

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO



DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE
PEPTONA DE COLAGENO Y EXTRACTO DE LEVADURA
PARA LA PROPAGACION DE TRES LINEAS
CELULARES DE MAMIFEROS

Por

GLORIA ELENA ESPINOSA AYALA

Como requisito parcial para obtener el grado de:
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGIA

Ciudad Universitaria

Septiembre 2007.

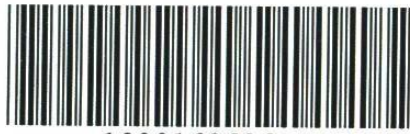
TD

Z5320

FCB

2007

.E86



1020160696

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO



DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE PEPTONA DE COLAGENO Y
EXTRACTO DE LEVADURA PARA LA PROPAGACION DE TRES LINEAS
CELULARES DE MAMIFEROS.

Por:

GLORIA ELENA ESPINOSA AYALA

Como requisito parcial para obtener el grado de:
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

Ciudad Universitaria

Septiembre, 2007.

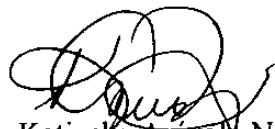
TD
Z5320
FCU
2007
.E86



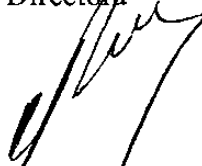
FONDO
TESIS
170908

DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE PEPTONA DE COLAGENO Y
EXTRACTO DE LEVADURA PARA LA PROPAGACIÓN DE TRES LINEAS
CELULARES DE MAMIFEROS.

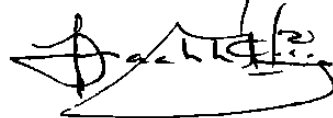
El comité de tesis que revisó y aprobó el trabajo:



Dra. Katuska Arevalo Niño
Directora



Dra. Catalina Rivas Morales
Co-Directora



Dra. Maria del Pilar Carranza Rosales
Directora Externa



Dra. Delia Elva Cruz Vega
Vocal



Dra. Azucena Oranday Cárdenas
Secretaria

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo financiero del CONACYT (beca de doctorado No. 170412), del CONACYT-SECTORIAL-SALUD 33B y de la UANL (PAYCIT-CA-83-04).

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social.

A la Dra. Catalina Rivas Morales, por la confianza que siempre ha tenido en mí, aun en los tiempos críticos. Por el apoyo, consejos y la buena disposición que mostró durante todo el proyecto. Por todas las enseñanzas que me dio durante mis etapas de estudiante.

A la Dra. Pilar Carranza Rosales, por enseñarme acerca del cultivo celular. Por sus consejos y sugerencias dados durante toda la etapa experimental y también en la revisión de la tesis.

A la Dra. Katuska Arévalo Niño, por la dirección de tesis y por su apoyo para mi titulación.

A la Dra. Delia Elva Cruz Vega, por toda la ayuda y conocimientos brindados durante la realización del trabajo experimental y sus enseñanzas sobre el uso de Excel.

Al Dr. Jorge E. Castro Garza, por sus acertadas sugerencias durante el proyecto y por la revisión del artículo.

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas, por ser parte de mi comité de tesis y por sus consejos.

A la Dra. Nancy Elena Guzmán Delgado, por su ayuda para tomar las fotografías de las líneas celulares en estudio.

A la MC. Carmen Molina, por las fotografías tomadas de los geles de electroforesis.

Al personal del CIBIN-IMSS por las facilidades brindadas para realizar mi trabajo experimental en sus distintos departamentos.

Al Sr. Abel Navarro de la Biblioteca del CIBIN-IMSS, por la recuperación del material bibliográfico.

A la Dra. Sonia Yesenia Silva, por escucharme y apoyarme en cualquier momento.

Al MC. Jaime Treviño Narvaez por su ayuda y enseñanza con los procesos estadísticos de esta tesis.

A mis amigos, que estuvieron conmigo durante la realización del proyecto.

DEDICATORIA

A mis dos grandes amores Maria Fernanda y Dalia Marijose Rivas Espinosa, por iluminar y dar sentido a mi vida...las amo.

A mi esposo Clemente Rivas, por su apoyo, ayuda y comprensión durante todo el doctorado....gracias.

A mi Mamá por siempre estar.....la quiero.
A Juany y Toño, mis hermanos.

TABLA DE CONTENIDO

	PAGINA
RESUMEN Y ABSTRACT-----	1
INTRODUCCION-----	3
HIPOTESIS-----	5
OBJETIVOS-----	6
Objetivo general	6
Objetivos particulares	6
ANTECEDENTES-----	7
Antecedentes generales	7
Medio de cultivo	7
Desarrollo de nuevos medios de cultivo	11
Antecedentes directos	15
Líneas celulares	21
METODOS -----	23
Material biológico	23
a) Líneas celulares	23

b) Suero fetal de bovino	23
c) Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM).	23
Preparación del medio de cultivo MD.	24
a) Medio de cultivo diseñado MD.	24
Cultivo de las líneas celulares OK, CHANG Y LLC-PK ₁ .	25
a) Resiembra y mantenimiento.	25
Adaptación de las líneas celulares al medio MD	25
Morfología de las células cultivadas en MEM y MD	26
Criopreservación de las células en MEM y MD	26
Cuantificación de elementos esenciales y no esenciales	27
Preparación del medio de cultivo diseñado (MCR)	28
Cinéticas de crecimiento de las líneas celulares cultivadas en MEM y MCR	29
Morfología de las células cultivadas en MEM y MCR	30
Ensayo de citotoxicidad con HgCl ₂	30
Determinación de proteínas totales de las células cultivadas en MEM y MCR	31
Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS.	33
a) Preparación preliminar de las células	33
b) Lisis Celular	33
c) Determinación de proteínas por el método de Hartree	33
d) Preparación de equipo para electroforesis	34
Criopreservación de las células en MEM y MCR.	35
RESULTADOS (Primera parte)-----	37
Morfología de las líneas celulares en el medio de cultivo con ingredientes industriales (MD)	37

Criopreservación de las células en MEM y MD	40
Cuantificación de elementos esenciales y no esenciales	41
Adaptación de las líneas celulares al medio MCR	42
Cinéticas de crecimiento de las líneas celulares	42
Morfología de las células cultivadas en MEM y MCR	46
Ensayo de citotoxicidad con HgCl ₂	48
Determinación de proteínas totales de las células en MEM y MCR	52
Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS	55
Criopreservación de las células en MEM y MCR	56
DISCUSION-----	57
CONCLUSIONES-----	64
LITERATURA CITADA-----	67
APENDICE-----	80

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS

American Type Culture Collection	ATCC
Amortiguador Salino de Fosfatos	PBS
Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio	MTT
Cloruro Mercúrico	HgCl ₂
Desviación Estándar	DE
Dimetilsulfóxido	DMSO
Grados centígrados	°C
Gramos	g
Horas	h
Kilodaltones	kDa
Litro	L
Medio Esencial Minimo de Eagle	MEM
Medio C Rivas	MCR
Medio Diseñado	MD
Microgramos	µg
Microlitro	µl
Mililitro	ml
Milimolar	Mm
Minutos	min
Nanogramos	ng
Nanomoles	nmol
Ohms	Ω
Porcentaje	%

Potencial de Hidrógeno	pH
Revoluciones por minuto	rpm
Solución Salina Balanceada de Hanks	SSBH

LISTA DE TABLAS

PAGINA

Tabla 1	Curva estándar de proteínas por el micro-método de Azul de Coomassie-----	32
Tabla 2	Porcentaje de viabilidad en las líneas celulares en las diferentes Proporciones de MEM:MD-----	40
Tabla 3	Comparación de las concentraciones de metales en la peptona de colágeno y extracto de levadura utilizados en la formulación del MD y del MCR-----	41
Tabla 4	Porcentaje de viabilidad de las líneas celulares en MCR y MEM después de un proceso de descongelación-----	55

LISTA DE FIGURAS

	PAGINA
Fig. 1 Morfología de las células OK cultivadas en MEM y Mezclas MEM:MD-----	38
Fig. 2 Morfología de las célulasCHANG cultivadas en MEM y Mezclas MEM:MD-----	38
Fig.3 Morfología de las células LLC-PK ₁ cultivadas en MEM y Mezclas MEM:MD-----	39
Fig. 4 Curva de crecimiento de la línea celular OK propagada en MEM y MCR-----	43
Fig. 5 Curva de crecimiento de la línea celular CHANG propagada en MEM y MCR -----	44
Fig. 6 Curva de crecimiento de la línea celular LLC-PK ₁ propagada en MEM y MCR -----	45
Fig. 7 Morfología de las células OK propagadas en a) MEM y b) en MCR (40 X)-----	46
Fig. 8 Morfología de las células CHANG propagadas en a) MEM y b) en MCR (40 X)-----	46
Fig. 9 Morfología de las células LLC-PK ₁ propagadas en a) MEM y b) en MCR (40 X)-----	47
Fig. 10 Efecto del cloruro mercuríco sobre la viabilidad de las células OK.-----	49
Fig. 11 Efecto del cloruro mercuríco sobre la viabilidad de las células CHANG.-----	50

En los últimos años, el enfoque al diseño de nuevos medios de cultivo utilizando ingredientes alternos económicos y accesibles, para la propagación de distintos tipos de células, ha sido de interés en el campo de la investigación biomédica. En el presente trabajo se diseñó un medio de cultivo a base de peptona y extracto de levadura de grado industrial para adaptar las líneas celulares OK (riñón de zarigüeya), CHANG (hígado humano) y LLC-PK₁ (riñón de cerdo), las cuales se lograron cultivar hasta la mezcla 5:95 de MEM:MD (MEM = Medio esencial mínimo de Eagle, medio control; MD = medio diseñado). Sin embargo, en esta mezcla las células presentaron alteraciones morfológicas del núcleo, en la relación núcleo-citoplasma, así como mayor susceptibilidad frente al tóxico cloruro mercuríco (HgCl₂). Debido a esto, se consideró que el cultivo fue exitoso hasta la proporción 25:75 (MEM:MD). Las alteraciones observadas en células creciendo en la mezcla 5:95 posiblemente fueron debidas a la presencia de altas concentraciones de elementos tóxicos en la peptona y extracto de levadura utilizada. Por lo anterior, se continuo con el diseño del medio MCR para cultivo *in vitro* de líneas celulares de mamífero, pero utilizando esta vez peptona y extracto de levadura de mayor pureza. Al igual que para el MD, se utilizó el medio MEM para la adaptación en el MCR y como medio de referencia para evaluar los parámetros de crecimiento de las líneas celulares OK, CHANG y LLC-PK₁. Se realizaron cinéticas de crecimiento, análisis morfológico en microscopía de luz, y análisis de citotoxicidad con HgCl₂ sobre las líneas celulares cultivadas en MCR y en MEM. También se determinó la concentración total de proteínas, así como el patrón de proteínas en geles de poliacrilamida; por último se llevó a cabo la criopreservación de las células en estudio y se midió su viabilidad con azul tripano. De acuerdo con los resultados obtenidos, se logró adaptar las tres líneas celulares en MCR al 100%. La cinética de crecimiento de las células propagadas tanto en MEM como en MCR tuvo un patrón de crecimiento similar y no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). En cuanto a la morfología realizada en el microscopio de luz, no se observaron diferencias en los tres tipos celulares empleados que se cultivaron en MCR con respecto a las células cultivadas en MEM. Los ensayos de sensibilidad frente al HgCl₂ mostraron que las tres líneas celulares cultivadas en MCR no presentan diferencias significativas comparadas con los cultivos crecidos en MEM ($p < 0,05$). Con respecto a la concentración de proteínas totales, para las células en MCR y en MEM no se encontraron diferencias significativas entre las tres líneas celulares estudiadas ($p < 0,05$). Los patrones electroforéticos de proteínas entre todas las líneas celulares cultivadas en los dos medios, también fueron similares, con excepción del patrón observado en las células LLC-PK₁ en el medio MCR, la cual presentó una banda más ancha comparada con la misma banda de las células crecidas en MEM. Finalmente, después de 30 días se descongelaron las células OK y CHANG (pasaje 50) y LLC-PK₁ (pasaje 30) provenientes del medio MCR y se determinó su viabilidad, la cual fue del 98, 94 y 92 % respectivamente. Nuestros resultados muestran que las células cultivadas en MCR conservan características fisiológicas similares a las cultivadas en el medio MEM, por lo que el medio MCR puede representar una buena alternativa económica para el cultivo de células de mamífero.

In the last years, the approach to the design of cell culture media using economic and accessible ingredients for growth and propagation of different cell types, have been of interest in biomedical research. In the present work we designed a cell culture media by using casein peptone and yeast extract of industrial degree to adapt the cell lines OK (opossum kidney), CHANG (human liver) and LLC-PK1 (pig kidney), which were cultivated in a mixture 5:95 of MEM:MD (MEM = Eagle's minimum essential medium; control medium; MD = designed medium). However, in this mixture the cells presented morphologic alterations of the nucleus, in the nucleus-cytoplasm relationship, as well as greater susceptibility to mercuric chloride (HgCl_2). Due to this, it was considered that the culture was successful until proportion 25:75 (MEM:MD). The alterations observed in cells growing in the mixture 5:95 were possibly due to high concentrations of toxic elements in the peptone and yeast extract. For this reason, peptone and yeast extract were substituted by compounds with greater purity (cell culture grade). Like for the MD, MEM medium was used as reference and for the adaptation in MCR (medium with new ingredients) in order to evaluate parameters of growth of the cell lines OK, CHANG and LLC-PK1. Growth kinetics, morphologic analysis by light microscopy, and cytotoxicity analysis with HgCl_2 of the cells cultivated in MCR and MEM were done. Also the total protein concentration, the protein pattern in polyacrylamide gels and criopreservation of the cells was performed. Cell viability was measured by trypan blue exclusion. According to the results, the three cell lines were successfully adapted to growth in 100% MCR. The kinetic of growth of the cells propagated both in MEM and MCR was similar and there were not significant differences ($p < 0,05$). With regard to the cellular morphology, there were not differences in the cell lines cultivated in MCR compared to those cultivated in MEM. The HgCl_2 toxicity assays showed that the cells cultivated in MCR do not present significant differences compared with cells grown in MEM ($p < 0,05$). With regard to the concentration of total proteins content, the cells cultivated in MCR and in MEM do not exhibited significant differences ($p < 0,05$). The electrophoretic pattern of proteins between the cells cultivated in both cell culture media were also similar, except for one band in LLC-PK1 cells grown in MCR, which was broader compared with the same band of the cells grown in MEM. Finally, after 30 days frozen in liquid nitrogen, the cells OK and CHANG (passage 50) and LLC-PK1 (passage 30) in MCR medium were defrosted and their viability was 98, 94 and 92 % respectively. Our results show that the cells cultivated in MCR maintain physiological characteristics similar to the cells cultivated MEM. It is concluded that the MCR medium can be a good and economic alternative for the culture of mammalian cell lines.

2. INTRODUCCIÓN

El cultivo celular es un fenómeno sumamente complejo, e implica diversos factores que pueden influir en la fisiología y respuesta de las células.

El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX, se inició con las observaciones de Roux en cultivos de células de embrión de pollo; posteriormente, Carrel en 1912 utilizó plasma de pollo para el estudio en animales de sangre caliente.

Los cultivos celulares han permitido un incremento en aplicaciones experimentales. Esto ha contribuido en el desarrollo de la virología, la investigación del cáncer, la inmunología, la ingeniería de proteínas, los estudios de interacción y señalización celular, la diferenciación y desarrollo, así como en aplicaciones médicas, industriales y agronómicas. Una serie de innovaciones tales como el desarrollo de medios de cultivo, el uso de antibióticos, las técnicas de separación celular para el pasaje de células y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron mayores aplicaciones de los cultivos de células.

Los medios para cultivo celular contienen una gran variedad de nutrientes, tales como aminoácidos, vitaminas, suplementos orgánicos de bajo peso molecular, además de hormonas y factores de crecimiento, estos últimos provenientes del suero empleado en el cultivo y que en conjunto hacen que en ocasiones el cultivo *in vitro* resulte

oneroso. El costo de producción de 1 g de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal. Asimismo existe una limitación de producción, que es del orden de 10 g de células en un laboratorio normal, y que para ser superior a 100 g requiere instalaciones de tipo industrial. Por lo anterior, para nosotros es de interés contar con un medio de cultivo para propagar células de mamífero a bajo costo y en base a eso se propuso como objetivo principal de este trabajo.

