

Evaluación de la línea celular TF1 como biomodelo para estimar la actividad biológica de la NeuroEPO

TF-1 Cell Proliferation Assay for estimating Bioactivity of NeuroEPO

Beatriz María Cruz Yero^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-3147-8798>

Adianez Ge Vega¹ <https://orcid.org/0009-0004-7435-1396>

Mercedes Cedeño Arias¹ <https://orcid.org/0000-0001-7207-2132>

Vladimir Peña Sánchez¹ <https://orcid.org/0009-0005-3179-627x>

Teresita Rodríguez¹ <https://orcid.org/0000-0002-2918-4267>

¹Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: beatrizm@cim.sld.cu

RESUMEN

Numerosos estudios reportan que en el cerebro se produce una regulación positiva de EPO/REPO, por ejemplo, tras una lesión cerebral, lo que estimuló a los investigadores a explorar desde el principio el potencial neuroprotector y neuroregenerativo de este factor de crecimiento. Una nueva formulación nasal que contiene una EPO recombinante no hematopoyética (NeuroEPO) con acción neuroprotectora en diferentes modelos preclínicos. NeuroEPO protege a las neuronas de los mecanismos que promueven la muerte celular, incluido el estrés

oxidativo, la excitotoxicidad, la inflamación, la apoptosis y el déficit cognitivo en modelos de enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, la actividad biológica del producto no se ha evaluado en modelos *in vitro*. Este trabajo tiene como objetivo diseñar y desarrollar un método *in vitro* para medir la actividad biológica de la NeuroEPO utilizando la línea celular TF1. Para ello, se evaluó primero la expresión del REPO en la línea celular y posteriormente se determinó la proliferación celular en presencia de citocinas (GM-CSF y NeuroEPO) mediante tinción con azul tripán y el índice de proliferación con la proteína Ki-67 mediante citometría de flujo. Se demostró que la línea celular TF1 expresa el REPO y es un modelo *in vitro* adecuado para evaluar la actividad biológica de la NeuroEPO.

Palabras clave: NeuroEPO; neurogeneración; neuroprotección; bioensayo

ABSTRACT

Considerable upregulation of EPO/EPOR in brain occurs for instance upon brain injury, which stimulated researchers early to explore the neuroprotective and neuroregenerative potential of this growth factor. A new nasal formulation containing a non-hematopoietic recombinant EPO (NeuroEPO) has demonstrated neuroprotective actions in different preclinical models. NeuroEPO has a neuroprotective effect by positive modulation of the expression of antioxidant enzymes, a neurotrophic activity, an antiapoptotic action and an anti-inflammatory effect. However, the biological activity of the product has not been evaluated in *in vitro* models. In this work we aim to demonstrate that the TF1 cell line is an appropriate biomodel to evaluate the biological activity of the molecule. To do this, the expression of EPOR in the cell line was evaluated and then subsequently the cell proliferation in the presence of cytokines (GM-CSF and NeuroEPO) using trypan blue staining and the proliferation index with the Ki67 protein by flow cytometry

were determined. In addition, cell proliferation was also measured using a colorimetric assay with Alamar Blue. The TF1 cell line was shown to express EPOR and it is a suitable *in vitro* model to evaluate the biological activity of NeuroEPO.

Keywords: NeuroEPO; neurogeneration; neuroprotection; bioassay.

Recibido: 08/04/2025

Aceptado: 23/06/2025

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas como la neuroinflamación, los trastornos neurodegenerativos y los tumores cerebrales son un problema real de la neurología moderna.⁽¹⁾ La prevalencia global de las enfermedades cerebrales humanas, está estrechamente asociada con el desarrollo de la neuroinflamación y los trastornos neurodegenerativos. En el uso clínico y en la investigación en neurociencia se busca una solución para un diagnóstico eficaz, pero aún no se identifica un tratamiento profiláctico para contrarrestar estas patologías de larga duración.⁽²⁾

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína inicialmente identificada como una hormona sintetizada y secretada por el riñón que regula la eritropoyesis.⁽²⁾ Muchos estudios experimentales muestran que la EPO tiene una acción neuroprotectora en el cerebro.⁽³⁾ En trastornos neurológicos agudos y crónicos esta molécula tiene efectos neuroprotectores, particularmente en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y en accidentes cerebro vasculares.⁽²⁾

El uso de la Eritropoyetina humana recombinante (EPO-hr) en el tratamiento de enfermedades neurológicas requiere dosis muy elevadas y una aplicación prolongada, de manera que probablemente produzca un aumento del hematocrito y la viscosidad de la sangre, conduciendo finalmente a eventos cardiovasculares graves como infarto o accidente cerebrovascular.^(3,4) Debido a esto, en la actualidad, se evalúan diferentes derivados de la EPO que presenta actividad neuroprotectora contra la lesión neuronal pero sin actividad eritropoyética.⁽²⁾

En este contexto, el Centro de Inmunología Molecular (CIM) desarrolló la NeuroEPO, una variante hiposialilada de la EPO.⁽⁵⁾ La actividad biológica de esta molécula se ha evaluado en diferentes modelos experimentales en animales. Sin embargo, estos estudios suelen ser muy variables y costosos por lo que contar con un ensayo de actividad biológica *in vitro* resulta de vital importancia para el control de la calidad de este producto y es una de las exigencias de las agencias regulatorias a nivel internacional.

