85, 2016.
- [39] L. Ramírez y L. Lozano, "Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología Principios físicoquímicos de los colorantes", *Nova*. 18, 2020. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>.
- [40] S. A. Aaronson y G. J. Todaro, "Development of 3T3-like lines from BALB/c mouse embryo cultures. Transformation susceptibility to SV-40", *J. Cell Physiol.*, 72, 141-148, 1968.
- [41] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay", *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63, 1983.
- [42] F. Denizot y R. Lang, "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability", *J. Immunol. Methods*, 89, 271-277, 1986.
- [43] N. Diaz, A. Nicolau, G. S. Carvalho, M. Mota y N. Lima, "Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants", *J. Basic Microbiol.*, 39(2), 103-108, 1999.
- [44] C. Y. Sasaki y A. Passniti, "Identification of anti-invasive but noncytotoxic chemotherapeutic agents using the tetrazolium dye MTT to quantitative viable cells in matrigel", *Bio-Techniques*, 24, 1038-1043, 1998.
- [45] M. S. Quesada, "Determinación de la actividad antioxidante y el efecto citotóxico sobre líneas celulares tumorales de un extracto rico en polifenoles del fruto *Bactris guineensis*", Tesis de Maestría. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica, 2020.
- [46] T. Gessner y U. Mayer, "Triarylmethane and Diarylmethane Dyes", *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th ed, 2002.
- [47] D. A. Joelsson, "Practical Guide to Design of Experiments (DOE) for Assay Developers", 2012.
- [48] R. I. Freshney, "Culture of Animal cells Freshney: A manual of Basic Technique and Specialized Applications", 163 pp, 2010.
- [49] S. Coecke, M. Balls, G. Bowe, J. Davis, G. Gstraunthaler, T. Hartung, R. Hay, O. W. Merten, A. Price, L. Schechtman, G. Stacey y W. Stokes, "Guidance on Good Cell Culture Practice", *ATLA*, 33, 261-287, 2006.

- [50] G. Stacey, "Cell lines used in the manufacture of biological products, in *Encyclopedia of Cell Technology*", Spier, R., Ed., Wiley Interscience, New York, pp. 79–83, 2000.
- [51] N. Rieder, H. Gazzano-Santoro, M. Schenerman, R. Strause, C. Fuchs, A. Mire-Sluis y L. D. McLeod, "The Roles of Bioactivity Assays in Lot Release and Stability Testing", *BioProcess International*, 8(6), 33-42, 2010.
- [52] G. Stacey, "Fundamental Issues for Cell-Line Banks in Biotechnology and Regulatory Affairs", *Cell Biology*, NIBSC, South Mimms, UK, 2004.
- [53] R. J. Hay, "ATCC Quality controls methods for cell lines". American Type Culture collection, Rockville MD, 1985.
- [54] G. N. Stacey y A. Doyle, "Cell banking, in *Encyclopedia of Cell Technology*", Spier, R., Ed., Wiley Interscience, New York, pp. 293–320, 2000.
- [55] D. J. Finney, "Statistical Methods in Biological Assays", Ed. Griffin, 1964.
- [56] A. Rosso, "Statistical analysis of experimental designs applied to biological assays", Master thesis, School of Economics and management, 2010.
- [57] D. M. Rocke, "Design and analysis of experiments with high throughput biological assay data", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15, 703, 2004.
- [58] D. Lansky, "Strip-Plot Designs, Mixed Models, and Comparisons Between Linear and Nonlinear Models for Microtitre Plate Bioassays in the Design and Analysis of Potency Assays", *Dev. Biol*, 107, 11–23, 2002.
- [59] C. P. Quesenberry, "The effect of sample size on estimated limits for and X control charts", *J. Quality Technology*, 25(4), 237-247, 1993.