3. HIPÓTESIS

El medio de cultivo diseñado a base de peptona de colágeno y extracto de levadura (MCR) favorecerá el crecimiento de líneas celulares de mamíferos, conservando sus propiedades morfológicas y fisiológicas.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Diseñar un medio de cultivo a base de peptona de colágeno y extracto de levadura (MCR), para la propagación *in vitro* de líneas celulares de mamífero, en comparación con un medio de cultivo tradicional (MEM).

4.2 Particulares

1. Probar las mejores formulaciones del MCR con las líneas celulares OK (ATCC CRL 1840) de riñón de zarigüeya, CHANG (ATCC CCL 13) de hígado humano y LLC-PK₁ (ATCC CRL 1392) de riñón de cerdo.
2. Adaptar el crecimiento de las líneas celulares al medio MCR y establecer sus parámetros de crecimiento mediante cinéticas, comparándolos con las células cultivadas en MEM.
3. Analizar al microscopio de luz la morfología de las células cultivadas en MCR, comparándolos con las células cultivadas en MEM.
4. Realizar pruebas de viabilidad de las líneas celulares después de un proceso de criopreservación, comparándolos con las células congeladas en MEM.

5. Realizar ensayos de citotoxicidad para cada línea celular en ambos medios.
6. Determinar la concentración de proteínas totales y el perfil de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de las tres líneas celulares cultivadas en ambos medios.

5. ANTECEDENTES

5.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo es el componente fundamental en todo el sistema de cultivo de células (Ham RG. 1979); los componentes mínimos del medio basal incluyen sales, aminoácidos, precursores de ácidos nucleicos, ácidos grasos, vitaminas, azúcares y otros factores metabólicos que son críticos para la supervivencia de las células que se propagan en ellos (Ham., 1982).

Eagle en 1955, realizó la primera investigación sistemática acerca de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo *in vitro*. Las líneas celulares propagadas requieren de una mezcla de aminoácidos, vitaminas, cofactores, carbohidratos y sales, además son suplementadas con proteínas del suero.

Los medios de cultivo están formados por los siguientes elementos (Freshney., 2000; Eagle., 1955):

Aminoácidos

Es necesario suplementar el medio basal con los aminoácidos esenciales. También se adicionan otros aminoácidos, pues los requerimientos pueden variar de una célula a otra. Un suplemento común es glutamina, a concentración de 2 mM, aunque existen algunas líneas celulares que pueden utilizar el glutamato. (Freshney., 2000)

Vitaminas

Los medios de cultivo se suplementan con vitaminas del grupo B, siendo los demás grupos de vitaminas aportados por los componentes del suero. La limitación de vitaminas se manifiesta en la supervivencia de las células y en la reducción de la tasa de crecimiento más que en la densidad celular. (Freshney., 2000)

Glucosa

Es la fuente de energía en muchos medios. Metabolizada preferentemente vía glucólisis hacia piruvato que puede ser convertido en lactato o acetoacetato, el cual entra al ciclo de Krebs y produce CO₂. La acumulación de ácido láctico en el medio propio de células embrionarias y transformadas, parece indicar un funcionamiento diferente del ciclo de Krebs en estas células respecto al modelo *in vivo*. En estos casos la mayor parte del CO₂ parece proceder de un uso de la glutamina/glutamato (Freshney., 2000).

Hormonas y factores de crecimiento

En los medios no definidos, estos factores son proporcionados por el suero. Los tipos de suero empleados son: fetal de bovino, de caballo y humano (Freshney., 2000).

Entre estos factores de crecimiento se encuentran, por ejemplo:

1. Los factores de adhesión celular, como la fibronectina.
2. Inhibidores de proteasas. Después del tratamiento con tripsina de un cultivo, el exceso de actividad enzimática se inhibe por la adición de suero al medio. En ausencia de éste deben usarse inhibidores de proteasas como el inhibidor de tripsina de soya.
3. Hormonas. El complemento hormonal dependerá especialmente del tipo celular, se utilizan, hormona de crecimiento, Tiroxina 3, hidrocortisona, dexametasona, hormona foliculo estimulante.
4. Factores de crecimiento peptídico. En la actualidad se han identificado algunos polipéptidos de actividad mitogénica: FGF (Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) y PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Asimismo se han aislado otros factores con mayor especificidad de acción tales como IGF-1 (insulin-like growth factor-1), NGF (neural growth factor), TGF- β (beta transforming growth factor), entre otros.
5. Proteínas y poliaminas. La inclusión de albúmina bovina añade indefinición al medio, por ello se recomienda el uso de BSA (sero albúmina bovina) libre de ácidos grasos. La transferrina se requiere como portador de Fe, y se cree que puede tener actividad mitogénica. (Freshney., 2000)

Dependiendo del medio de cultivo, éste incluye en su formulación nucleósidos, intermediarios del ciclo de Krebs, piruvato y lípidos, por mencionar algunos. La adición de piruvato en el medio permite a las células incrementar su producción endógena de CO₂ haciéndole independiente del suministro exógeno del mismo. Por ejemplo, el medio L15 de Leibovitz contiene una concentración superior de piruvato y no contiene bicarbonato sódico, y no requiere aporte de CO₂ en la fase gaseosa. (Freshney., 2000)

Antibióticos y antifúngicos

A fin de evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo, éste se suele suplementar con antibióticos de diferente espectro de acción. La adición de antibióticos debe ser estrictamente controlada para evitar efectos nocivos sobre el cultivo. Es importante tener especial cuidado cuando se combinan dos o más antibióticos. Las mezclas de uso más común son: penicilina (100 U/ml) / estreptomina (100 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y anfotericina-B (2.5 µg/ml) (Freshney., 2000).

5.2 Desarrollo de nuevos medios de cultivo

En los últimos años ha tomado especial importancia el diseño de formulaciones de medios definidos o químicamente definidos, suplementados con suero o libres de suero para el cultivo de distintas líneas celulares (Dodson *et al.*, 1995). Un medio de cultivo definido se refiere a un medio en el cual los componentes adicionados han sido identificados y se conoce su concentración precisa, por otra parte un medio

químicamente definido se describe como en el medio en el cual no solamente se sabe la concentración precisa de sus componentes sino también la estructura química de cada uno de ellos (Zimmerman *et al.*, 2000).

Se han realizado distintas formulaciones de medios de cultivo suplementándolos con diferentes substratos, o bien utilizando multi-medios para aumentar el crecimiento de líneas celulares de mamíferos.

Dodson *et al.* (1990); evaluaron la capacidad de las células satélite de músculo para adherirse, proliferar y diferenciarse en siete medios de cultivo: CRCM-30, DMEM bajo en glucosa, DMEM alto en glucosa, MCDB-104, McCoy's 5A, Ham's F10 y Medio 199 suplementados con suero de caballo y 11 substratos; con el cual demostraron que el uso de multi-medios puede incrementar sustancialmente el crecimiento y diferenciación del cultivo primario de las células satélite. También demostraron que el substrato de gelatina fue superior a los otros diez, ya que facilitó el crecimiento de las células. Finalmente demostraron que al utilizar combinaciones de substrato/medio se optimiza la diferenciación en el cultivo primario de las células de satélite.

Sieber-Blum *et al.* (1985); suplementaron el medio de cultivo definido MCDB 202, con 21 componentes diferentes (MCDB 202-21) clasificados dentro de seis categorías: (1) factores de transporte, (2) estimuladores del metabolismo, (3) hormonas, (4) factores trópicos, (5) vitaminas y (6) nutrientes esenciales de bajo peso molecular;

para observar la proliferación de las células de la cresta neural de codorniz y su diferenciación a células adrenérgicas y melanocitos. Los resultados mostraron que la formulación MCDB 202-21 favoreció la proliferación y diferenciación terminal de las células, el cual se puede utilizar en el estudio de diferenciación de las células cresta neural, en niveles celulares y moleculares.

Erbach *et al.* (1994); utilizaron una versión modificada del método de optimización simple para diseñar un medio de cultivo químicamente definido con concentraciones altas de K^+ (KSOM), para el crecimiento de pre-implantes de embrión de ratón; los resultados mostraron que de 5-6 divisiones celulares fueron posibles cuando los embriones fueron cultivados por 96 h. Este fue un hallazgo significativo para la formación de nuevos medios de cultivo para el cultivo de cigotos y blastocistos.

La línea celular NSO de mieloma, crece normalmente en un medio de cultivo suplementado con suero o en un medio libre de suero suplementado con derivados de lipoproteína animal. Gorfien *et al.* (2000), adaptaron el crecimiento de esta línea celular en el medio CD Hibridoma (formulación químicamente definida, libre de proteína) suplementado con varios lípidos de origen animal y vegetal y complementado con ciclodextrina, el cultivo permitió obtener una densidad celular dos veces mayor que en el medio suplementado con suero y se cultivó por más de 15 pasajes.

Spens y Håggström (2005); diseñaron un medio químicamente definido, libre de proteína y de componentes animales, designado como RITM01, para el cultivo de las células de mieloma NSO. El medio basal que se usó fue un medio libre de suero y libre de proteína, el cual fue suplementado con fosfatidilcolina, colesterol, β -ciclodextrina y citrato férrico. Dicho medio, incrementó la concentración de aminoácidos y el crecimiento celular significativamente.

Diamond *et al.* (1995); diseñaron un medio libre de caseína, YI-S, que consistía de un caldo nutritivo, una mezcla de vitaminas y suero, el cual recomendaron para la sustitución del medio TYI-S-33 dependiente de caseína, el cual es el más usado para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* y otros protozoarios parásitos.

Espinosa *et al.* (2003); valoraron diferentes medios líquidos definidos [caldo triptona de soya (CTS), CTS suplementado con 10% de suero equino (CTS-se) y caldo de Casman (CC)] para la multiplicación de *G. vaginalis*. Se definió el pH óptimo del medio seleccionado, se estableció la cinética de crecimiento y se caracterizó el perfil de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida de *G. vaginalis* en el medio de cultivo seleccionado. En conclusión, encontraron que el medio CC a pH 7.2 en condiciones de aerobiosis fue el mejor para la propagación de *G. vaginalis* de modo reproducible.

5.3. Antecedentes directos

Los esfuerzos para reducir el suero de los medios de cultivo han llevado a muchos investigadores a utilizar hidrolizados de proteínas comerciales de bajo costo a partir de tejidos animales (tales como peptonas y triptosas), de productos de leche (lactoalbumina y caseína), de microorganismos (extracto de levadura y bacto-peptona) por mencionar algunos (Hink, 1970; Schlaeger y Schumpp., 1992; Jan *et al.* 1994).

El efecto benéfico de los hidrolizados de proteínas sobre el crecimiento de líneas celulares de mamíferos se refleja más que en su crecimiento, en la producción de distintas moléculas, tales como proteínas recombinantes, antibióticos, etc. (Nyberg *et al.*, 1999; Heidemann *et al.*, 2000; Franek y Katinger., 2002).

El extracto de levadura y la peptona son de los aditivos más comúnmente usados en medios de cultivo en la industria del cultivo celular, para el crecimiento de células y/o para la mejor formación de productos, por ejemplo, antibióticos, bioinsecticidas y proteínas recombinantes. (Iding *et al.*, 2001).

En este contexto, Gaudreau *et al.*, (2002), utilizaron extracto de levadura y extracto de papa como promotores de crecimiento en siete cultivos de bacterias lácticas que fueron evaluados por espectrofotometría automatizada, tomando en cuenta dos

aspectos del crecimiento celular: (1) la obtención máxima de biomasa y (2) el rango de crecimiento superior específico.

Por otra parte, se ha estudiado el efecto de la adición de peptona a un medio libre de suero o suplementado con suero para el crecimiento de células de hibridoma en varios sistemas. La suplementación de un medio definido con peptonas resultó en un incremento significativo en el número de células y en la producción de anticuerpos monoclonales específicos en el cultivo de células (Jan *et al.* 1994).

Primatone RL® es otro hidrolizado de proteína el cual favorece el crecimiento de células de mamíferos. Éste hidrolizado enzimático de carne se ha utilizado para reemplazar el suero fetal de caballo en medios de cultivo para células de humano y de roedor; y además es un importante aditivo para el medio de cultivo de células de hibridoma de ratón, con el cual el suero se reduce hasta el 1% (Mizrahi. 1977). SE considera un suplemento de medios de cultivo de bajo costo y natural, el cual sirve como una fuente de aminoácidos, oligopéptidos, sales de hierro, algunos lípidos y elementos trazas de bajo peso molecular (Schlaeger y Schumpp., 1992). Al adicionar Primatone RL® a los medios de cultivo de células de mamíferos e insectos se mejora el crecimiento de las células ya sea en presencia y/o ausencia de suero (Schlaeger., 1996).

Con el propósito de optimizar las condiciones del cultivo en suspensión de la línea celular HL-60 y aumentar la producción celular Schumpp y Schlaeger., (1990), realizaron una mezcla de medio RPMI-1640, DMEM, HamF12 y IMDM suplementado

con transferrina, insulina, Primatone RL®, Pluronic F68, etanolamina y selenio. Con dicho medio lograron una gran productividad de las células HL-60.

Pham *et al.* (2003); establecieron que la línea celular HEK293-EBNA1 (293SFE) era capaz de crecer en un medio libre de suero suplementado con peptonas de origen animal con lo cual se mejoró significativamente la expresión de proteínas recombinantes y la regulación de la expresión de genes, comparada con la línea original 293SF. Posteriormente, Pham *et al.* (2004) demostraron que los amino-péptidos juegan un rol importante no solo proporcionando sustratos para la síntesis de proteínas recombinantes, sino también en la regulación de la expresión de genes.

Recientemente se han utilizando hidrolizados de proteínas de plantas, con el fin de sustituir no solo el suero de los medios de cultivo celulares, sino todo aquel producto de origen animal, durante la producción de proteínas recombinantes (Burteau *et al.* 2003; Franěk *et al.* 2000).

Burteau *et al.* (2003); probaron el efecto y productividad de las peptonas de plantas en cultivos de células CHO 320, un clon de las células CHO K1 genéticamente modificada para secretar el interferón- γ (INF- γ) humano. Se utilizaron 8 diferentes peptonas de plantas, de las cuales la peptona de trigo fue la que mejoró en un 30% el crecimiento de las células y en un 60% la producción del INF- γ .

Franěk *et al.* (2000, 2005); utilizaron peptonas de harina de soya y de trigo para promover el crecimiento y la producción de células de origen animal. Con lo que sugieren que los hidrolizados pueden proporcionar péptidos, que ejercen un efecto positivo y específico en los cultivos de células animales.

En nuestra región se han realizado distintos trabajos de investigación, para el diseño de medios de cultivo que sean eficaces, económicos y accesibles utilizando distintos hidrolizados de proteínas o tejidos animales.

En 1988 Said *et al.*; diseñaron un medio de cultivo (PEHPS) para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* y *E. invadens*. Dicho medio, fue utilizado para la evaluación de varias drogas con propiedades potenciales antiamebicas (González y Said, 1989). El medio PEHPS también permite el crecimiento de *Trichomonas vaginalis* (Castro *et al.*, 1996).

En 1998 Rivas Morales; diseñó un medio utilizando peptona de colágeno y extracto de levadura (Medio C. Rivas) para la producción de biomasa de *Nocardia brasiliensis* a escala piloto (Patente en trámite No. 9810892).

El medio C. Rivas se ha utilizado en forma de caldo para la activación y conservación de cepas bacterianas causantes de enfermedades gastrointestinales, tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* y *Enterobacter aerogenes* (Carreón, 2001; Espinosa, 2001; Viveros, 2004). Asimismo Patena *et al.*, (2002); Silva *et al.*, (2002) y Treviño *et al.*, (2003), utilizaron el medio C. Rivas (agar) para evaluar la actividad antibacteriana de extractos de plantas utilizando el método de difusión en placa

El medio de cultivo C. Rivas fue modificado para el crecimiento y la propagación de hongos dermatofitos, tomando como base el medio Saboraud y se ha utilizado para evaluar la actividad antifúngica de extractos de plantas (Padrón *et al.*, 2003; García, 2004; González, 2004). También se ha empleado para desarrollar un proceso biotecnológico que permitió reducir los costos de producción del hongo entomopatógeno *P. fumosoroseus* a nivel de reactor de 14 L (Elías SM. 2002; Lozano *et al.*, 2003).

Igualmente se han evaluado diferentes medios de cultivo a base de sacarosa como fuente de carbono y harina de soya o peptona de colágeno como fuente de nitrógeno, para mejorar la producción de blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus*. Con los datos obtenidos (Galán *et al.*, 2003; Gutiérrez. 2001; Quintero ZI. 2001) concluyeron que el medio de cultivo utilizado con peptona de colágeno representa una alternativa para la producción de *P. fumosoroseus* debido a su estabilidad en el proceso de almacenaje.