En el año 1989, se identificó que la línea celular TF1 expresa el receptor de la Eritropoyetina (REPO).⁽⁴⁾ Por lo tanto, el Laboratorio de Control de la Calidad de EPOVAC (CIM), se propuso como objetivo:

Evaluar la línea celular TF1 como biomodelo para estimar la actividad biológica *in vitro* de la NeuroEPO.

Métodos

Descripción de las muestras y Material de referencia

En el estudio se evaluaron 12 lotes de Producto Final (PF) del año 2023 y 3 lotes de Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) de NeuroEPO del año 2024. Todos los lotes provenientes del CIM.

Como estándar para identificar y evaluar la pureza de los productos finales desalados, se empleó el Material de Referencia de Trabajo (MRT) de NeuroEPO, producido y caracterizado en el CIM.

Línea celular

La línea celular TF1 (CRL-2003TM, proveniente de un paciente con eritroleucemia de 35 años de edad) dependiente de citocinas. Estas células se cultivaron con medio RPMI-1640 (Gibco, Reino Unido) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Reino Unido) al 10 %, 2 µM de L-Glutamina y a una concentración de 5 ng/mL del Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, *del inglés*, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor). El medio se cambió cada 48 horas por medio fresco. Las células se sembraron a una densidad de $0,4 * 10^6$ cell/mL en un volumen final de 20 mL en frascos de 75cm² y se mantuvieron en la incubadora a 37°C (Binder, China) con atmósfera húmeda al 5 % de CO₂.

Citometría de flujo para evaluar la expresión del receptor de la Eritropoyetina en la línea celular TF1

Para los ensayos de citometría de flujo (FACS, *por sus siglas en inglés*, fluorescence activated cell sorter) se empleó un citómetro Gallios (Beckman Coulter, EUA). Las muestras se caracterizaron en cuanto a la intensidad media de fluorescencia (IMF) emitida por el fluoróforo, la granularidad o complejidad interna y el tamaño celular. Estos dos últimos parámetros están dados por la dispersión lateral (SSC, *por sus siglas en inglés*, side scatter) y frontal (FSC, *por sus siglas en inglés*, forward scatter)

del láser, respectivamente. Los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo versión 7.6.1 (Tree Star, EUA).

Para evaluar la expresión del Receptor de la Eritropoyetina (REPO) en la línea celular TF1, las células se cultivaron con 5 ng/mL de GM-CSF, durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, las células se lavaron con PBS1X y se incubaron 0,2x10⁶ células/pozo con la NeuroEPO/EPO conjugada al fluoróforo FITC, durante 30 minutos, a 4° C. A continuación, se lavaron con 200 µL de PBS1X en un lavador de placas y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Despues del lavado las células se resuspendieron en 300 µL de Formaldehido al 1% y se filtraron en una malla de 30-50 µm antes de la lectura en el clímetro.

Para evaluar si el tratamiento con otras citocinas influye en la expresión del Receptor de la Eritropoyetina (REPO) en la línea celular TF1, las células se cultivaron con GM-CSF (5ng/mL) y la NeuroEPO/EPO (1µg/mL), durante 48 horas en iguales condiciones de cultivo. Pasado este tiempo, las células se lavaron con PBS1X y luego, se incubaron 0,2x10⁶ células/pozo con la NeuroEPO/EPO conjugada a FITC, durante 30 minutos, a 4° C. Posteriormente, se lavaron con 200 µL de PBS1X en un lavador de placas y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Despues del lavado las células se resuspendieron en 300 µL de Formaldehido al 1% y se filtraron en una malla de 30-50 µm para su lectura en el clímetro.

Desalinización de los productos finales de NeuroEPO

Los lotes de producto final de NeuroEPO se desalaron con una columna HiTrapTM de 5mL. La columna se equilibró con 25 mL de agua. Luego se pasó 1 mL de cada muestra y seguido 0,5 mL de agua. Posteriormente se eluyó con 2 mL de agua. El factor de dilución, siguiendo el protocolo del fabricante, fue de 1:1 (v:v). La concentración del volumen final colectado se determinó en un espectrofotómetro

de absorción molecular (Ultrospec 9000), mediante densidad óptica (DO), a una longitud de onda de 280 nm y un coeficiente de extinción molar de 1,345. La concentración se calculó empleando la Ley de Lambert-Beer.

Para evaluar la pureza de las muestras desaladas se realizó una cromatografía de exclusión molecular y una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a algunos de los lotes previamente seleccionados (lotes: 3, 4, 5, 6, 9 y 10).

Cromatografía de exclusión molecular

Se analizó la pureza de la molécula de NeuroEPO a través de una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, *por sus siglas en inglés*, Hight Performance Liquid Chromatography) por exclusión molecular utilizando el Tampón Fosfato 1X como fase móvil y un IFA de EPO como muestra control. Se inyectó a la columna una masa de 30 µg de cada muestra y se realizó la lectura usando un detector UV-vis a una longitud de onda de 214nm.

Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La pureza de las muestras de NeuroEPO desaladas se evaluó también por una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, *por sus siglas en inglés*, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) en condiciones no reducidas. Para ello, se utilizó un gel al 12 % de poliacrilamida. Las muestras se prepararon a una concentración de 0,25 mg/mL utilizando el tampón de la muestra 2X (BioRad, EUA) y se calentaron a una temperatura de 100 °C durante 2 minutos. Se aplicaron 7,5 µg de cada muestra y 10 µL del patrón de peso molecular Precision plus protein standars- Unstained (Biorad, EUA), con un rango de 10 a 250 kDa (BioRad, EUA). La corrida electroforética se realizó a un voltaje constante de 80 V durante el paso de las muestras por el gel concentrador y se continuó la corrida a 120 V, utilizando una

fuente (Bio-RAD, EUA) y una solución de corrida consistente en Tris 25 mM/ Gly 192 mM/ SDS 0,1% con un pH de 8,3 (Bio-RAD, EUA).