En base a los datos anteriores, se considera que los hidrolizados de proteínas tales como la peptona de colágeno y el extracto de levadura pudieran ser una fuente alterna nutricional adecuada para el diseño de nuevos medios de cultivo de células de mamíferos.

5.4. Líneas Celulares

Células OK (ATCC CRL 1840)

La línea celular OK fue establecida a partir del riñón de la zarigüeya americana *Didelphys virginiana*. Esta línea fue caracterizada con respecto a su morfología, y constitución cromosómica. Las células crecen en Medio Esencial Mínimo de Eagle con el 10% de suero fetal de bovino (Koyama *et al.* 1978; Schwegler *et al.* 1989) y se utilizan como modelo de estudio de las funciones del túbulo proximal de riñón (Yuan *et al.*, 1991; Watson. 1992; Gekle *et al.*, 1995).

Células de CHANG (ATCC CCL-13)

Esta línea fue establecida a partir de tejido normal de hígado (Chang. 1954). La línea celular de CHANG se propaga en el medio Esencial Mínimo de Eagle, suplementado con 10% de suero fetal de bovino (Murphy y Landau. 1962), se utiliza para estudiar la función hepática.

Células LLC-PK₁ (ATCC CRL 1392)

La línea celular LLC-PK₁ fue establecida en 1958, a partir de riñón normal de cerdo (Hull *et al.* 1976; Lifschitz. 1982). Las células son de tipo epitelial y no-tumorigénicas; al igual que las células OK, forman domos, pero además producen una considerable cantidad de activadores plasminogénicos (Rabito y Karish, 1982 y 1983). Estas células conservan características del túbulo proximal de riñón (Watson. 1992; Sandeep *et al.*, 2005). Las células LLC-PK₁ se utilizan en estudios de nefrotoxicidad (Gstraunthaler *et al.* 1990; Urakami *et al.* 2005).

6. METODOS

6.1. Material biológico

a) Líneas Celulares

Se utilizaron las líneas OK de riñón de zarigüeya (ATCC CRL 1840), CHANG de hígado humano (ATCC CCL-13) y LLC-PK₁ de riñón de cerdo (ATCC CRL 1392). Las tres líneas celulares se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 100 unidades/ml de penicilina G y 100 µg/ml estreptomicina, a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

b) Suero fetal de bovino

Se utilizó suero fetal de bovino (Fetal Bovine SERUM Qualified GIBCO) estéril, el cual fue descomplementado por calentamiento a 56°C por 30 min. Se distribuyó en alícuotas de 20 ml y se congeló a -20°C hasta su uso.

c) Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM)

Se disolvieron 10 g de medio MEM de una presentación comercial (GIBCO BRL, Grand Island, USA) en 800 ml de agua Milli Q, añadiendo 2.2 g de NaHCO₃ y 1ml de solución de antibióticos 100X de penicilina G- estreptomicina. Se ajustó el pH a 7.0 con HCl 1N y se aforó a 1000 ml con agua Milli Q. El medio se esterilizó por filtración a través de membranas con diámetro de poro de 0.22 µm (CORNIG); y se distribuyó en

volumenes de 100 o 200 ml en botellas de vidrio estériles con tapón de rosca. Se incubó el medio por 3 días a 37 °C para determinar su esterilidad y luego se almacenó a 4°C. El medio se complementó con 10 % de suero fetal de bovino después se colocó en prueba de esterilidad durante 3 días a 37°C, se usó inmediatamente o se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.2. Preparación del medio de cultivo diseñado (MD)

a) Medio de cultivo diseñado MD

Para la formulación del “medio de cultivo diseñado” (MD) se inició con combinaciones a base de peptona de colágeno y extracto de levadura de grado industrial (SENSIENT, Jalisco, Méx.) como fuente de nitrógeno y de vitaminas respectivamente, glucosa, sales inorgánicas (CaCl₂, NaCl, KCl, MgSO₄, NaH₂PO₄), rojo de fenol y bicarbonato de sodio. Los componentes se disolvieron en 800 ml de agua Milli Q y se les adicionó 1 ml de solución de antibióticos 100X de penicilina G- estreptomycin. Se ajustó el pH a 7.0 con HCl 1N y se aforó a 1000 ml con agua Milli Q. El medio se esterilizó por filtración a través de membranas con diámetro de poro de 0.22µm (CORNIG); se distribuyó el medio en volúmenes de 100 y 200 ml en botellas estériles de tapón de rosca. Se incubó por 3 días a 37 °C para determinar su esterilidad y luego se almacenó a 4°C. El medio se complementó con 10 % de suero fetal de bovino y se colocó en prueba de esterilidad durante 3 días a 37°C, se usó inmediatamente o se almacenó a 4°C hasta su uso.

Para la adaptación de las líneas celulares al medio MD, se utilizaron diferentes proporciones de medio MEM y MD con la finalidad de sustituir al 100% el medio

testigo (MEM). Para esto, se realizaron mezclas de los medios MEM y MD con incrementos progresivos desde 50:50 hasta 5:95 (MEM:MD). En paralelo se cultivaron las 3 líneas celulares en medio MEM al 100% como testigo. Simultáneamente, para todos los parámetros analizados, se compararon los cultivos de las 3 líneas celulares provenientes de MCR, con sus contrapartes cultivadas en MEM.

6.3. Cultivo de las líneas celulares OK, CHANG Y LLC-PK₁

a) Resiembra y mantenimiento

En condiciones de esterilidad, se retiró el medio de cultivo de las cajas Petri (CORNING), donde estaban creciendo las células, y se lavaron con buffer de fosfatos (PBS). Se añadieron 0.5 ml de tripsina al 0.25% y se incubaron durante 5 min a 37 °C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Se adicionaron 2 ml de medio con suero y se resuspendieron. Se sembraron 1 x 10³ células por ml en cajas Petri, a las cuales se les añadieron 3 ml de medio MEM o MCR y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda.

6.6. Adaptación de las líneas celulares al medio MD

Se utilizó el medio MEM para la adaptación progresiva de las líneas celulares en medio MD. Se prepararon proporciones con distintos porcentajes del MEM/MD. La propagación de las líneas celulares comenzó con la proporción 50:50 y 25:75

(MEM/MD) mediante resiembras de las células cada vez que se formó una monocapa confluyente en cajas Petri, después de 5 a 10 pasajes, se resembraron las células propagadas en la mezcla 25:75 a la siguiente mezcla y así sucesivamente hasta llegar a la proporción 5:95 (MEM/MD).

6.6.Morfología de las células cultivadas en MEM y MCR

Se cultivaron las células en MEM y en las mezclas 50:50, 27:75 y 5:95 (MEM:MD) sobre cubreobjetos de vidrio en una microplaca de 6 pozos (CORNING) a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Después de que se formó una monocapa confluyente, se lavaron las células con PBS y se fijaron con metanol durante 10 min. Posteriormente se lavaron con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se tiñeron durante 60 min con colorante Giemsa GS-500 (SIGMA). Se retiró el colorante, se lavó con agua corriente. Por último se montaron los cubreobjetos con las células teñidas en un portaobjetos con resina y se analizaron al microscopio de luz.

6.6.Criopreservación de las células en MEM y MD

Se seleccionaron cultivos de células con el 85 % de confluencia, se eliminó el medio de cultivo con vacío y se lavaron las células con PBS. Se añadieron 0.5 ml de tripsina al 0.25 % y se incubaron los cultivos durante 5 min a 37°C con 5 % de CO₂ en atmósfera húmeda. Las células se cosecharon en tubos cónicos graduados de 15 ml con tapón de rosca y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. El sedimento celular se ajustó a

una concentración de 1×10^6 céls/ml, se resuspendió en un volumen de medio MEM y/o MCR y se completó con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las células fueron colocadas en viales para congelación estériles de 2 ml de capacidad (CORNING) y congeladas sucesivamente a 4°C por 30 min a -20°C por 2 h, a -70°C durante toda la noche y por último se almacenaron a -196°C en nitrógeno líquido.

Para la descongelación se tomó un tubo con las células congeladas y se incubó directamente a 37°C en baño de agua. El contenido se pasó a un tubo cónico estéril y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Se eliminó el medio con DMSO y se resuspendió el sedimento con medio completo MEM y/o MCR según correspondiera. Se dividió la suspensión en dos cajas Petri de cultivo y se les agregaron 3 ml de medio MEM y/o MCR completo. Se incubaron los cultivos a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Con la suspensión que quedó en los tubos cónicos se determinó la viabilidad con azul tripano 0.1% (Trypan Blue Solution SIGMA), se contaron 100 células y se calculó el porcentaje de células vivas y muertas.

6.7. Cuantificación de elementos esenciales y no esenciales

La determinación de la concentración de arsénico, cadmio, cobalto, hierro, mercurio, plomo y zinc presentes en la peptona y extracto de levadura de grado industrial y grado cultivo celular, se realizó utilizando la metodología NOM-117-SSA1-1994. Para el análisis de cobalto se empleó la metodología EPA-200.7. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Servicios Clínicos y Análisis Toxicológicos, S.A. de C.V., con autorización (SS) TA-01-03 y Núm. de acreditación A-038-003/03.

6.8. Preparación del medio de cultivo diseñado (MCR)

En la segunda formulación (MCR) se cambió la peptona de colágena y extracto de levadura de grado industrial por reactivos grado cultivo celular, peptona (Peptone, SIGMA), extracto de levadura (Yeast extract, SIGMA); glucosa, sales inorgánicas (CaCl_2 , NaCl , KCl , MgSO_4 , NaH_2PO_4), rojo de fenol y bicarbonato de sodio. Los componentes se disolvieron en 800 ml de agua Milli Q y se adicionó 1 ml de solución de antibióticos 100X de penicilina G- estreptomycin. Se ajustó el pH a 7.0 con HCl 1N y se aforó a 1000 ml con agua Milli Q. El medio se esterilizó por filtración a través de membranas con diámetro de poros de $0.22\mu\text{m}$ (CORNIG); se distribuyó el medio en volúmenes de 100 y 200 ml en botellas estériles de tapón de rosca. Se incubó por 3 días a 37°C para determinar su esterilidad y luego se almacenó a 4°C . El medio se complementó con 10 % de suero fetal de bovino y se colocó en prueba de esterilidad durante 3 días a 37°C , se usó inmediatamente o se almacenó a 4°C hasta su uso.

Después de preparar el medio MCR se adaptaron las células utilizando diferentes proporciones de medio MEM y MCR con la finalidad de sustituir al 100% el medio testigo (MEM). Se realizaron los siguientes ensayos: cinéticas de crecimiento, análisis morfológico en microscopía de luz, y análisis de citotoxicidad con HgCl_2 ; también se determinó la concentración total de proteínas, así como el patrón de proteínas en geles de poliacrilamida; por último se llevó a cabo la criopreservación de las 3 líneas celulares y se midió su viabilidad con azul tripano. Simultáneamente, para todos los parámetros analizados, se compararon los cultivos de las 3 líneas celulares provenientes de MCR, con sus contrapartes cultivadas en MEM.

Con el medio MCR se empezó la adaptación de las células con la mezcla 10:90 (MEM/MCR), después de 5 pasajes se resembró a la proporción 5:95 y por último se resembró las células en el 100% del medio MCR.

6.9. Cinéticas de crecimiento de las líneas celulares cultivadas en MEM y MCR

Se realizaron cinéticas durante 10 días en el medio MCR con peptona y extracto de levadura grado cultivo celular y el medio control (MEM). Por separado, y a partir de cada cultivo de células (OK, CHANG y LLC-PK₁) en fase logarítmica de crecimiento, se retiró el medio y se lavaron dos veces con PBS. Se despegaron las monocapas confluentes con tripsina al 0.25% y se cosecharon en tubos cónicos de 15 ml. Los cultivos se centrifugaron a 1000 rpm/10 min, el sedimento celular se resuspendió en 2 ml de medio con suero MEM o MCR; se contó el número de células y se preparó una suspensión de 25000 cél/ml; se incubaron las cajas a 37°C con 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. Cada 24 h durante 10 días, se tripsinizaron dos cajas Petri de cada línea celular tanto en MEM como MCR y se contó el número de células, utilizando un hemocitómetro.

Análisis estadístico: se calculó el tiempo de duplicación para cada variante para esto, empleamos $N_c = N_i * 2^n$, donde N_c = número de células a las c horas, N_i = número inicial de células y n = número de divisiones a las c horas. Puesto que $N = T/TD$, donde T son las horas del cultivo y TD es el tiempo de duplicación, entonces $TD = T/n$ (n = número de divisiones a las c horas). Los resultados se analizaron mediante la

prueba no paramétrica de Mann–Whitney con un nivel de significancia de 0.05, con el programa estadístico SPSS versión 11.0.

6.10. Morfología de las células cultivadas en MEM y MCR

Se cultivaron las células en MEM y en MCR sobre un cubreobjetos de vidrio en una microplaca de 6 pozos (CORNING) a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Después de que se formó una monocapa confluyente, se lavaron las células con PBS y se fijaron con metanol durante 10 min. Posteriormente se lavaron con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se tiñeron durante 60 min con colorante Giemsa GS-500 (SIGMA). Se retiró el colorante, se lavó con agua corriente. Por último se montaron los cubreobjetos con las células teñidas en un portaobjetos con resina y se analizaron al microscopio de luz.

6.11. Ensayo de citotoxicidad con HgCl₂

Se utilizaron monocapas confluentes de las células cultivadas en MEM y en MCR con ingredientes de grado cultivo celular, en microplacas de 96 pozos. Se trataron con concentraciones variables de HgCl₂ (0, 10, 15 y 20 µM) y se incubaron durante 6 horas a 37°C, 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. Después se lavaron dos veces las células con solución salina balanceada de Hanks (SSBH 1X), se agregó a cada pozo 200 µl de una mezcla 5:1 de MTT (2 mg/ml) y de PMS (3.3mg/ml) y se incubaron a 37°C durante 75 min. Se eliminaron los reactivos, se lavaron las células con SSBH, se agregaron 200 µl

de alcohol isopropílico acidificado y se dejó reposar la microplaca durante 15 min, posteriormente se resuspendió el alcohol, se colocó el sobrenadante en una microplaca nueva y se leyó en un lector de microplacas a 545 nm (EIA multi- well reader, SIGMA Diagnostics).

Análisis estadístico: para el análisis de los datos se utilizó la prueba de ANOVA de 1 factor con un nivel de significancia de 0,05 con el programa estadístico SPSS versión 11.0.

6.12. Determinación de proteínas totales de las células cultivadas en MEM y MCR

Se sembraron 5,000, 10,000, 20,000 y 30,000 células en 200 µl del medio de cultivo respectivo en una microplaca de 96 pozos y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda durante 24 horas. Después de este tiempo se eliminó el medio de cultivo y se lavó con TBS (buffer salino tris, pH 7.4). Por separado, se adicionaron diferentes concentraciones de albúmina (sero albúmina bovina, SIGMA) partiendo de una solución de 1000 µg/ml de NaOH para utilizarse como curva estándar 1000 µg/ml de NaOH 1N en volumen de 50 µl en la primera línea de la microplaca (Tabla I), la cual previamente se dejó vacía y se agregaron 50 µl de NaOH 1N a los pozos con células. Se incubó a 37°C, el 5% de CO₂ en atmósfera húmeda por 15 minutos; se añadieron 200 µl de reactivo azul de Coomassie (Bio- Rad) a diluido 1:5 en agua Milli Q de cada pozo de la curva y a las células, se incubó a temperatura ambiente con agitación moderada, se

leyó a 630 nm y filtro diferencial de 405 nm en un lector de microplacas (EIA multi-well Reader, SIGMA Diagnostics) según el método descrito por Chopsis and Eng, 1985.

Análisis estadístico: los resultados se analizaron con la prueba de ANOVA de 1 factor con un nivel de significancia de 0.05 con el programa estadístico SPSS versión 11.0.

Tabla I. Curva estándar de proteínas por el micro-método de Azul de Coomassie.

Concentración de proteínas ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen de SAB (μl)	Volumen adicionado de NaOH 1N (μl)
0	0	50
1	1	49
5	5	45
10	10	40
15	15	35
20	20	30

6.13. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. (Laemmli et al. 1970)

a) Preparación preliminar de las células

Se cultivaron las células OK, CHANG y LLC-PK₁ en cajas de cultivo con 3 ml de medio MEM y/o MCR y se incubaron durante 48 h a 37°C, 5% de CO₂ en atmósfera húmeda.

b) Lisis Celular

Después de incubar las células se eliminó el medio de cultivo y se lavaron dos veces con PBS a 4 °C. Se adicionó 1 ml de buffer de lisis + inhibidores de proteasas y se rasparon las células, el lisado se colocó en un tubo eppendorf (uno por cada línea celular en su medio de cultivo respectivo) en hielo.

c) Determinación de proteínas por el método de Hartree (Hartree. 1972)

1. Se colocaron por duplicado en tubos de vidrio las siguientes soluciones:
Estándar de SAB con las siguientes concentraciones 50, 100, 150, 200 y 250 µl, muestra de 25 µl; agua Milli Q 250 µl (como blanco). Se completó el volumen de los tubos a 250 µl con agua Milli Q.

2. Se adicionaron 200 μl de la solución "A" a cada uno de los tubos, se agitaron y se incubaron en baño de agua a 50°C por 10 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 12 min.
3. Se agregaron 20 μl de la solución "B", se agitaron y se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente.
4. Se agregaron 700 μl de la solución "C", se agitaron y se incubaron en un baño de agua a 50°C por 10 min. Se dejó enfriar por 10 min.
5. Se colocaron 200 μl del contenido de cada uno de los tubos en una microplaca iniciando en la posición A1 con el blanco, enseguida por duplicado las soluciones estándar de menor a mayor concentración y por último las muestras de la misma forma.
6. La placa se leyó a 492 nm, con el método de regresión lineal, colocando en el eje de las ordenadas la absorbancia y en el eje de las abcisas la concentración; la curva estándar y las muestras se leyeron por duplicado.

d) Preparación de equipo para electroforesis

Se utilizó un equipo Bio-Rad® para realizar las electroforesis. Se colocaron 4 ml de solución para el gel separador y se agregó agua Milli Q hasta que quedó cubierta la superficie, se dejó reposar por 25 min para permitir que se polimerice. Después de este tiempo se eliminó el agua y agregó 1.5 ml de solución para el gel concentrador y se colocó el peine que sirvió como guía para hacer los carriles donde se colocaron las muestras. Completada la polimerización de los dos geles, se colocaron en la cámara de electroforesis y se adicionó el buffer de corrida 1X. Para la colocación de las muestras se mezclaron 1.5 ml del lisado celular con 1.5 ml de buffer de muestra 2X se hirvieron

durante 3 min para desnaturalizar las proteínas. Después de esto se cargaron los carriles del gel, con los microlitros calculados a partir de la curva estándar que correspondieran a 10 µg/ml o 20 µg/ml.

Se corrió el gel a 70 V y cuando las muestras entraron al gel separador se subió el voltaje a 110 V aproximadamente por 2.5 h, cuando el frente del colorante llegó 1 cm antes de la base del gel, se apagó la fuente de poder; se sacaron los geles y se tiñeron con solución de azul de coomassie al 0.5 % durante 30 min. Posteriormente se lavaron con agua Milli Q y se colocaron en la solución decolorante (metanol-ácido acético), durante toda la noche para eliminar el exceso de colorante del gel, finalmente se pasó a la solución conservadora (glicerol al 1 %). Por último se tomaron fotografías donde se observó el patrón de proteínas de las células en estudio

6.14. Criopreservación de las células en MEM y MCR

Se seleccionaron cultivos de células con el 85 % de confluencia, se eliminó el medio de cultivo con vacío y se lavaron las células con PBS. Se añadieron 0.5 ml de tripsina al 0.25 % y se incubaron los cultivos durante 5 min a 37°C con 5 % de CO₂ en atmósfera húmeda. Las células se cosecharon en tubos cónicos graduados de 15 ml con tapón de rosca y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. El sedimento celular se ajustó a una concentración de 1×10^6 céls/ml, se resuspendió en un volumen de medio MEM y/o MCR y se completó con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las células fueron colocadas en viales para congelación estériles de 2 ml de capacidad (CORNING) y congeladas sucesivamente a 4°C por 30 min, a -20°C por 2 h, a -70°C durante toda la noche y por último se almacenaron a -196°C en nitrógeno líquido.

Para la descongelación se tomó un tubo con las células congeladas y se incubó directamente a 37°C en baño de agua. El contenido se pasó a un tubo cónico estéril y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Se eliminó el medio con DMSO y se resuspendió el sedimento con medio completo MEM y/o MCR según correspondiera. Se dividió la suspensión en dos cajas Petri de cultivo y se les agregaron 3 ml de medio MEM y/o MCR completo. Se incubaron los cultivos a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Con la suspensión que quedó en los tubos cónicos se determinó la viabilidad con azul tripano al 0.1% (Trypan Blue Solution SIGMA), se contaron 100 células y se calculó el porcentaje de células vivas y muertas.

7. RESULTADOS

7.1 Morfología de las líneas celulares en el medio de cultivo con ingredientes industriales (MD)

No se observaron diferencias morfológicas entre los tres tipos celulares que se cultivaron en la proporción 50:50 y 25:75 (MEM:MD) con respecto a las crecidas en el medio control. En cambio, en las tres líneas propagadas en la proporción 5:95 (MEM:MD) se observaron diferencias en la relación núcleo-citoplasma, los núcleos eran grandes e irregulares y el citoplasma escaso; además presentaron mayor afinidad tintorial (ver figuras 1, 2 y 3).

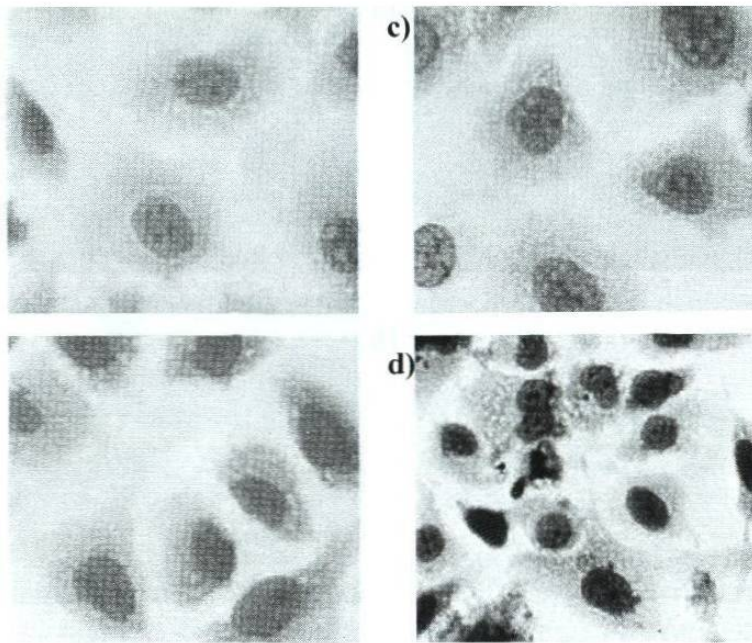


Figura. 1. Morfología de las células OK cultivadas en MEM y mezclas MEM:MD. (a) MEM, (b) 50:50, (c) 25:75 y (d) 5:95. (Magnificación 40 X).

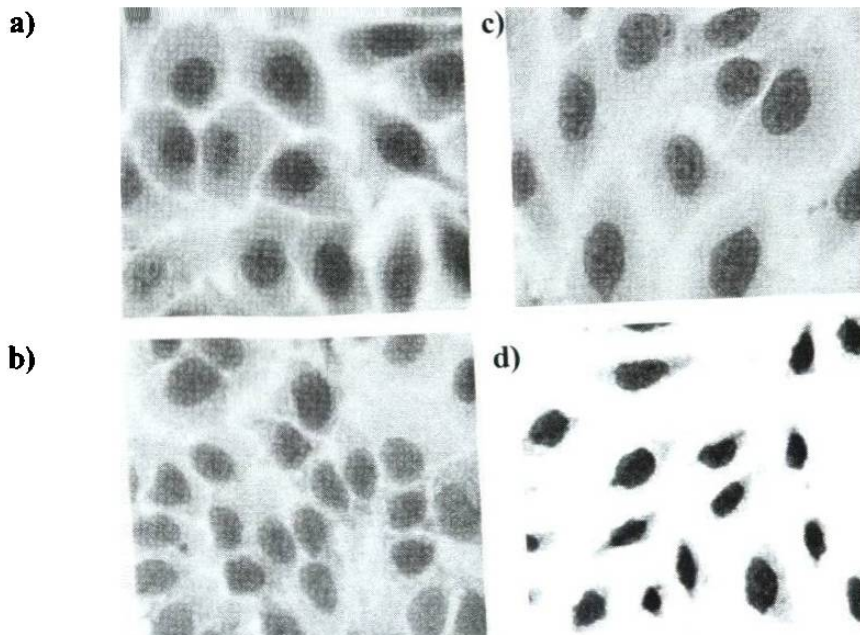


Figura. 2. Morfología de las células de CHANG cultivadas en MEM y mezclas MEM:MD. (a) MEM, (b) 50:50, (c) 25:75 y (d) 5:95. (Magnificación 40 X).

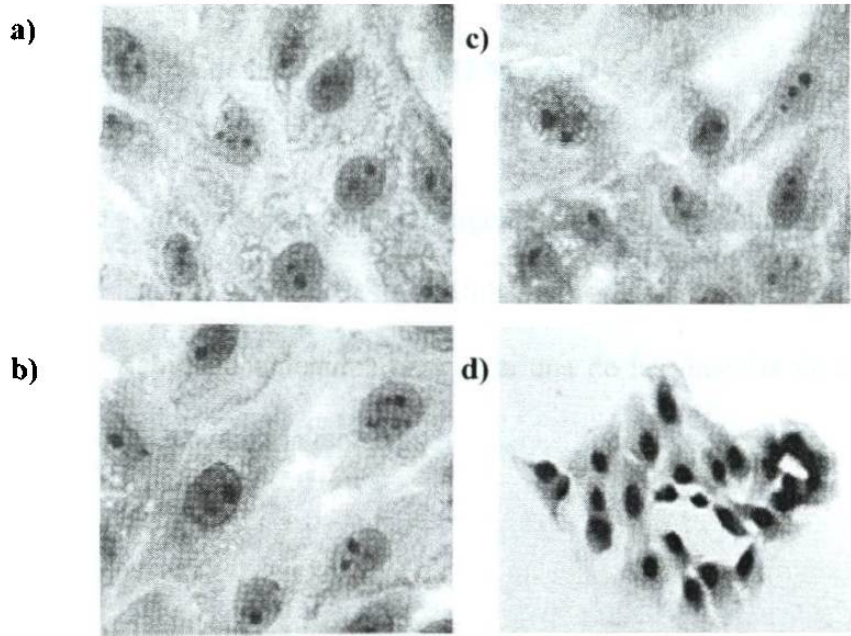


Figura. 3. Morfología de las células LLC-PK₁ cultivadas en MEM y mezclas MEM:MD. (a) MEM, (b) 50:50, (c) 25:75 y (d) 5:95. (Magnificación 40 X).

7.2 Criopreservación de las células en MEM y MD

Después de 45 días de permanecer congeladas en nitrógeno líquido se determinó la viabilidad con azul de tripano de las células congeladas en MD y en MEM. Los porcentajes de viabilidad obtenidos para cada una de las mezclas de medio y para el medio MEM se muestran en la tabla II.

Tabla II. Porcentaje de viabilidad de las líneas celulares en los medios MEM y MD

Línea celular/ Medio	% Viabilidad		
	MEM (control)	MEM: MD 50:50	MEM: MD 27:75
OK	97	90	90
CHANG	95	91	92
LLCPK-1	92	85	80

7.3 Cuantificación de elementos esenciales y no esenciales

La tabla III muestra los resultados del análisis de algunos metales presentes en la peptona y extracto de levadura de grado industrial y calidad cultivo celular, los cuales poseen concentraciones elevadas de hierro y plomo respectivamente, así como disminución en los niveles de zinc en el extracto de levadura grado industrial.

Tabla III. Comparación de las concentraciones de la formulación del MD y del MCR

Metal (mg/Kg)	Peptona grado cultivo celular	Peptona grado industrial	Extracto de levadura grado cultivo celular	Extracto de levadura grado industrial
Arsénico	< 0.010	<0.010	<0.010	<0.010
Cadmio	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Cobalto	<4.0	<4.0	<4.0	<4.0
Hierro	<1.2	138.0	30.5	56.5
Mercurio	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004
Plomo	<0.4	<0.4	1.72	3.51
Zinc	<0.1	<0.1	2.35	1.08

Resultados de los ensayos realizados con la propagación de las células en MCR al 100%

7.4. Adaptación de las líneas celulares al medio MCR

En el presente trabajo se lograron propagar las líneas celulares OK, CHANG y LLC-PK₁ en el medio MCR al 100%. Las líneas celulares OK y CHANG se subcultivaron durante 50 pasajes y la línea LLC-PK₁ hasta el pasaje 33. En estos pasajes, las células se sometieron a un proceso de congelación para su conservación prolongada.

7.5. Cinéticas de crecimiento de las líneas celulares

En la figura 4 se muestra la cinética de crecimiento de las células OK cultivadas tanto en MEM como en MCR, se observó un patrón de crecimiento similar en los dos medios, entre las 24 y 120 h se presentó el crecimiento exponencial y a partir de ese momento llegaron a la confluencia. Las células en MEM y MCR presentaron un tiempo de duplicación de 26.08 y de 26.34 h respectivamente.

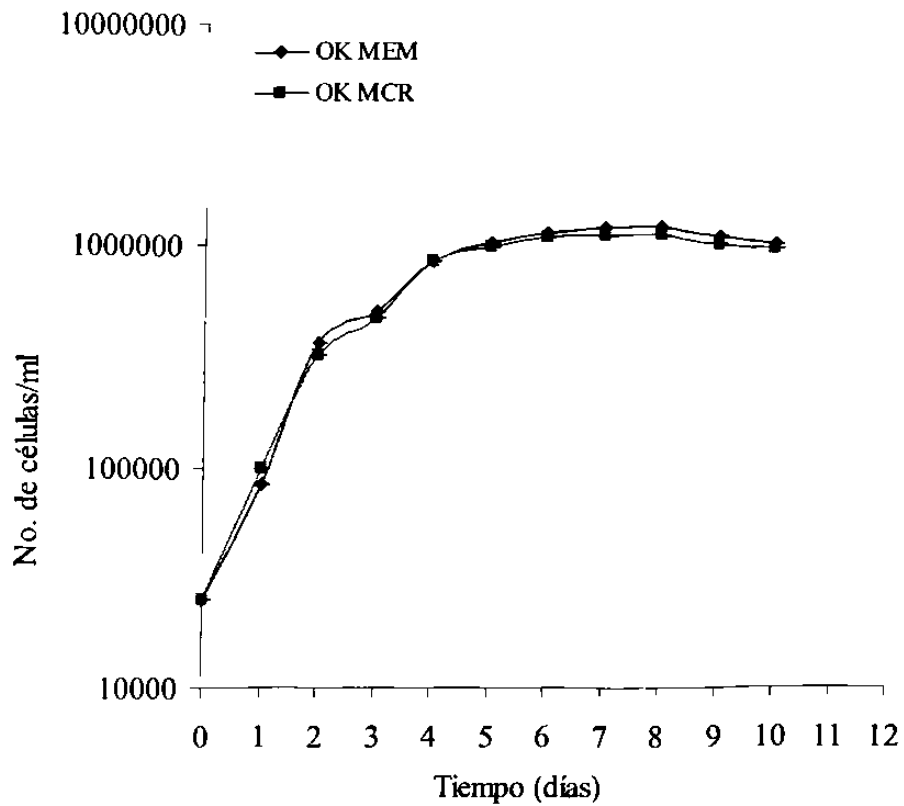


Figura 4. Curva de crecimiento de la línea celular OK propagada en MEM y MCR

En la figura 5 se muestran los resultados de la cinética de la línea celular CHANG, en MCR. Se observa una tendencia de crecimiento similar a las cultivadas en MEM, al igual que en las células OK, a las 24 h se observó la fase exponencial que se extendió hasta los 120 h. Las células mostraron tiempos de duplicación de 25.80 en MEM y de 26.54 h en MCR.