Una vez terminada la corrida se retiró el gel y se sumergió en una solución de tinción de azul de Coomassie y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Pasado este tiempo se retiró la solución de tinción y se adicionó la solución de destinción, hasta observar las bandas de proteína y el resto del gel transparente.

Proliferación celular de las células TF1 usando el método de exclusión con Tripán azul

La proliferación y la viabilidad de las células TF1 se evaluaron mediante el método de exclusión con Tripán azul. Las células previamente cultivadas con medio suplementado con GM-CSF, se lavaron dos veces con medio, para eliminar el GM-CSF del cultivo. Luego, las células se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 6×10^5 células por pozo con medio suplementado con 15 ng de GM-CSF, 3 μ g de NeuroEPO o medio sin citocina. Como control positivo se usó las células cultivadas con el GM-CSF y como control negativo del ensayo se utilizó las células cultivadas en medio sin citocina. Las placas se incubaron a 37°C con atmósfera húmeda al 5 % de CO₂, durante 48 horas. Posteriormente, se procedió a determinar la viabilidad y la densidad celular mediante el método de exclusión con Tripán azul (BioRad, EUA), utilizando el microscopio de campo invertido (Labovert FS, Alemania).

Índice de proliferación Ki-67

Para determinar el índice de proliferación Ki-67 se sembró una placa de 6 pozos bajo las mismas condiciones descritas en el acápite anterior (acápite 2.6). Las placas se incubaron a 37°C con atmósfera húmeda al 5 % de CO₂ por 72 horas. Una vez transcurrido este tiempo las células se pasaron a tubos de citometría (por

duplicado) y se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min. Posteriormente las células se fijaron con formaldehído al 0,5 % durante 20 min a 4°C. Luego de un paso de centrifugación las células se permeabilizaron con 0,1 % de Tritón X100 en tampón de PBS-BSA al 1 %, por 3 minutos en hielo. Rápidamente se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron. Luego se incubaron con el anticuerpo de ratón anti-Ki-67 Humano (Dako, Dinamarca) diluido 1:50 en PBS-BSA al 1 %, durante 30 minutos a 4°C. Pasado este tiempo las células, se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron. Seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC (Dako, Dinamarca) diluido 1:60 en PBS-BSA al 1 % por 30 minutos a 4°C. Finalmente las células se lavaron con PBS 1X, se centrifugaron y se resuspendieron en 200 µL de PBS 1X. Previo a la lectura en el clímetro las células se filtraron con una malla de 30-50.

Resultados y Discusión

La actividad biológica de la NeuroEPO ha sido evaluada en diferentes modelos *in vivo*.⁽⁶⁾ Esta metodología resulta muy costosa, requiere un mayor tiempo de experimentación y plantea consideraciones éticas más complejas en comparación con los métodos *in vitro*. Los bioensayos *in vitro* permiten evaluar la seguridad y la eficacia de una gran variedad de sustancias, y se rigen por el principio de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento), lo que los hace ampliamente utilizados en los Sistemas de Calidad.⁽⁷⁾

A pesar de que la literatura contiene numerosos estudios sobre la actividad proliferativa y la viabilidad de las células TF1 en presencia de EPO-hr, no existen bioensayos *in vitro* descritos para evaluar la actividad biológica de la NeuroEPO, que es una forma hiposialilada de la EPO, sin actividad hematopoyética.⁽⁵⁾ Lo que

reafirma la importancia de evaluar esta línea como posible biomodelo para estimar la actividad biológica de la NeuroEPO.

Expresión del receptor de la Eritropoyetina en la línea celular TF1

Para poder evaluar la línea celular TF1 como biomodelo para estimar la actividad biológica de la NeuroEPO, resultó fundamental corroborar la expresión del REPO en la línea celular TF1. Las TF1 son células humanas provenientes de la médula ósea de un paciente con eritroleucemia.⁽⁸⁾ Esta línea celular requiere del suplemento del GM-CSF, la Interleucina 3 (IL-3) o la EPO para su supervivencia y proliferación.⁽⁴⁾

La expresión del REPO en la línea celular TF1, se determinó mediante ensayos de citometría de flujo. Para ello, se utilizaron las células cultivadas previamente con GM-CSF, las cuales se incubaron con NeuroEPO/EPO conjugada a FITC. La utilización de la molécula conjugada permitió una detección eficiente y sensible, facilitando la identificación de las células que expresan el receptor. Los resultados obtenidos en la citometría de flujo se muestran en la figura 1A.

El REPO fue identificado en la línea celular TF1 por Kitamura *et al.* en 1989.⁽⁴⁾ Estudios posteriores de Winckelman en 1992⁽⁹⁾, Grossi *et al.* en 1998⁽¹⁰⁾ y Mulcahy en 2001⁽¹¹⁾ corroboraron la presencia del REPO en esta línea celular, y estudiaron aspectos funcionales como los mecanismos de acción relacionados con la proliferación celular mediados por la activación del receptor. Investigaciones más recientes brindan información adicional sobre la expresión del REPO en células hematopoyéticas. Lee *et al.* en 2022 realizaron un análisis integral de la expresión del REPO durante la diferenciación eritroide. Su estudio proporcionó una visión detallada de como varía la expresión del REPO a lo largo de las distintas etapas de la eritropoyesis, revelando su impacto en la proliferación celular. Este estudio

destacó que la expresión del REPO es crucial en la proliferación de las células hematopoyéticas.⁽¹²⁾

Como se puede observar en la figura 1A, se comprobó que la línea celular TF1 cultivada con GM-CSF expresa el REPO. Tanto las células incubadas con EPO como con NeuroEPO mostraron una positividad superior al 65 % en su reconocimiento y una IMF de 2,46 para la EPO y 1,99 para la NeuroEPO.