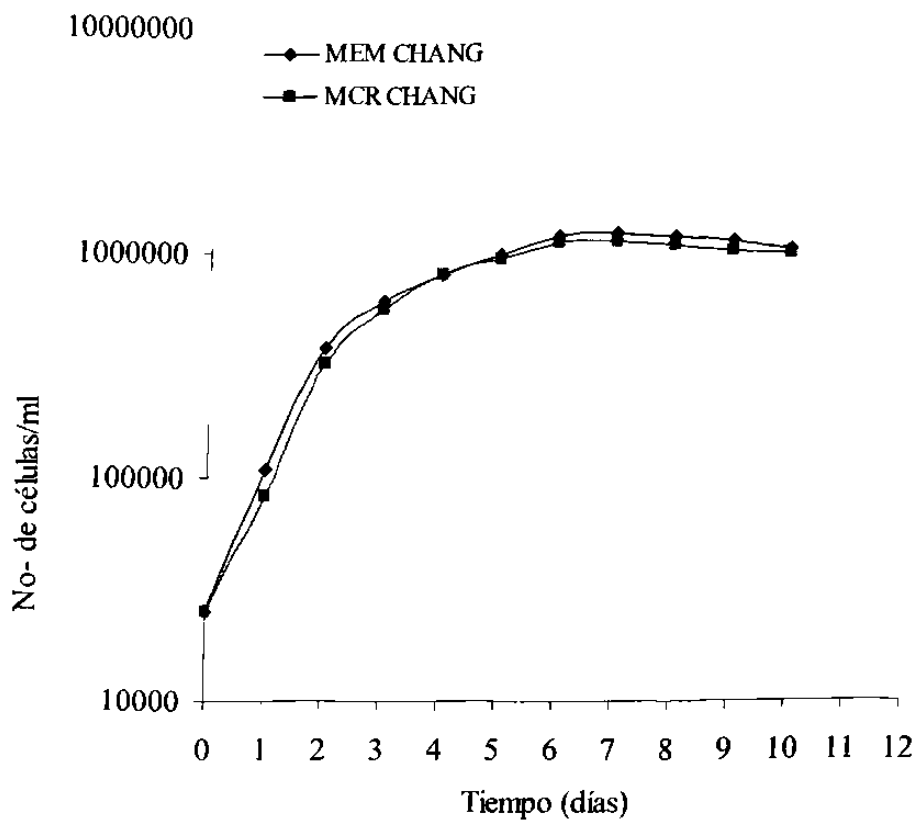


Figura 5. Curva de crecimiento de las células CHANG propagada en MEM y MCR

En la figura 6, se muestran la cinética de crecimiento de las células LLC-PK1 en MCR, la cual presentó menor tiempo de duplicación (27.87 h) con respecto a las células cultivadas en MEM (29.95 h).

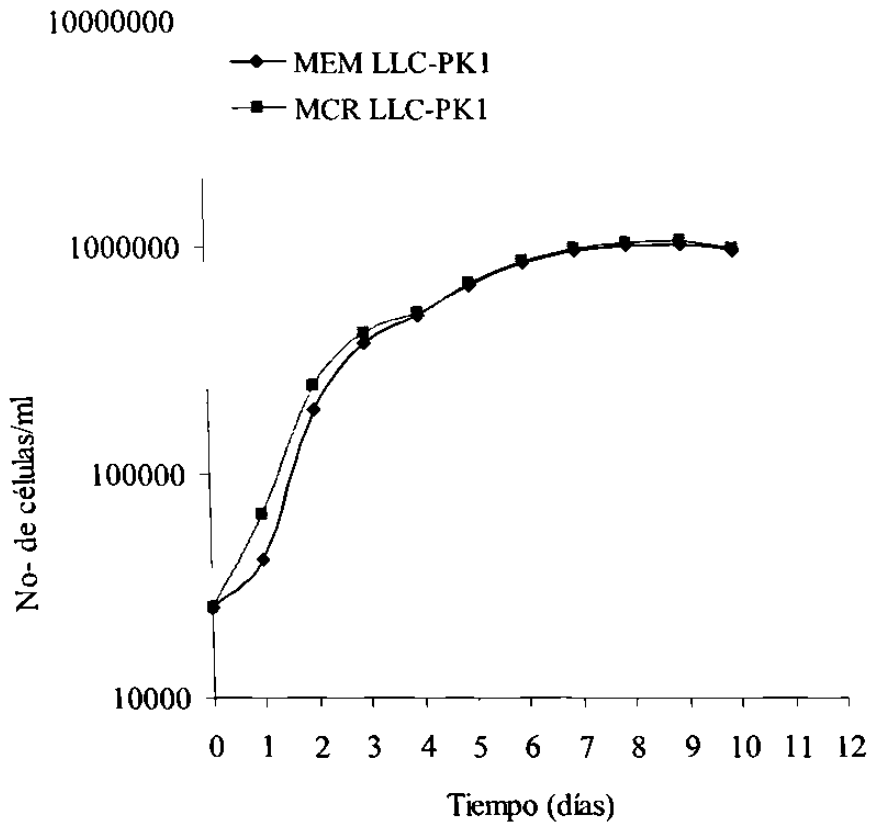


Figura 6. Curva de crecimiento de las células LLC-PK₁ propagada en MEM y MCR

Al comparar el número de células por día, de cada línea celular mediante la prueba Mann - Whitn debido a que seguían una distribución normal según el estadístico Kolmogorov- Smirnov), no se encontraron diferencias significativas entre las líneas celulares cultivadas en MEM y las cultivadas en MCR con una $p < 0,05$.

7.6. Morfología de las células cultivadas en MEM y MCR

De acuerdo con el análisis morfológico realizado a monocapas confluentes de células OK (figura 7 a - b), CHANG (figura 8 a - b) y LLC-PK₁ (figura 9 a - b) en el pasaje No. 30 en el medio MCR, no se observaron diferencias con respecto a las células cultivadas en MEM. Lo anterior, tomando en cuenta estándares morfológicos tales como la forma del núcleo, aspecto del citoplasma, distribución de la cromatina, presencia de nucleolos y relación núcleo-citoplasma.

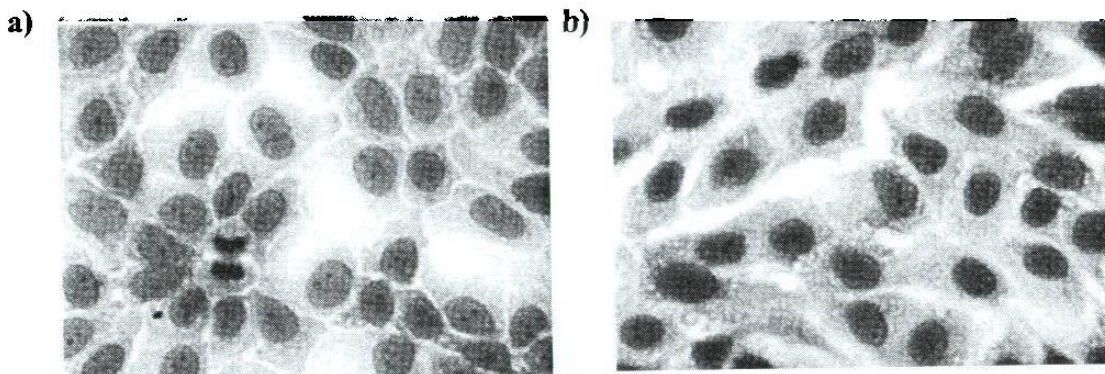


Figura 7. Morfología de las células OK propagadas en a) MEM y b) en MCR (40 X).

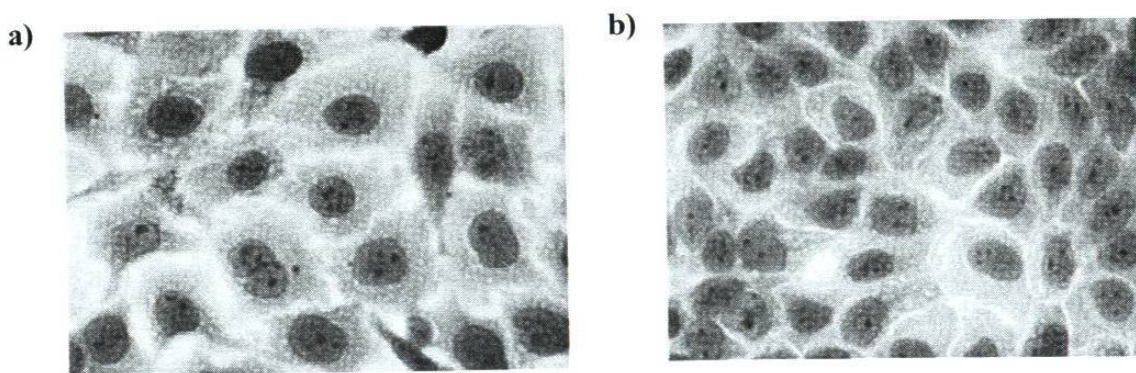


Figura 8. Morfología de las células CHANG propagadas en a) MEM y b) en MCR (40 X).

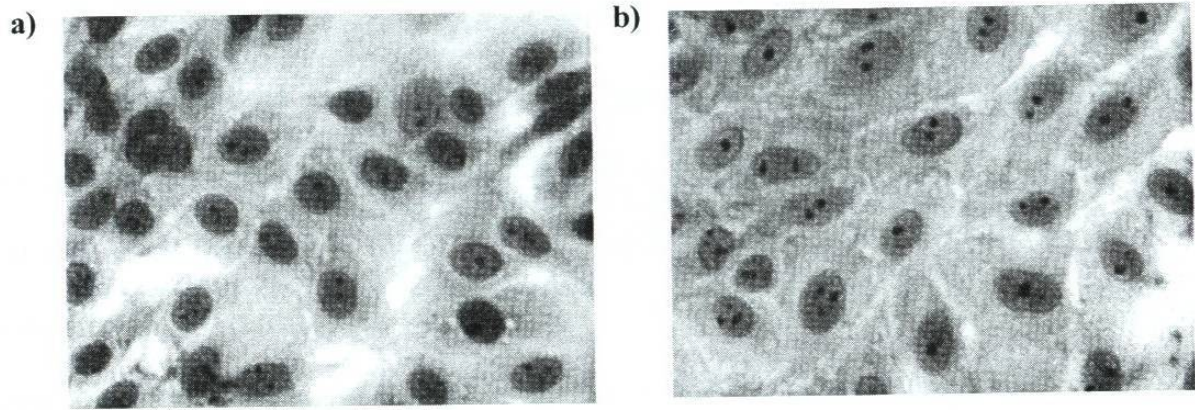


Figura 9. Morfología de las células LLC-PK₁ propagadas en a) MEM y b) en MCR (40 X).

7.7. Ensayo de citotoxicidad con HgCl₂

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad muestran el efecto tóxico de concentraciones variables de mercurio sobre las células OK, CHANG y LLC-PK₁ en MCR y en MEM, medida en función de la capacidad de enzimas deshidrogenasas presentes en las células vivas, para reducir el MTT. La absorbancia a 545 nm es directamente proporcional al número de células viables. Como se observa en las figuras 10, 11 y 12, la concentración de 20 μM de HgCl₂ disminuye notablemente la viabilidad.

Al comparar los valores mediante la prueba ANOVA de un solo factor, no se encontraron diferencias significativas entre las líneas celulares cultivadas en MEM y las cultivadas en MCR con una $p < 0,05$.

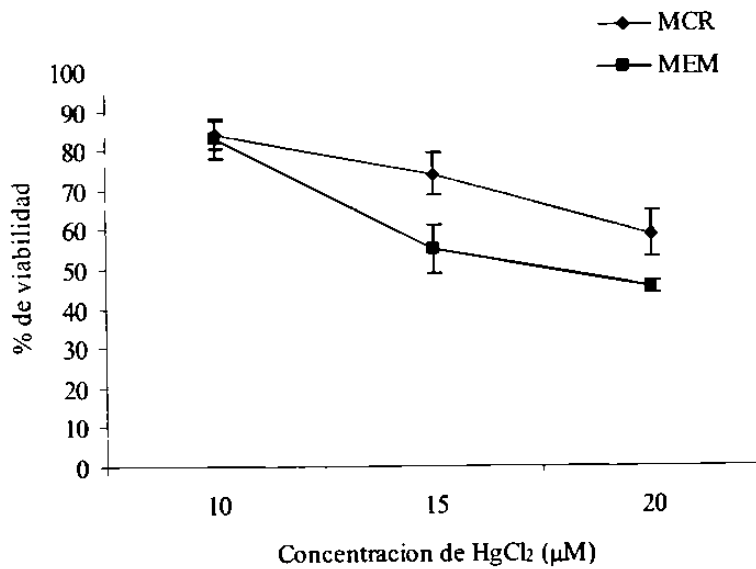


Figura 10. Efecto del cloruro mercúrico sobre la viabilidad de las células OK. Las células se incubaron por 6 h a 37°C y atmósfera de CO₂ con 10, 15 y 20 μM de HgCl₂. Promedio ± DE de cuatro experimentos por triplicado.

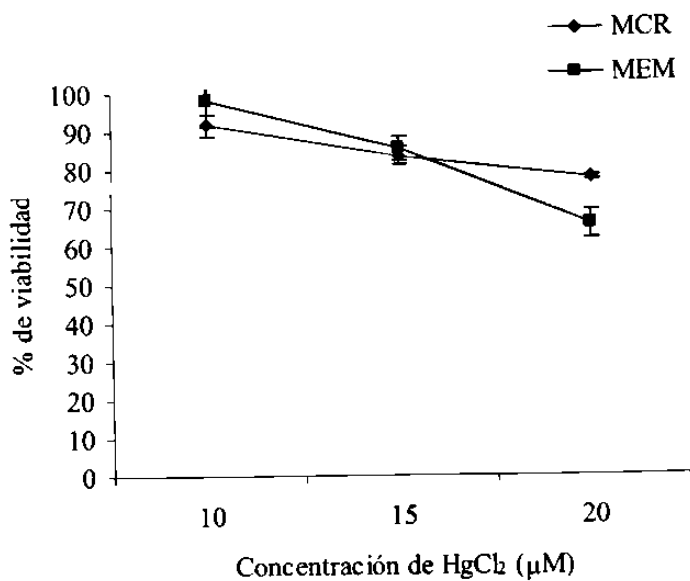


Figura 11. Efecto del cloruro mercúrico sobre la viabilidad de las células de CHANG. Las células se incubaron por 6 h a 37°C y atmósfera de CO₂ 10, 15 y 20 µM de HgCl₂. Promedio ± DE de cuatro experimentos por triplicado.

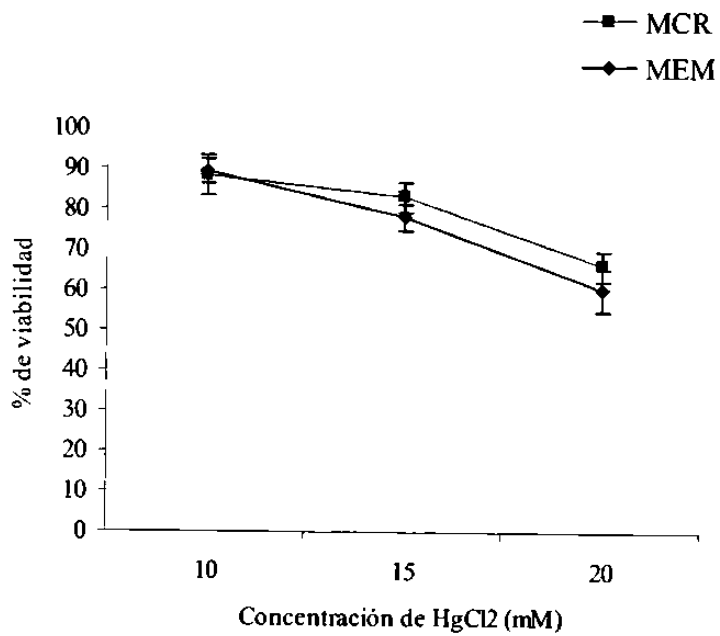


Figura 12. Efecto del cloruro mercúrico sobre la viabilidad de las células LLC-PK₁. Las células se incubaron por 6 h a 37°C y atmósfera de CO₂ con 10, 15 y 20 μ M de HgCl₂. Promedio \pm DE de cuatro experimentos por triplicado.

7.8. Determinación de proteínas totales de las células en MEM y MCR

La figura 13, 14 y 15 se muestra la concentración de proteínas totales de las células OK, CHANG y LLC-PK₁ respectivamente, propagadas tanto en MEM como en MCR; a partir de inóculos de 5000, 10 000, 20 000 y 30 000 células/ml, sembradas como se describe en la sección de métodos.

Las células en MCR y en MEM no presentan diferencias significativas entre las concentraciones de proteínas de las tres líneas celulares estudiadas con una $p < 0,05$, según el análisis estadístico de ANOVA de un solo factor.

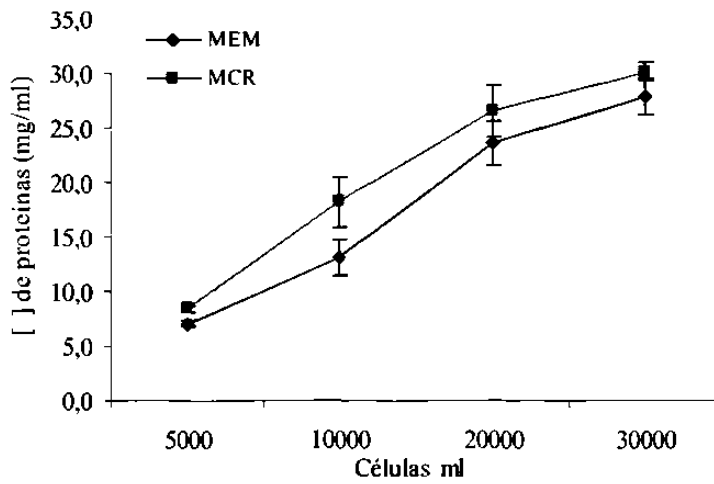


Figura 13. Concentración de proteínas totales de la línea celular OK, en MEM y MCR. Promedio \pm DE de tres experimentos por triplicado.

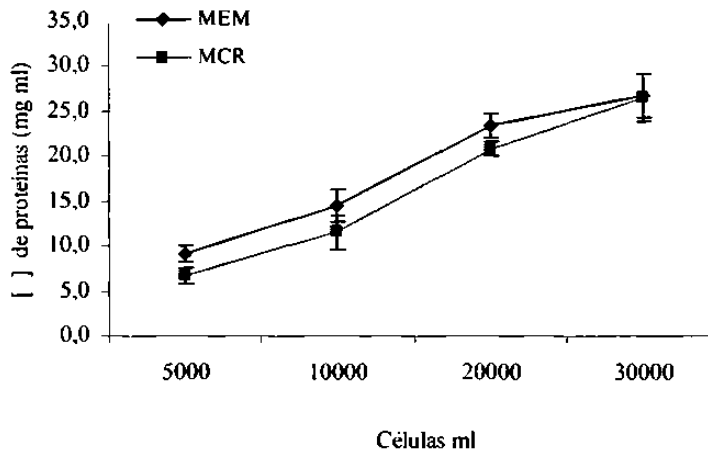


Figura 14. Concentración de proteínas totales de la línea celular de CHANG, en MEM y MCR. Promedio \pm DE de tres experimentos por triplicado.

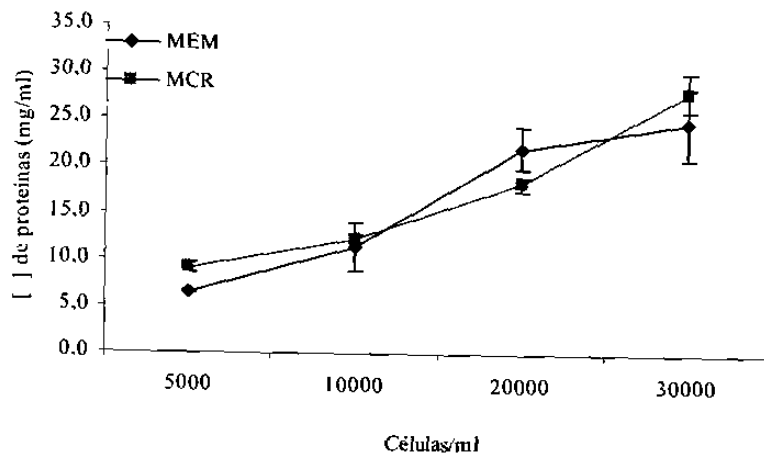


Figura 15. Concentración de proteínas totales de la línea celular LLC-PK₁, en MEM y MCR. Promedio \pm DE de tres experimentos por triplicado.

7.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS

En figura 16 se puede observar el perfil de proteínas en geles de poliacrilamida entre las líneas celulares cultivadas en MEM y MCR. Se observa que los perfiles electroforéticos fueron similares; aunque existe diferencia en la intensidad en una de las bandas de las células LLCPK-1 cultivadas en MCR con respecto a la misma línea celular proveniente de MEM.

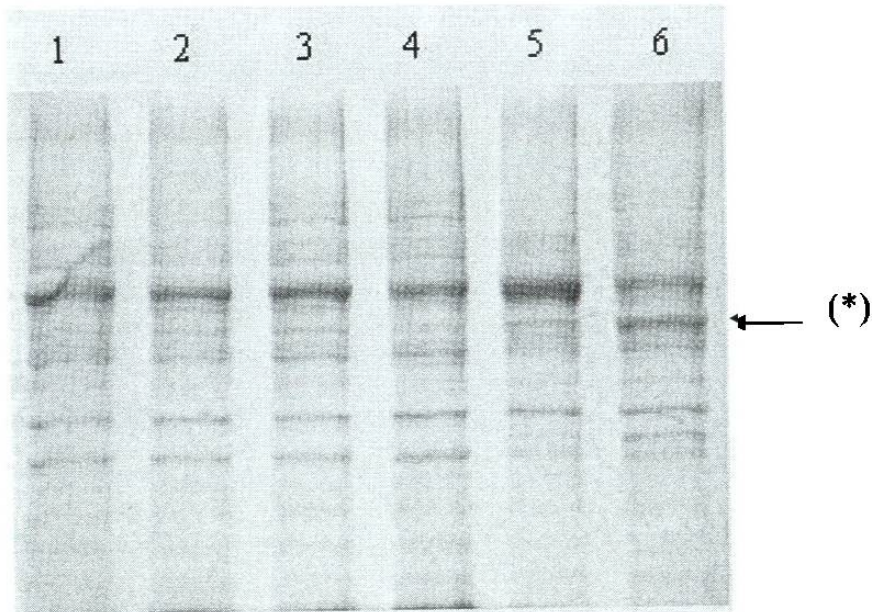


Figura 16. Perfil electroforético de proteínas totales. En el carril 1 se muestran las células OK en MEM, en el 2 las células OK en MCR. En los carriles 3 y 4 las células de CHANG en MEM y MCR respectivamente. En los carriles 5 y 6 se muestran las células LLC-PK₁ en MEM y MCR respectivamente.

* Diferencia en la intensidad en una de las bandas de las células LLCPK-1 cultivadas en MCR con respecto al MEM

7.10. Criopreservación de las células en MEM y MCR

En la tabla IV, se muestran los valores del porcentaje de viabilidad de las células cultivadas en MEM y MCR, después de un proceso de descongelación de 30 y 120 días para las células en MCR y 120 para las células en MEM.

Tabla IV. Porcentaje de viabilidad de las líneas celulares en MCR y MEM

Línea celular	OK			CHANG			LLCPK-1		
	MEM	MCR		MEM	MCR		MEM	MCR	
Pasaje	85	31	50	76	31	50	S/P*	19	33
Tiempo de congelación (días)	120	120	30	120	120	30	120	120	30
% Viabilidad	95	92	98	94	93	94	92	90	92

(*Sin pasaje)

8. DISCUSION

El diseño del medio de cultivo con ingredientes alternos se inició con una formulación a base de peptona de colágeno y extracto de levadura de grado industrial (medio MD), con una concentración de 1 g de peptona y 0.25 g de extracto de levadura, sin embargo con esta formulación las tres líneas celulares estudiadas en este trabajo (OK, CHANG y LLCPK-1) se adaptaron al cultivo hasta una mezcla de MEM:MD de 25:75, determinado a través de la formación de monocapas confluentes. Sin embargo al transferirlas a la mezcla 10:90 (MEM:MD) no lograron proliferar. Por este motivo se decidió aumentar la concentración del extracto de levadura a 0.75 g, considerando que ésta puede aportar las vitaminas presentes en el MEM; lo anterior, debido a que considerando que el extracto de levadura es rico en vitaminas hidrosolubles particularmente del grupo B. Las vitaminas son nutrientes orgánicos requeridos por las células de mamíferos, sin embargo muchos mamíferos han perdido la habilidad de sintetizarlas, por lo que deben de ser adicionadas suplidas como nutrientes, con la función de facilitar la transformación que siguen los substratos a través de las vías metabólicas. Además muchas vitaminas hidrosolubles son precursores de co-enzimas que son necesarias para numerosas reacciones bioquímicas en las células (Abadie F, 1968; Flandreau JC, 1969). La respuesta de las células al cambio de la concentración del extracto de levadura fue muy favorable y las líneas celulares se cultivaron hasta en una proporción de MEM:MD de 5:95 y después de 5 pasajes se adaptaron al 100 % del medio MD, sin embargo después de 96 h de incubación las células morían, por lo que se aumentó la concentración de peptona de colágeno de 1 g a 1.2 g y además se agregó

una mezcla de vitaminas al 1.5, a pesar este cambio las células no proliferaron en el medio MD al 100%, por lo cual solamente se cultivaron hasta la mezcla 5:95 (MEM:MD). No obstante en esta última mezcla se observó que el crecimiento celular fue más lento y se presentaron alteraciones morfológicas con respecto a las cultivadas en el medio control. Se supuso que en los componentes utilizados podrían existir elementos desfavorables al crecimiento celular.

Con el fin de determinar la presencia y concentración de elementos tóxicos en la peptona y extracto de levadura de grado industrial, se realizó el análisis de metales; los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de concentraciones elevadas de hierro y plomo respectivamente, así como disminución en los niveles de zinc en el extracto de levadura grado industrial. El hierro es considerado un metal esencial en la actividad celular normal, sin embargo en exceso puede causar toxicidad en células hepáticas (Hughes, 2002; Rouault, 2003). Se ha encontrado que el Fe libre inhibe la expresión de la ferroportina en la línea celular PC12 de rata tratada con factor de crecimiento nervioso (Yanming *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos también muestran que el extracto de levadura grado industrial contiene cantidades altas de plomo, un elemento no esencial y tóxico (Tchounwou *et al.*, 2004). Se han realizado diversos estudios para observar el efecto tóxico del plomo sobre distintas líneas celulares, en el cual se observó que su efecto principal fue sobre la síntesis de DNA, lo que influyó directamente sobre la proliferación celular (Fischer y Skreb, 1980).

De acuerdo a lo anterior, se puede sugerir que la presencia y la alta concentración de metales pesados tales como plomo y de hierro, así como la disminución de zinc, podrían ser los responsables de que no se haya logrado la adaptación de las tres líneas celulares utilizadas en el 100 % medio de cultivo propuesto (MD), sino solamente hasta la mezcla 25:75 (MEM:MD).

Se continuó con la investigación, utilizando la peptona y extracto de levadura con calidad de cultivo celular (se le denominó medio MCR), ya que los efectos benéficos de hidrolizados de proteínas se conocen desde hace más de dos décadas. Los hidrolizados de proteínas son generalmente usados como mezclas de nutrientes balanceadas que pueden reemplazar total o parcialmente el suero o utilizarse como aditivo para los medios de cultivo celular (Franěk *et al.*, 2000) Asimismo la peptona de colágena y el extracto de levadura son hidrolizados de proteínas de bajo costo por lo que son muy atractivos para la aplicación en la tecnología del cultivo celular.

Con esta formulación (MCR) se logró adaptar las células hasta el 100% de dicho medio; lo cual se relaciona con la adaptación de diversas líneas celulares en medios de cultivo con diferentes hidrolizados de proteínas, tales como peptonas y extractos de levadura (Schlaeger y Schumpp., 1992; Jan *et al.* 1994., Gaudreau *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos sugieren que la peptona y el extracto de levadura de calidad cultivo celular usados en el medio de cultivo contienen una relación de metales adecuada para los requerimientos nutricios, además de la fuente de nitrógeno y vitaminas juegan un rol importante para la adaptación de las líneas celulares de mamífero al 100% del medio diseñado (MCR). Asimismo existen trabajos con medios de cultivo libres de suero, con los cuales se ha observado que las líneas celulares logran adaptarse favorablemente y

presentar un crecimiento similar o superior a los medios utilizados como control (Hammond *et al.*, 1984; Kallel *et al.*, 2002; Mochizuki., 2005).

Con respecto a la cinética de crecimiento de las células OK, CHANG y LLC-PK₁, tanto en MEM como en MCR se observó un patrón de crecimiento similar. En los dos medios se distingue una curva con fases bien diferenciadas; al comparar los valores mediante la prueba Mann–Whitney no se encontraron diferencias significativas entre las líneas celulares cultivadas en MEM y las cultivadas en MCR con una $p < 0,05$. Buretteau *et al.*, 2003, observaron que el crecimiento de las células CHO aumentaba en un 30%, cuando se utilizó un medio de cultivo libre de proteína fortificado con peptonas de origen vegetal.

Se realizó un análisis al microscopio de luz con el objetivo de comparar la morfología de las células cultivadas en el medio MCR con las propagadas en MEM. Los estándares morfológicos tomados en cuenta para el análisis fueron la forma del núcleo, del citoplasma, distribución de la cromatina, presencia de nucleolos y relación núcleo-citoplasma. No se observaron diferencias morfológicas entre los tres tipos celulares que se cultivaron en el MCR con respecto a las crecidas en el medio control MEM. En base a estos resultados se puede considerar que las células lograron adaptarse al medio MCR. Gorfien *et al.*, 1993 realizó un estudio donde se cultivaron distintas líneas celulares de mamíferos (células endoteliales de arteria pulmonar de bovino, porcino, ovino, de vena de canino y de cordón umbilical) en medios de cultivo libres de suero donde utilizó el análisis morfológico como parámetro para observar la correcta adaptación en dicho medio, todas las líneas celulares en el medio libre de suero

mostraron una morfología normal al compararlas con las propagadas en su medio original.

Con el propósito de determinar la respuesta de las células (OK, CHANG y LLCPK-1) frente a un agente tóxico (HgCl_2), cultivos provenientes de MCR y MEM fueron expuestos durante 6 h a diferentes dosis de HgCl_2 . La respuesta citotóxica fue analizada mediante el ensayo de reducción del MTT. Los resultados muestran que las células propagadas en el medio MCR presentaron una susceptibilidad similar al efecto citotóxico en todas las concentraciones probadas con respecto las propagadas en el medio control en las tres líneas celulares y en ambos medios se observó que el efecto más tóxico fue con la concentración de 20 μM después. Los resultados anteriores se relacionan con los ensayos realizados por Carranza-Rosales *et al.*, 2005 en los cuales observaron la susceptibilidad de la línea celular OK frente a diferentes concentraciones de HgCl_2 (1, 10 y 15 μM) donde encontraron que el efecto mas marcado sobre las células OK fue después de 6 a 9 h con la concentración de 15 μM . La toxicidad de los metales pesados depende del tipo y la especie química del metal, y para cada una de ellas, dependiendo del modelo de estudio, la concentración tóxica es diferente (Klaassen, 1996). Por mencionar algunos ejemplos de dosis tóxicas en modelos celulares, Bucio *et al.*, 1995, demostraron que concentraciones de 50 y 100 μM de HgCl_2 son tóxicas para la línea celular hepática WRL-68; mientras que Suwalsky *et al.*, 2000, utilizaron dosis de hasta 500 μM de HgCl_2 para observar efectos dañinos en eritrocitos humanos. Por su parte, Araragi *et al.*, 2003, emplearon concentraciones en el rango de 1-10 mM del metal para inducir apoptosis en una línea de células de leucemia humana. La sensibilidad de las células utilizadas en este trabajo en respuesta a dosis tóxicas de cloruro mercúrico, es característica de cada una de ellas.

Con respecto a la concentración proteínas totales, para las células OK en MCR es 2.62% mayor que las células en MEM, sin embargo las células de CHANG en MCR fueron 11.26% menor que las células de CHANG en MEM y las LLCPK-1 presentaban el 17.24% menos que las LLCPK-1 cultivadas en MEM. Sin embargo al ser comparadas estadísticamente con la prueba ANOVA de un solo factor ($p < 0.05$) no se encontraron diferencia significativa entre las líneas celulares en MEM y MCR.