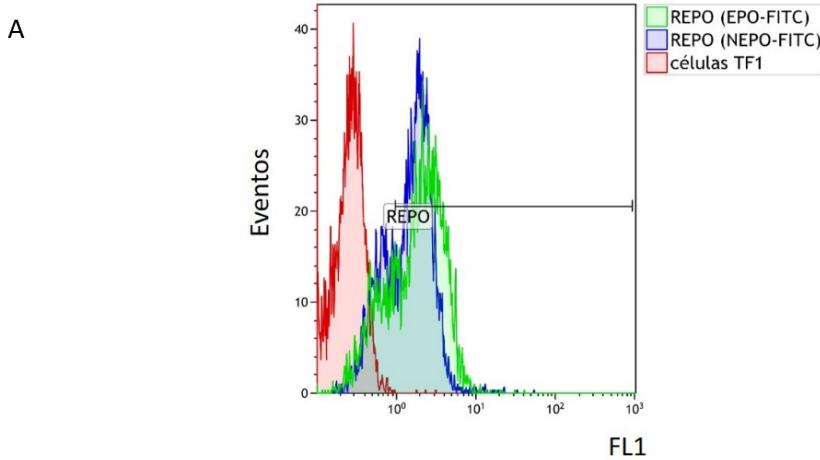
Luego de confirmar que las TF1 expresan el REPO, se evaluó la influencia del pretratamiento de estas células con la NeuroEPO y la EPO, en la expresión de este receptor. Esta evaluación se realizó para comprobar si el pretratamiento de las células con las diferentes citocinas modula la expresión del REPO y poder establecer las condiciones de cultivo para el ensayo. Debido a que existen estudios que demuestran que la expresión del REPO en esta célula está influenciado por la citocina con la que se cultiva y es dependiente del tiempo de incubación.^(4,9)

Para llevar a cabo este ensayo, las células TF1 se cultivaron por 48 horas con GM-CSF, NeuroEPO, EPO y medio sin citocinas. Posteriormente, las células TF1 se incubaron con la NeuroEPO conjugada y luego se determinó la expresión del receptor por citometría de flujo. En la figura 1B se puede observar que todos los tratamientos mostraron porcentajes de reconocimiento superior al 99% y una IMF muy similar. Esto indica que la expresión del REPO en esta línea celular no es modulada diferencialmente por estas citocinas, en al menos 48 horas de cultivo.

Resultados similares fueron reportados por Kitamura *et al.* en 1989, quienes, demostraron que las células TF1 son dependientes de factores de crecimiento hematopoyéticos como: la EPO-hr, el GM-CSF y la IL-3. Pero que el cultivo de estas células durante 24 horas, en presencia de la IL-3 o el GM-CSF no modulaba la densidad de REPO expresados en la membrana celular.⁽⁴⁾

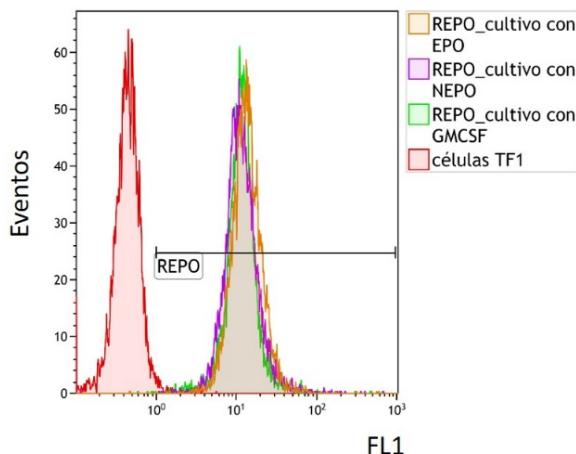
Sin embargo, el corto tiempo de incubación utilizado en los experimentos de Kitamura *et al.* podría no haber sido suficiente para detectar un aumento en la expresión del REPO. Para investigar esta hipótesis, Grossi *et al.* en 1998, cultivaron las células TF1 en presencia de la IL-3 y la EPO-hr durante 5 días. Estos encontraron que durante este período de incubación la EPO-hr aumentó el número de células que expresaban el receptor y los sitios de unión por célula.⁽¹⁰⁾ Lo que nos puede indicar que pasada las 48 horas de cultivo podría evidenciarse un aumento en la expresión del REPO.

Por tanto, no es necesario un tratamiento previo de las células TF1 con NeuroEPO o EPO para favorecer la expresión del REPO, en al menos 48h. Esto nos permite seleccionar el GMCSF como suplemento para el cultivo de la línea, conociendo además que este estimula un crecimiento indefinido, mientras que la EPO solo permite el crecimiento por períodos cortos de hasta 8 días de cultivos. ⁽¹³⁾



Muestra	% Rec.	IMF
Células TF1	0,97	3,35
REPO (EPO)	63,61	4,44
REPO (NeuroEPO)	94,53	5,91

B



Muestra	% Rec.	IMF
Células TF1	1,76	1,36
Cultivo con EPO	100	12,58
Cultivo con NeuroEPO	99,98	10,86
Cultivo con GMCSF	99,92	11,17

Fig. 1- Expresión del receptor de la EPO en la línea celular TF1. (A)Células cultivadas con GM-CSF (5ng/mL). (B) Células cultivadas con GM-CSF (5ng/mL) y EPO/NeuroEPO (1 μ g/mL) por 48 h previas a la citometría. En ambos casos se incubaron 0.2×10^6 células TF1 con NeuroEPO/EPO conjugada al fluoróforo FITC.

Ánálisis de la proliferación y viabilidad de línea celular TF1 cultivada con NeuroEPO

Método de exclusión con Tripán azul

La viabilidad y la proliferación son dos características distintas de las células. La viabilidad se refiere al estado funcional de las células, medido por el número de células vivas en una población, mientras que, la proliferación se centra en el proceso de la división celular. Es importante tener en cuenta que no todas las

células viables se dividen. Aunque la proliferación puede interpretarse fácilmente como viabilidad, su ausencia no debe interpretarse automáticamente como un signo de muerte celular.⁽¹⁴⁾

El Tripán azul es uno de los varios colorantes recomendados para utilizar en procedimientos de exclusión de colorantes con el fin de contar células viables. Este método se basa en el principio de que las membranas plasmáticas intactas de células vivas (viables) excluyen el colorante, mientras que en las células muertas (no viables) si penetra el colorante. Esta tinción también proporciona información sobre la morfología celular.⁽¹⁵⁾

La viabilidad y proliferación de la línea celular TF1 cultivadas con IFAs y PF de NeuroEPO, se evaluó utilizando el método de exclusión de Tripán azul. Como control positivo se usaron las células que fueron cultivadas con GM-CSF, ya que estas células son dependientes de esta citocina.⁽¹⁶⁾ Las células cultivadas sin citocinas se usaron como control negativo.

El PF fue desalado previo al ensayo debido al alto contenido de polisorbato 80 que presenta en su formulación, lo que podría influir negativamente en los resultados del ensayo. Debido a que, el polisorbato 80 es un surfactante no iónico, conocido por su capacidad de estabilizar emulsiones, pero también es considerado un agente de lisis celular.⁽¹⁷⁾

Una vez desalados los PF, se evaluó la pureza de las muestras por cromatografía de exclusión molecular y por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (figura 2), para comprobar que estas eran idóneas para realizar el ensayo de actividad biológica.

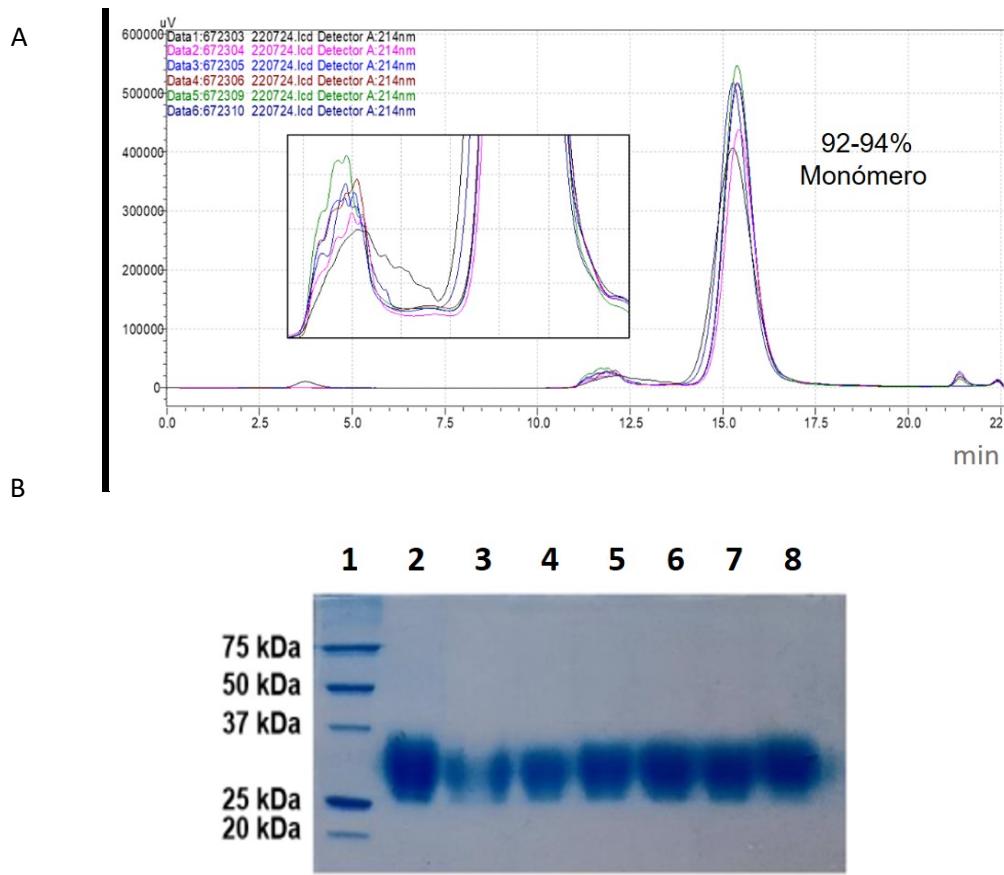


Fig. 2- Pureza de las muestras de PF desalados. (A) Perfil cromatográfico obtenido mediante la cromatografía por exclusión molecular. Se inyectó a la columna una masa de 30 µg de cada muestra. La lectura se realizó usando un detector UV-visible a una longitud de onda de 214nm. (B) Perfil electroforético de la NeuroEPO. SDS-PAGE en gel de 12 % de poliacrilamida, en condiciones no reducidas. Los carriles representan: 1. PPM, 2. MRT de NeuroEPO, 3-8. PF desalados.