Con el objetivo de observar la diferencia entre el perfil de proteínas de las células cultivadas en el medio MCR y en MEM se hizo una electroforesis en geles de poliacrilamida. Los resultados mostraron que no existen diferencias entre la concentración de las bandas de las líneas celulares OK y CHANG; a diferencia de las células LLC-PK₁ en MCR la cual presento mayor concentración en una de sus bandas con respecto al MEM. Se han realizado estudios para caracterizar el perfil de proteínas de distintas líneas celulares, para evaluar nuevos medios de cultivos. Espinoza *et al*, 2003 determinaron el perfil de proteínas por electroforesis PAGE- SDS de *Gardnerella vaginalis* para evaluar tres medios de cultivo CTS, CTS- se y CC, los cultivos se concentraron a 800 g y se procesaron. En los resultados se observó un patrón similar para todas las variables, se identificaron 14 proteínas de diferentes pesos moleculares. La proteína de 14 kDa, se expresó en todas las variantes, excepto para los cultivos CTS- se, cuando se incubaron en aerobiosis. Por otra parte Pham *et al*, 2003, demostraron que el aditivo de peptona GPN3, presentaba un efecto positivo para la expresión de proteínas de la línea celular 293SFE creciendo en un medio libre de suero.

Con la finalidad de analizar la capacidad de las células para soportar un proceso de criopreservación después de ser cultivadas en el medio MCR, procedimos a congelar las células como se describe en la sección de métodos. Después de 30 días para las células en MCR y 120 días para las células en MEM de permanecer congeladas en nitrógeno líquido determinamos la viabilidad celular con azul de tripano. Los resultados muestran que el medio MCR soporta el proceso de criopreservación celular y mantiene las células con un alto porcentaje de viabilidad al igual que el medio de referencia MEM. Existen otros estudios donde se ha determinado la viabilidad de las células después de un proceso de criopreservación, por ejemplo, Choi JW *et al.*, 2007, evaluaron las condiciones óptimas de congelación de cultivos primarios de riñón de embrión de pollo (CEK), ellos observaron que la viabilidad de las células fue de un 50.8%, cuando la concentración de DMSO fue de 20% (v/v) por lo que ellos mencionan que el proceso de criopreservación puede facilitar el mantenimiento de un stock de las células primarias CEK para el laboratorio. Por su parte, Sui *et al*, 2007, investigaron el proceso de criopreservación en 5 líneas celulares de mamíferos cultivadas en un medio con diferentes concentraciones de d-alosa. Las líneas celulares incluidas fueron OVCAR-3 (human ovarian cancer), HeLa (human cervical cancer), HaCaT (human skin keratinocytes), HDF (human dermal fibroblasts) and NIH3T3 (murine fibroblasts). Las células fueron descongeladas a las 24 horas, 7 y 30 días después; los resultados obtenidos sugieren que la d-alosa provee un efecto de protección para las células de mamíferos en el proceso de congelación. Paranjape 2003, adaptaron la línea celular de riñón (PS) a temperaturas de 40°C cuando en realidad crecen a 37 °C. La viabilidad de las células a 37 °C y a 40 °C fue entre 90-95%. Esta característica del medio de cultivo diseñado es deseable para la conservación de las líneas celulares a largo plazo.

9. CONCLUSIONES

9.1 Conclusión general

Se diseñó un nuevo medio de cultivo MCR para la propagación de células de mamífero tales como: OK, CHANG y LLCPK-1 a base de peptona de colágena y extracto de levadura, que conserva las características fisiológicas similares a las cultivadas en el medio control MEM.

9.2 Conclusiones específicas.

Se logró adaptar a la mezcla 25:75 (MEM:MD) los cultivos de células OK, CHANG y LLCPK-1 utilizando una fuente de proteínas y vitaminas (grado industrial).

La alta concentración de metales tales como plomo y hierro y una menor concentración de zinc presentes en las fuentes de proteínas y vitaminas grado industrial, podrían ser las responsables de la adaptación de las células solamente hasta la mezcla 25:75 (MEM:MD).

Se adaptaron exitosamente las células OK, CHANG y LLC-PK₁ al nuevo medio de cultivo MCR, ya que no se encontró diferencias significativas en las cinéticas de crecimiento de las células propagadas en ambos medios de cultivo: MEM y MCR

En las cinéticas de crecimiento de las células OK, CHANG y LLC-PK₁ tanto en MEM como en MCR no se encontraron diferencias significativas tanto en las células propagadas en el medio de cultivo MEM como en MCR por lo que se puede decir por lo tanto que las células lograron adaptarse favorablemente al nuevo medio de cultivo MCR.

La morfología de las células OK, CHANG y LLC-PK₁ observadas al microscopio de luz, cultivadas en el nuevo medio de cultivo MCR no presenta diferencias respecto las células cultivadas en el medio control MEM.

Las células OK, CHANG y LLC-PK₁ frente al cloruro mercurico, fueron igualmente susceptibles en ambos medios de cultivo: MCR y MEM.

La concentración de proteínas totales de las tres líneas celulares OK, CHANG y LLC-PK₁ no mostró diferencia significativa respecto a las células cultivadas en el nuevo medio de cultivo MCR y el medio control MEM.

Los patrones de proteínas por PAGE-SDS entre las líneas celulares cultivadas en el nuevo medio de cultivo MCR y el medio control MEM fueron similares, aunque existe diferencia en la concentración en una de las bandas de la línea LLC-PK₁ propagada en el medio de cultivo MCR con respecto a la proveniente a las del medio control MEM.

Las células cultivadas en el nuevo medio de cultivo MCR conservaron características fisiológicas similares a las cultivadas en el medio de cultivo control MEM, por lo tanto el nuevo medio de cultivo MCR es una alternativa para el cultivo de células de mamíferos.

LITERATURA CITADA

Abadie F. 1968. Requirement of several yeasts for hydrosoluble vitamins. *Mycopathol Mycol Appl.* Oct 31; 36(1):81-93.

Araragi S, Kondoh M, Kawase M, Saito S, Higashimoto M, Sato M. 2003. Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells. *Toxicology* 184:1-9.

Bertheussen K. 1993. Growth of cells in a new defined protein-free medium. *Cytotechnology.* 11(3):219-31.

Bucio L, Souza A, Albores A, Sierra A, Chávez E, Cárabez A, Gutiérrez Ruiz MC. 1995. Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology* 102:285-99.

Burrows MT. 1913. The tissue culture as a physiological method. *Trans. Congr. Phys. Surg.* 9:77.

Burteau, C. C., Verhoeve, F. R., Mols, J. F., Ballez, J. S., Agathos, S. N. y Schneider, Y. J. 2003. Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon- α producing CHO cell line. *Journal of In vitro cellular & developmental biology. Animal* 39, 291–296.

Carranza-Rosales P, Said-Fernandez S, Sepulveda-Saavedra J, Cruz-Vega DE, Gandolfi AJ. 2005. Morphologic and functional alterations induced by low

doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology*. January; 210: 111 – 121.

Carranza-Rosales P, Guzmán-Delgado NE, Cruz-Vega DE, Balderas-Rentería I, Gandolfi AJ. 2006. DMPS reverts morphologic and mitochondrial damage in OK cells exposed to toxic concentrations of HgCl₂. *Cell Biol Toxicol*. May;23(3):163-76.

Carreón Treviño JG. 2001. Actividad microbiana de *A. millefolium* y *H. arthenium* sobre algunos microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales. Tesis de Licenciatura. FCB, UANL. México.

Chang RS. 1954. Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc Soc Exp Biol Med*. Nov; 87(2):440-3.

Chuman L, Fine LG, Cohen AH, Saier MH. 1982. Continuous growth of proximal tubular kidney epithelial cells in hormone-supplemented serum-free medium. *J Cell Biol*. Sep; 94(3):506-10.

Choi JW, Shin EK, Ha SH, Kim HA, Kim YH, Kim JS, Hahn TW, 2007 Optimal conditions for cryopreservation of primary chicken embryo kidney cells with dimethyl sulfoxide, *Mol Biotechnol*. Mar;35(3):237-42.

Castro-Garza J, Anaya-Velázquez F, Said-Fernández S, González-Garza MT. 1996. Comparable growth of a *Trichomonas vaginalis* strain in PEHPS and TYI-S-33 media. *Arch Med Res*. Winter; 27(4):567-9.

Dodson MV, Schaeffer WI. 2000. Generation of useful cell culture data. *Methods Cell Sci*. Mar; 22(1):27-8.

Dodson MV, Mathison BA, Mathison BD. 1990. Effects of medium and substratum on ovine satellite cell attachment, proliferation and differentiation in vitro. *Cell Differ Dev.* Jan; 29(1):59-66.

Dodson MV, McFarland DC, Grant AL, Doumit ME, Velleman SG. 1996. Extrinsic regulation of domestic animal-derived satellite cells. *Domest Anim Endocrinol.* Mar; 13(2):107-26.

Diamond LS, Clark CG, Cunnick CC. 1995. YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol.* May-Jun; 42(3):277-8.

Eagle H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122: 501-504.

Eagle H. 1955. The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in Tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. *Journal of experimental medicine* 102: 68 -71.

Emil Rudolf, Miroslav Cervinka, Jaroslav Cerman, Ladislava Schroterova, 2005, Hexavalent chromium disrupts the actin cytoskeleton and induces mitochondria-dependent apoptosis in human dermal fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 19:713-723.

Espinosa Ayala (2001) Licenciatura : Identificación de los compuestos de *Marrubium vulgare* y *Juliana adstringens* con actividad antimicrobiana sobre algunos microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales.

Eagle, H. 1955. The specific amino acid requirements cell cultures. *Journal of Science.* 130, 432- 438.

- Elias, S. 2002. Efecto de las condiciones operacionales de fermentación sobre la producción de *Paecilomyces fumosoroseus* cepa 612 en cultivo sumergido. En: *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD. 1994. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod*. May; 50(5):1027-33.
- Espinosa I, Lorenzo M, Riveron Y. 2003. Evaluación de diferentes medios líquidos para el cultivo de *Gardnerella vaginalis* y caracterización del perfil de proteína por electroforesis PAGE-SDS. *Rev Cubana Med Trop*, Mayo, vol.55, no.2, p.69-75.
- Flandreau JC. 1969. Study on the requirements of an insect cell line (EPa strain). II. Hydrosoluble vitamins. *Exp Cell Res*. Mar; 54(3):399-402.
- Franek F, Katinger H. Specific effects of synthetic oligopeptides on cultured animal cells. 2002. *Biotechnology progress*. Jan-Feb; 18(1):155-8.
- Franek F, Hohenwarter O, Katinger H. 2000. Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnology progress*. Sep-Oct; 16(5):688-92.
- Franek F, Fussenegger M. 2005. Survival factor-like activity of small peptides in hybridoma and CHO cells cultures. *Biotechnology progress*. Jan-Feb; 21(1):96-8.
- Fischer, A. B. y Skreb, Y. 1980. Cytotoxicity of manganese for mammalian cells in vitro--comparisons with lead, mercury and cadmium. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale B, Hygiene* 171, 525-37.
- Freshney, R. 2000. Media. En: *Culture of Animal Cells a manual of basic technique* (4th ed). (Wiley-Liss, Inc.). Pp. 89 – 104. New York, USA.

Gstraunthaler Gerhard, Dieter Steinmassl, Walter Paffler, 1990. Renal cell cultures: a toll for studying tubular function and nephrotoxicity, *Toxicology Letters*, 53.1-7.

Gorfien S, Spector A, Peluca D and Weiss S. 1993. Growth and physiological functions of vascular endothelial cells in a new serum-free medium (SFM). *Experimental cell research*. Jun; 206(2):291-301.

González-Garza MT, Said-Fernández S. 1989. Reliability of the PEHPS culture medium for the in vitro evaluation of antiamebic drugs. *Arch Invest Med (Mex)*. Jan-Mar; 20(1):29-32.

Gaudreau H, Renard N, Champagne CP, Van Horn D. 2002. The evaluation of mixtures of yeast and potato extracts in growth media for biomass production of lactic cultures. *Can J Microbiol*. Jul; 48(7):626-34.

Gorfien S, Paul B, Walowitz J, Keem R, Biddle W, Jayme D. 2000. Growth of NS0 cells in protein-free, chemically defined médium. *Biotechnol Prog*. Sep-Oct; 16(5):682-7.

Gekle M, Mildemberger S, Freudinger R, Silbernagl S. 1995. Kinetics of receptor-mediated endocytosis of albumin in cells derived from the proximal tubule of the kidney (opossum kidney cells): influence of Ca²⁺ and cAMP. *Pflugers Arch*. Jul; 430(3):374-8.

Galán Franco, Lucila A., Carreón Treviño Gerardo, Morales Ramos Lilia H., Galán Wong Luis J. y Quintero Zapata Isela. 2003. Producción de blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* en diferentes medio de cultivo. XXVI Congreso Nacional de Control Biológico. ISBN 970-27-0415-4 pp: 383-386.

González Solís LN. 2004. Potencial fungicida de los extractos obtenidos de follaje de *Helietta parvifolia* (Rutaceae) y su aplicación de Poscosecha. Tesis de Doctorado con especialidad en Biotecnología en ITSSM. México.

García Galvan VA. 2004. Análisis fitoquímico y evaluación de actividad fungica para dermatofitos de los extractos de *Junglans regia*, *Ruta chalepensis*, *Heterotheca inuloides* y *Thymus vulgaris*. Tesis de Licenciatura. FCB, UANL. México.

Halliwell Barry, Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem, 2003. FEBS letters , 540:3-6.

Ham, R. G. & McKeehan, W. L. (1978). Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells. In Vitro 14: 11 – 22.

Ham RG, McKeehan WL. 1979. Media and growth requirements. Methods Enzymol; 58:44-93.

Hammond SL, Ham RG, Stampfer MR. 1984. Serum-free growth of human mammary epithelial cells: rapid clonal growth in defined medium and extended serial passage with pituitary extract. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep; 81(17):5435-9.

Hartree EF. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem. 48: 422-427.

Heidemann R. Zhang C. Qi Hanshi, Rule JL, Rozales C, Park S, Chuppa S, Ray M, Michaels J, Konstantinov K, Naveh D. 2000. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in

high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology* 32: 157-167.

Hink WF. 1970. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature*. May 2; 226(5244):466-7.

Hughes, W. 1996. The effects of environmentally hazardous substances on human health. En: *The book of Essentials of Environmental Toxicology*, (Taylor & Francis), Pp. 133 – 136. Philadelphia USA.

Hull RN, Cherry WR, Weaver GW. 1976. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro*. Oct; 12(10):670-7.

Iding K, Büntemeyer H, Gudermann F, Deutschmann SM, Kionka C, Lehmann J. 2001. An automatic system for the assessment of complex medium additives under cultivation conditions. *Biotechnol Bioeng*. Jun 20; 73(6):442-8.

Jan D.C, Jones S.J, Emery A.N, M. Al-Rubeai, Peptona, a low-cost growth-promoting nutrient for intensive animal cell culture. 1994. *Cytotechnology*, 16:17-26.

Kallel H, Jouini A, Majoul S, Rourou S. 2002. Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells. *J Biotechnol*. May 23; 95(3):195-204

Klaassen CD. 1996. Casarett & Doull's. *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. Chapter 23, Fifth Edition. Editor Curtis D Klaassen, Ed McGraw-Hill. New York, USA.

Koyama H, Goodpasture C, Miller MM, Teplitz RL, Riggs AD. 1978. Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). *In Vitro*. Mar; 14(3):239-46.

Luo Y, Chen G. 2007. Combined approach of NMR and chemometrics for screening peptones used in the cell culture medium for the production of a recombinant therapeutic protein. *Biotechnol Bioeng*. Feb 1; [Epub ahead of print].

Liu Y, Zhang SP, Cai YQ. 2007. Cytoprotective effects of selenium on cadmium-induced LLC-PK1 cells apoptosis by activating JNK pathway. *Toxicol. In Vitro*. Jun; 21(4):677-84.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage "T4". *Nature*. 227: 680.

Lifschitz MD. LLC-PK1 1982. Cells derived from pig kidneys have a defect in cyclooxygenase. *J Biol Chem*. Nov 10; 257(21):12611-5.

Lozano Contreras MG., Myriam Elías Santos, Isela Quintero Zapata, María Raquel Cruz de León y Luis J. Galán Wong. 2003. Producción de *Paecilomyces fumosoroseus* a nivel matraz y fermentador de 14 litros empleando un medio de cultivo de bajo costo. *Rev. Soc. Quím. Méx. XXVIII Congreso Mexicano de Química*. Vol. 47, Número Especial, 2003, ISSN 0583-7693 pp: 129.

Mizrahi A. 1977. Primatone RL in mammalian cell culture media. *Biotechnol Bioeng*. Oct; 19(10):1557-61.

Mochizuki M. 2006. Growth characteristics of canine pathogenic viruses in MDCK cells cultured in RPMI 1640 medium without animal protein. *Vaccine*. Mar 10; 24(11):1744-8.