En la figura 2A se muestra el perfil cromatográfico obtenido para los productos finales de la NeuroEPO. Se puede observar que todos los lotes presentan un pico de mayor intensidad que corresponde a la forma monomérica de la proteína con una pureza entre 92 y 94 %. Por otra parte, el perfil electroforético (figura 2B), muestra una banda correspondiente a un peso molecular relativo de 25-37 kDa,

peso molecular reportado para la NeuroEPO.^(18,19) La ausencia de bandas extras de menor talla es indicativa del alto porcentaje de integridad de la molécula desalada.

El proceso de desalado permitió remover el polisorbato 80 y garantizó la pureza de las muestras, lo cual es esencial para realizar el ensayo de proliferación mediante el método de exclusión con Tripán azul.

En la figura 3 se muestra la viabilidad y la proliferación de la línea celular TF1 cultivada con NeuroEPO, evaluada por el método de Tripán azul. Se puede observar, que la viabilidad de las células cultivadas con NeuroEPO (figura 3A) resultó ser cercana a la viabilidad obtenida para el control positivo y superior al 90 %, mientras que el control negativo tuvo una viabilidad menor que un 70 %. Otros autores han reportado resultados similares, como Chamorro et al en 2013, que demostraron que el cultivo de las células TF1 con la EPO-hr y una EPO modificada con acción neuroprotectora (EPOc) se mantiene viable.⁽²⁰⁾

Con respecto a la densidad celular, como se puede observar en la figura 3B, las células cultivadas con las muestras crecieron en un 40 % aproximadamente con respecto al control positivo y se duplicaron en 48 horas. Esto indica que la NeuroEPO es capaz de inducir la proliferación de la línea celular TF1.

Además, el coeficiente de variación obtenido, tanto para los IFAs como para los PF de NeuroEPO resultaron ser menores al 20 %, lo que está acorde con lo reportado en la literatura para los ensayos de actividad biológica.

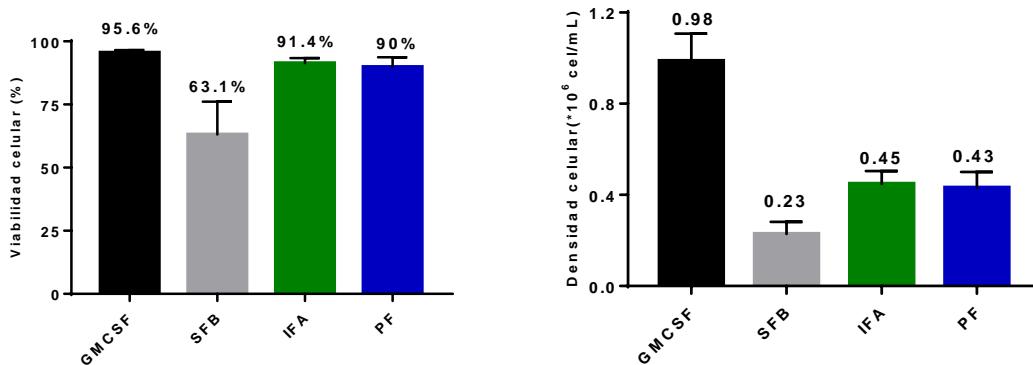


Fig. 3- Viabilidad (A) y proliferación (B) de las células TF1 cultivadas con NeuroEPO. Se cultivaron las células TF1 con GM-CSF (5ng/mL) y con NeuroEPO (1 μ g/mL) por 48 h. Se contaron las células usando el método de exclusión celular con Tripán azul. Cada barra representa la media \pm desviación estándar.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Karki *et al.* en 2022, quienes utilizaron la actividad de la EPO-hr como control positivo en sus ensayos de proliferación de la línea celular TF1.⁽²¹⁾ Además, otros autores han utilizado esta línea celular para evaluar la actividad biológica *in vitro* de variantes de EPO-hr, como Chiu *et al.* en 2020. Estos demostraron con un ensayo colorimétrico que una EPO modificada con el péptido de penetración celular HBHAc (EPO-HBHAc), indujo un aumento de $132,5 \pm 1,9$ % en la proliferación de las células TF-1, con respecto al estándar. Utilizaron el colorante WST-8 (sal de tetrazolio), para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad y la proliferación celular.⁽²²⁾

Los datos demuestran que la NeuroEPO mantiene la viabilidad e induce la proliferación de la línea celular TF1, por lo que estas células se pueden utilizar como un biomodelo adecuado para evaluar la actividad biológica *in vitro* del producto, ya sea IFA o PF.

Índice de proliferación Ki-67

El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear que se expresa durante las fases activas del ciclo celular, específicamente en las fases G1, S, G2 y M, pero no en la fase G0. Su presencia se utiliza comúnmente como un marcador de proliferación celular en estudios de biología y oncología.⁽²³⁾ Delahunt *et al.* en 1995 llevaron a cabo un estudio para evaluar la utilidad pronóstica del marcaje del anti- Ki-67 en una serie de células de cáncer renal. Los investigadores encontraron que el marcaje de Ki-67 es un predictor significativo de la proliferación celular, independientemente del grado histológico de las células.⁽²⁴⁾ Esto sugiere que el Ki-67 puede ser un indicador confiable para evaluar la actividad proliferativa en las células TF1.

El índice de proliferación de la línea celular TF1 usando el antígeno Ki-67 se determinó por citometría de flujo. Los resultados presentados en la figura 4, muestran que el pico con mayor porcentaje de reconocimiento, corresponde al control positivo (células cultivadas con GM-CSF). Esto concuerda con la función conocida del GM-CSF como potente factor estimulador de la proliferación y supervivencia de líneas celulares de origen hematopoyético.⁽¹¹⁾

Por otro lado, el control negativo, exhibe el menor porcentaje, lo que muestra una proliferación celular significativamente reducida, debida a la ausencia de citocinas en el medio utilizado. Las células cultivadas con la NeuroEPO presentaron aproximadamente un 89 % de reconocimiento del Ki-67, con respecto a las células cultivadas con GM-CSF. Esto reafirma que la NeuroEPO induce la proliferación celular de las células TF1.

A pesar de que los porcentajes obtenidos en el método de exclusión con Tripán azul e índice de proliferación Ki-67 son diferentes, ambas técnicas demostraron que la NeuroEPO induce la proliferación celular en las TF1. Esta concordancia

refuerza la validez y sugiere que estos métodos podrían ser una herramienta eficaz para verificar la actividad biológica *in vitro* de la NeuroEPO.

Aunque se utiliza ampliamente, el ensayo de exclusión de tripán azul tiene limitaciones. El colorante puede ser incorporado por las células vivas después de un corto tiempo de exposición, y la confiabilidad personal, relacionada con la experiencia del analista, puede afectar los resultados. Las diferencias en los porcentajes de proliferación de ambos métodos pueden deberse a la variabilidad que posee el conteo manual, con respecto a la detección automatizada de la citometría de flujo.^(25,26)

La citometría de flujo proporciona una evaluación más precisa y objetiva de la proliferación celular,⁽²⁷⁾ los resultados indican que evaluar el índice de proliferación celular por citometría de flujo se puede emplear como una herramienta alternativa para determinar la actividad biológica del producto. Este enfoque integral no solo fortalece la investigación actual, sino que también sienta las bases para futuras investigaciones.

Muestra	% Rec.	IMF
Células TF1	0,97	3,35
SFB	63,61	4,44
GM-CSF	94,53	5,91
NeuroEPO	84,72	7.99

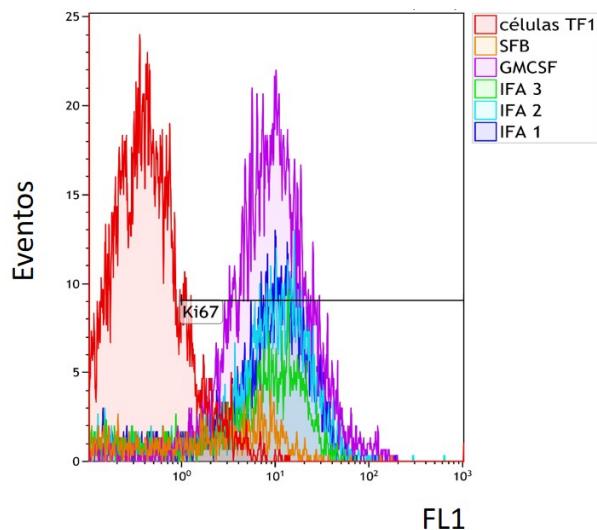


Fig. 4- Proliferación de la línea celular TF1 (Ki-67). Se incubaron 6×10^5 células TF1 en placas de 6 pozos por 72 h con distintas condiciones: GM-CSF (control positivo), NeuroEPO y medio sin citocinas (control negativo).

Conclusiones

La NeuroEPO mantiene la viabilidad e induce la proliferación de la línea celular TF1, por lo que estas células se pueden utilizar como un biomodelo para evaluar la actividad biológica *in vitro* del producto, ya sea IFA o PF.

Referencias bibliográficas

1. Babazadeh A, Vahed FM, Liu Q, Siddiqui S A, Kharazmi M S, Jafari SM. Natural Bioactive Molecules as Neuromedicines for the Treatment/Prevention of Neurodegenerative Diseases. *ACS omega*. 2023; 8(4), 3667-83.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06098>
2. Vittori DC, Chamorro ME, Hernández YV, Maltaneri RE, Nesse AB. Erythropoietin and derivatives: Potential beneficial effects on the brain. *J Neurochem*. 2021;158(5):1032-1057. <https://doi.org/10.1111/jnc.15475>
3. Heman S, Lan O, Agarwal S, Yu SP, Woodbury A. Systematic Review of Erythropoietin (EPO) for Neuroprotection in Human Studies. *Neurochem*. 2021;46: 732–39. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03242-z>
4. Kitamura T, Tojo A, Kuwaki T, et al. Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1. *Blood*. 1989;73(2):375-80. PMID: 2537111
5. Rama R, Garzón F, Rodríguez-Cruz Y, Maurice T, García-Rodríguez JC. Neuroprotective effect of Neuro-EPO in neurodegenerative diseases: "Alea jacta est". *Neural Regen Res*. 2019;14(9):1519-1521. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.255968>
6. García JC, Rodríguez Y, González A, Sosa IM. Neuroeritropoyetina por vía Nasal. Retos y perspectivas para la Neuroprotección. *Rev Cubana Neurol Neurocir*. 2012;2(2):182–200.
7. Galeano AK, Campuzano-Bublitz MA, Kennedy ML. Modelos *in vitro* utilizados para predecir hepatotoxicidad de medicamentos en la fase pre-clínica. *Rev.Cs.Farm. y Bioq.* 2021;9(2):50-66.
8. Nar R, Gibbons MD, Perez L, Strouboulis J, Qian Z, Bungert J. TFII-I/GTF2I regulates globin gene expression and stress response in erythroid cells. *J Biol Chem*. 2025;301(3):108227. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.108227>