Morgan, J. G., Morton, H. J., & Parker, R. C. 1950. Nutrition of animal cells in tissue culture; I: Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73: 1.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.

Murphy WH, Landau BJ. 1962. Clonal variation and interaction of cells with viruses. *Natl Cancer Inst Monogr.* Apr; 7:249-71.

Nishio T, Maruyama M, Yoshida T, Watanabe Y, Nishikawa M, Takakura Y. 2004. Secretion mode and subcellular localization of human interferon-beta exogenously expressed in porcine renal epithelial LLC-PK1 cells. *Biol Pharm Bull.* Oct;27(10):1653-5.

Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD, Stephanopoulos G, Wang DI. Metabolism of peptide amino acids by Chinese hamster ovary cells grown in a complex medium. 1999. *Biotechnology and bioengineering.* Feb 5;62(3):324-35.

Padrón Márquez Beatriz, Azucena Oranday Cárdenas, Catalina Rivas Morales, María Julia Verde Star. 2003. "Identificación de compuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos" *Revista Ciencia* Vol VI-3 pp 333 – 338.

Paranjape Smita, Patil B. R. Kadam V.D. 2003. Characterization of porcine stable kidney cell line adapted to hyper thermic temperature. *In vitro cellular & developmental biology.* Animal. 39:193-195.

Patena Guerrero. 2003. Licenciatura Estudio químico de los extractos de *Gnaphalium conoideum* y *Quassia amara* con actividad antimicrobiana sobre microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales.

PATENTE: Operación unitaria para la propagación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG – 1 para la producción de proteasas con potencial biotecnológico. Autores: Rivas Morales C, Salinas Carmona MC, Galán Wong LG y Medrano Roldán H. 1998. Fecha de Registro 16 12 1998. No. De solicitud 9810892. FCB, UANL. México.

Pham, P. L., Perret. S., Cass, B., Carpentier, E., St-Laurent, G., Bisson, L., Kamen, A. y Durocher, Y. 2003. Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293/EBNA1 cells: peptones additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biothechnology and bioengineering* 84, 332 – 342.

Pham, P., Perret, S., Cass, B., Carpentier, E., St-Laurent, G., Bisson, L., Kamen, A. y Durocher, Y. 2005. Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. *Biothechnology and bioengineering* 90, 332- 344.

Quintero Zapata I, Gutiérrez Flores D, Elías Santos M, Palacios Cortes L, Rivas Morales C. y Galán Wong LJ. 2002. Producción de blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus* en un microfermentador. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Volumen 44, No. 1.

Rabito CA, Karish MV. 1982. Polarized amino acid transport by an epithelial cell line of renal origin (LLC-PK1). The basolateral systems. *J Biol Chem*. Jun 25; 257(12):6802-8.

Rabito CA, Karish MV. 1983. Polarized amino acid transport by an epithelial cell line of renal origin (LLC-PK1). The apical systems. The basolateral systems. *J Biol Chem*. Feb 25; 258(4):2543-7.

Raychowdhury MK, Ibarra C, Damiano A, Jackson GR, Smith PR, McLaughlin M, Prat AG, Ausiello DA, Lader AS, Cantiello HF. 2004.

Characterization of Na⁺-permeable cation channels in LLC-PK1 renal epithelial cells. *J Biol Chem.* May 7; 279(19):20137-46.

Rivas, C. 1998. Diseño de un nuevo medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia brasiliensis* a escala piloto y la obtención de proteasas caseinolíticas. En: *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Rodríguez VJ, Vicente Ortega V, Canteras JM. 1997. Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad "in vitro" de líneas de melanoma. *Patología*; 30, 1: 18-27.

Schlaeger EJ. 1996. The protein hydrolysate, Primatone RL, is a cost-effective multiple growth promoter of mammalian cell culture in serum-containing and serum-free media and displays anti-apoptosis properties. *Journal of immunological methods.* Aug 14; 194(2):191-9.

Sieber-Blum Maya and Chokshi R. Hitesh. 1985. In vitro Proliferation and Terminal Differentiation of Quail Neural Crest Cells in a Defined Culture Medium. *Experimental Cell Research* 158: 267-272.

Said-Fernandez, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza, J., Mata-Cardenas, B. D., Navarro-Marmolejo, L., Lozano-Garza, G. y Martinez-Rodriguez, H. 1988. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 249-53.

Schumpp B, Schlaeger EJ. 1990. Optimization of culture conditions for high cell density proliferation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J Cell Sci.* Dec; 97 (Pt 4):639-47.

Schlaeger EJ, Schumpp B. 1992. Propagation of a mouse myeloma cell line J558L producing human CD4 immunoglobulin G1. *J Immunol Methods.* Jan 21; 146(1):111-20.

Sung YH, Lim SW, Chung JY, Lee GM. 2003. Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004 Feb; 63(5):527-36.

Suwalski M, Ungerer B, Villena F, Cuevas F, Sotomayor C. 2000. HgCl₂ disrupts the structure of the human erythrocyte membrane and model phospholipid bilayers. *J Inorg Biochem* 81:267-73.

Schwegler JS, Heuner A, Silbernagl S. 1989. Electrical properties of cultured renal tubular cells (OK) grown in confluent monolayers. *Pflugers Arch. Nov;* 415(2):183-90.

Silva Belmares SY, Rivas Morales C, Oranday Cárdenas A. y Verde Star MJ. 2002. Determinación de la actividad antimicrobiana y citotóxica de los extractos etanólicos de *Ricinos communis* y *Shimus molle*. XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica. NL, México.

Sui L, Nomura R, Dong Y, Yamaguchi F, Izumori K, Tokuda M, 2007. Cryoprotective effects of d-allose on mammalian cells. *Cryobiology.* Jun 8; [Epub ahead of print] *Cryobiology.* 2007 Jun 8; [Epub ahead of print].

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Foxx, D. N., Ishaque, A. B. y Shen, E. 2004. Lead-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 255, 161 – 70.

Treviño Neavez JF, Oranday Cardenas A, Verde Star J, Rivas Morales C, Morales Rubio ME, Rodríguez Garza RG. 2003. Actividad antibacteriana de extractos de *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Echinocereus stramineus* y *Stenocereus pruinosus*.

Urakami Y, Kimura N, Okuda M, Masuda S, Katsura T, Inui K. 2005. Transcellular transport of creatinine in renal tubular epithelial cell line eLLC-PK1. *Drug Metab Pharmacokinet.* Jun; 20(3):200-5.

Vierck L,J, and Dodson VM. 2002. Interpretation of the fenomenos of the cellular culture. *Journal of Methods in Cell Sciencie* 22: 79-82.

Viveros Valdez (2004) “Actividad Bactericida de extractos de *Ocimum basilicum* y *Hedeoma drummondii* sobre bacterias de Importancia en Alimentos y Citotoxicidad sobre *Artemia salina*”.

Watson RR. 1992. In Vitro methods of toxicology. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida. Cap. 8: 93-113.

Yanming, C., Zhong – Ming, Q., Junrong, D., Xianglin, D., Yangzhong, Ch., Qin, W., Chenyuan, W., Yan, M., Youjia, X., Lianzhi, L. y Ya, K. 2005. Iron loading inhibits ferroportin 1 expression in PC12 cells. *Neurochemistry Internacional* (in press).

Yuan G, Ott RJ, Salgado C, Giacomini KM. 1991. Transport of organic cations by a renal epithelial cell line (OK). *J Biol Chem.* May 15; 266(14):8978-86.

Zhang J, Reddy J, Buckland B, Greasham R. 2003. Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations: studies on yeast extract for a recombinant yeast fermentation process. *Biotechnol Bioeng.* Jun 20; 82(6):640-52.

Zimmerman M. Anastasia, Vierck L. Janeth, O’Reilly y Dodson, 2000. Formulacion de un medio definido para el mantenimiento celular in Vitro. *Methods in cell science.* 22: 43- 49.F.

APÉNDICE

Composición y preparación de las soluciones de trabajo.

Acrilamida : Se complementó el contenido de un frasco de acrilamida / bis-acrilamida (Acrylamide, SIGMA) con 40 ml de agua Milli Q. Se almacenó a 4°C.

Amortiguador de pH isotónico de Tris 1X (salino TD): se pesaron 8 g de NaCl, 3.75 g de KCl, 0.1 g de Na₂HPO₄ y 3.0 g de Trizma base. Se disolvieron los componentes en 800 ml de agua Milli Q. Se agregaron 15 ml de HCl 1 N y se dejó en agitación hasta que la solución adquirió la temperatura ambiente. Se ajustó a pH 7.4 con HCl 1N y se aforó a 1000 ml con agua Milli Q. Se distribuyó en frascos de vidrio con 50 ml y se esterilizaron en autoclave por 15 min. a 121°C. Se almacenaron a temperatura ambiente.

Antibiótico, mezcla 100X [penicilina (200,000 UI) y estreptomicina (0.5 g/ ml)]: la mezcla se preparó a partir de Penicilina G-sódica cristalina (Lakeside) de 1×10^6 unidades y sulfato de estreptomicina (Lakeside) de 1 g. Se disolvieron los componentes en forma individual en 2 ml de agua Mili Q. Se tomaron 0.4 ml del frasco de penicilina y se mezclaron con 1 ml de la solución de estreptomicina. La mezcla se aforó a 100 ml con agua Milli Q y se esterilizó por filtración. Se almacenó en fracciones de 1 ml a -20°C.

Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio a 2 mg/ml (MTT): se pesó 0.02g de MTT (Research Organics) y se disolvió en 10 ml de SSBH. Se preparó al momento de usarse.

Buffer de corrida 5X (se diluyó a 1X para correr el gel): Se disolvieron 15 g de Tris base (125 mM), 94 g de glicina (1.25 M) y 5 g de SDS en 1 L agua Milli Q.

Buffer de fosfatos (PBS): Se pesaron 5.84 g de NaCl, 2.18 g de K₂HPO₄ y 0.66 g de KH₂PO₄, se colocaron en 800 ml de agua Milli Q, se mezclaron y se ajustó el pH a 7.2. Se aforó a 1000 ml y se colocó en frascos de vidrio de 100 y 200 ml con tapón de rosca, se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121°C. Se almacenaron a temperatura ambiente.

Buffer para gel concentrador (pH 6.8): Se disolvieron 31.5 g de Tris – HCl (1M) en 200 ml agua Milli Q.

Buffer para gel separador (pH 8.8): Se disolvieron 47.3 g de Tris – HCl (1.5 M) en 200 ml agua Milli Q.

Buffer de lisis: Se disolvieron 0.8 g de Tris- base 10 mM (pH 7.6) y 5 g de NP-40 1% en 500 ml de agua Milli Q.

Buffer de muestra (2X): Se disolvieron 3.94 g de Tris-HCl 10 mM (pH 6.8), 10 g de SDS 4%, 50 ml de glicerol 20%, 0.5 g de azul de bromofenol 0.2% y 5 ml de β -mercaptoethanol 2% en 195 ml agua Milli Q.

Buffer salino Tris (TBS), pH 7.4: Se pesaron 7.89 g de NaCl, 0.315g de Tris base, 0.402 g de KCl, 0.197 g de MgSO₄ y 0.021 g de CaSO₄. Se disolvieron en 800 ml de agua Milli Q y se ajustó el pH a 7.4. Se distribuyeron en frascos de vidrio de 100 ml, se esterilizaron en autoclave por 15 min. a 121°C. Se almacenaron a -20°C.

Cóctel inhibidor de proteasas: Se utilizó el cóctel de proteínas: Complemete™ Mini (1 tableta para 10 ml de buffer de lisis).

Gel concentrador: Se disolvieron 5.1 ml de agua Milli Q, 1.0 ml de Buffer concentrador 4X, 1.3 ml de Acrilamida, 75 μ l de SDS al 10%, 75 μ l de Persulfato de amonio y 10 μ l de TEMED. El TEMED se adicionó al final. Se combinó y se colocó inmediatamente, se añadió suavemente 1 ml agua sobre la superficie del gel. Se dejó polimerizar 30 min.

Gel separador, al 10°: Se disolvieron 5.85 ml de agua Milli Q, 3.75 ml de buffer separador 4X, 5.0 ml de acrilamida, 150 μ l de SDS al 10%, 150 μ l de persulfato de amonio y 10 μ l de TEMED. El TEMED se adicionó al final. Se combinó y se puso inmediatamente el gel, se añadió suavemente 1 ml de agua sobre la superficie del gel. Se dejó polimerizar 25-30 min.

Isopropanol ácido (HCl 0.04 M en isopropanol): se mezclaron 160 µl de HCl

12.5 M con 49.84 ml de isopropanol. Se almacenó a temperatura ambiente.

Mercurio: se preparó una solución stock concentrada en agua Milli Q (se esterilizó por filtración) y a partir de ahí se prepararon las soluciones de trabajo en el medio de cultivo estéril correspondiente, sin suero.

Metasulfato de Fenazina a 3.5 mg/ml (PMS): se pesaron 0.035 g de PMS (SIGMA) y se disolvió en 10 ml de agua Milli Q. Se preparó al momento de usarse.

NaOH 1 N. Se pesaron 4 g de NaOH y se disolvió en 100 ml de agua Milli Q, se almacenó a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio al 10^o: Se disolvió 1g de Persulfato de amonio en 10 ml agua Milli Q.

Reactivo de Coomassie 1:5 en agua Milli Q (Coomassie blue dye Bio-Rad): se pesaron 100 mg de azul de Coomassie G-250 y se disolvieron en 50 ml de etanol al 95%, adicionando 100 ml de H₃PO₄ al 85%, la mezcla se aforó a 1 litro de agua Milli Q.

Rojo de fenol solución al 1%: se pesó 1 g de rojo de fenol (SIGMA) y se disolvió en 6 ml de NaOH 1N, se aforó a 100 ml con agua Milli Q. Se filtró a través de papel Whatman # 1 y después se esterilizó por filtración con membranas Millipore de 0.22 µm. Se almacenó a -20°C.

SDS 10%: Se disolvieron 20 g de SDS en 200 ml agua Milli Q.

Sero albúmina bovina (BSA) 1000 µg/ml de NaOH: se pesaron 25 mg de BSA (SIGMA) en 25 ml de NaOH 1 N y se congelaron en alícuotas de 500 µl.

Solución A: se disolvieron 10 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y 0.25 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en aproximadamente 50 ml en agua Milli Q, se agregaron 50 ml de hidróxido de sodio (NaOH) y se aforo a 100 ml de agua Milli Q. Se almacenó en frascos ámbar a temperatura ambiente.

Solución B: se disolvieron 0.39 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en aproximadamente 20 ml de agua Milli Q, después se agregaron 0.62 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), se le adicionaron 2.5 ml de NaOH 1N y se completó el volumen a 22.5 ml de agua Milli Q. Se guardó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución C: se diluyó 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu con 15 ml de agua Milli Q (se preparó inmediatamente antes de usarse).

Solución estándar SAB 1mg/ml: se disolvieron 100 mg de seroalbúmina bovina en 20 ml de agua Milli Q con agitación lenta y se aforo a 100 ml con agua Milli Q.

Solución salina balanceada de Hanks (SSBH 1X): se pesaron 0.07 g de CaCl_2 , 1.0 g de Glucosa, 7.2 g de NaCl, 0.4 g de KCl, 0.2 g de MgSO_4 y 0.12 g de Trizma base. Se disolvieron los componentes en 800 ml de agua Milli Q y se ajustó el

pH a 7.0 con HCl 5 N. Se aforó a 1000 ml. Posteriormente se ajustó la osmolaridad a 300 ± 10 mOsm con NaCl. Se esterilizó por filtración y se distribuyó en de 100 ml en frascos de vidrio, estériles con tapón de rosca. Se almacenaron a -20°C .

Solución Reveladora: se disolvió 0.5 g de azul de Coomassie R250 en 40 ml de metanol y 10 ml de ácido acético glacial y se aforo a 100 ml de agua Milli Q, se filtró con papel Whatman # 1. Se almacenó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución decolorante: se mezclaron 400 ml de metanol, 70 ml de ácido acético glacial y 530 ml de agua Milli Q. Se almacenó a temperatura ambiente.

Solución conservadora: se preparó una solución de glicerol al 1%.

RESUMEN CURRICULAR

Gloria Elena Espinosa Ayala

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO A BASE DE PEPTONA DE COLAGENO Y EXTRACTO DE LEVADURA PARA LA PROPAGACIÓN DE TRES LINEAS CELULARES DE MAMIFEROS.

Campo de estudio: Biología celular.

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 5 de Agosto de 1978 hija de Juan Espinosa Monrroy y Silvia Ayala Hernández.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