9. Winkelmann JC. The human erythropoietin receptor. *Int J Cell Cloning*. 1992;10(5):254-61. <https://doi.org/10.1002/stem.5530100502>
10. Grossi A, Vannucchi AM, Bacci P, Caporale R, Cappellit G, et al. Erythropoietin upregulates the expression of its own receptor in TF-1 cell line. *Leuk Res*. 1998;22(2):145-51. [https://doi.org/10.1016/s0145-2126\(97\)00134-3](https://doi.org/10.1016/s0145-2126(97)00134-3)
11. Mulcahy L. The erythropoietin receptor. *Semin Oncol*. 2001;28(2 Suppl 8):19-23. [https://doi.org/10.1016/s0093-7754\(01\)90208-8](https://doi.org/10.1016/s0093-7754(01)90208-8)
12. Lee J, Lee S, Kim H. Transcriptomic analysis of erythropoietin receptor expression during erythroid differentiation. *Haematologica*. 2022;107(5), 1248-59.
13. Uchida M, Watanabe T, Kunitama M, Mori M, Kikuchi S, et al. Erythropoietin Overcomes Imatinib-Induced Apoptosis and Induces Erythroid Differentiation in TF-1/bcr-abl Cells, *Stem Cells*. 2004; 22(4):609-16. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-4-609>
14. Souza BDM, Garcia LFR, Bortoluzzi EA, Felippe WT, Felippe MCS. Effects of several storage media on viability and proliferation capacity of periodontal ligament cells. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2020;21(1):53-59.
<https://doi:10.1007/s40368-019-00450-8>
15. Chan LL, Rice WL, Qiu J. Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227950. <https://doi:10.1371/journal.pone.0227950>
16. Yang J, Chen J, Chang J, et al. IDH2/R140Q mutation confers cytokine-independent proliferation of TF-1 cells by activating constitutive STAT3/5 phosphorylation. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):116.
<https://doi:10.1186/s12964-023-01367-y>
17. Wang W, Chen YF, Wei ZF, Jiang JJ, Peng JQ, et al. Microemulsion of Cinnamon Essential Oil Formulated with Tea Polyphenols, Gallic Acid, and Tween

- 80: Antimicrobial Properties, Stability and Mechanism of Action. *Microorganisms*. 2023;11(1):2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010002>
18. Muñoz A, Cardentey J, Paradina L, Rojas L, Figueredo T, et al. Preformulation Studies and Physicochemical Properties of Intranasal Low Sialic Acid Erythropoietin: BioProcess J. 2016; 15(2):45-51.
19. Muñoz A, Montejo AV, Fernández M, Sosa I, García J. Effect of nonionic surfactants and HPMC F4M on the development of formulations of NeuroEPO as a neuroprotective agent. *J Adv Pharm Sci Technol*. 2014;1(2):22-35.
<https://doi:10.14302/issn.2328-0182.japst-13-206>
20. Chamorro ME, Wenker SD, Vota DM, Vittori DC, Nesse AB. Signaling pathways of cell proliferation are involved in the differential effect of erythropoietin and its carbamylated derivative. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(8):1960-1968.
<https://doi:10.1016/j.bbamcr.2013.04.006>
21. Karki U, Wright T, Xu J. High yield secretion of human erythropoietin from tobacco cells for ex vivo differentiation of hematopoietic stem cells towards red blood cells. *J Biotechnol*. 2022;355:10-20.
<https://doi:10.1016/j.jbiotec.2022.06.010>
22. Chiu PC, Liou HC, Ling TY, Li JS. Development of a Neuroprotective Erythropoietin Modified with a Novel Carrier for the Blood–Brain Barrier. *Neurotherapeutics*. 2020;17,1184-96. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00845-2>
23. Andrés-Sánchez N, Fisher D, Krasinska L. Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67. *J Cell Sci*. 2022;135(11):jcs258932.
<https://doi:10.1242/jcs.258932>
24. Delahunt B, Bethwaite PB, Thornton A, Ribas JL. Proliferation of renal cell carcinoma assessed by fixation-resistant polyclonal Ki-67 antibody labeling.

Correlation with clinical outcome. *Cancer*. 1995;75(11):2714-19. DOI:

[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19950601\)75:11%3C2714::aid-cncr2820751113%3E3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950601)75:11%3C2714::aid-cncr2820751113%3E3.0.co;2-x)

25. Kuijpers L, van Veen E, van der Pol LA, Dekker NH. Automated cell counting for Trypan blue-stained cell cultures using machine learning. *PLoS One*.

2023;18(11):e0291625. <https://doi:10.1371/journal.pone.0291625>

26. Ude A, Afi-Leslie K, Okeke K, Ogbodo E. Trypan Blue Exclusion Assay, Neutral Red, Acridine Orange and Propidium Iodide. Cytotoxicity - Understanding Cellular Damage and Response. IntechOpen; 2023. Available from:

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.105699>

27. Robinson JP, Ostafe R, Iyengar SN, Rajwa B, Fischer R. Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells*. 2023;12(14):1875. Published 2023 Jul 17.

<https://doi:10.3390/cells12141875>