



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL POR INVESTIGACIÓN
**ESTANDARIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES
ADHERENTES EN CULTIVOS EN SUSPENSIÓN
MEDIANTE EL USO DE MICROPORTADORES**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Belen Romo Espinosa

Matrícula 2163025805

ASESOR INTERNO

Dr. Roberto Javier Almeyda Artigas
Departamento El Hombre y su Ambiente
No. Eco. 17606

ASESOR EXTERNO

Dr. Carlos Cabello Gutiérrez
Departamento de Investigación en Virología y Micología
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Cédula profesional 3325905

Mayo, 2022-Febrero, 2023

Introducción

El cultivo celular es un proceso mediante el cual las células (procariotas y eucariotas) pueden cultivarse en condiciones controladas preservando sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, este proceso se realiza bajo ciertas condiciones como medios específicos, superficies de cultivo, asepsia ambiental, incubación a una temperatura determinada, atmósfera de CO₂ y pH (Castaño & Zapata, 2000). Las técnicas de cultivo celular se han vuelto vitales para el estudio de la estructura, función y diferenciación de las células animales y para la producción de muchos materiales biológicos importantes, como vacunas, enzimas, hormonas, anticuerpos, interferones y ácidos nucleicos.

Existen dos tipos de cultivo celular, en anclaje y suspensión; en los cultivos dependientes de anclaje o adherentes, las células necesitan un soporte, una superficie para su proliferación, las células se sedimentan y se adhieren al fondo del recipiente, la ausencia conduce a la detención del crecimiento y a la inducción del anoikis (una forma de muerte celular programada que es inducida cuando estas células se separan de la matriz extracelular circundante y en este caso del soporte plástico). En el cultivo en suspensión las células no necesitan de una superficie para el crecimiento, la proliferación se da por la suspensión en el medio líquido, el tipo de células utilizadas para este cultivo en su mayoría son tumorales, hematopoyéticas o células madre (Castaño & Zapata, 2000).

Los cultivos en microportadores son ampliamente utilizados para obtener de forma eficiente grandes cantidades de células dependientes de anclaje en un sistema en suspensión. Este tipo de sistemas permite crear ambientes homogéneos, ya que controla la formación de agregados celulares, distribuye de forma equitativa los componentes del medio y mejora la transferencia de gases y nutrientes dentro de las células, favoreciendo la proliferación del cultivo (Castaño, 2008).

Una de las principales limitaciones en un sistema convencional de cultivo de células adherentes es la producción de una pequeña cantidad de células, contaminación por el número de pasos de manipulación, mano de obra y gasto neto de medios; por lo que se propone la estandarización de cultivos de células dependientes de anclaje a cultivos en suspensión mediante la utilización de microportadores, ya que esto hace posible el cultivo práctico y de alto rendimiento a un menor costo y con ello se tiene una herramienta más de cultivo en el Departamento de Investigación en Virología y Miología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Antecedentes del cultivo celular

El cultivo de células animales *in vitro* se inició a finales del siglo XIX, cuando se realizó la primera prueba para desarrollar el crecimiento de órganos siendo sumergidos en fluidos biológicos. Hasta 1907 se tiene en cuenta al cultivo celular como un método para estudiar el comportamiento de las células animales independientemente del organismo. Con este proceso se originaron una serie de complicaciones en los primeros cultivos, una de las limitaciones era lograr establecer un medio nutritivo adecuado, el cual fue logrado hasta 1910 por Burrows, quien utilizó plasma de pollo para nutrir los explantes (tejido vivo separado de su órgano y transferido a un medio artificial de crecimiento) de tejidos embrionarios de pollo, fue uno de los primeros medios que permitió la observación y el crecimiento de tejidos. Burrows y Carrel demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivos, los medios utilizados fueron plasma suplementado con extractos de embrión (Reyes, *et al.*, 2017).

Desde entonces el cultivo celular ha sido definido como el aislamiento de un tipo específico de células provenientes de tejidos u órganos, que posteriormente son colocadas en un ambiente artificial, favoreciendo la división, crecimiento, multiplicación y en algunos casos, diferenciación (Castaño, 2008).

Cultivos adherentes

Los cultivos en monocapa, representan una de las formas de crecimiento *in vitro* de las células provenientes de cultivos de líneas celulares dependientes de anclaje. Las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio) ya que el anclaje al sustrato es la clave para la proliferación celular (Reyes *et al.*, 2017). Cuando el cultivo alcanza una confluencia, es decir, cuando llenan la superficie en monocapa, es necesario propagar las células realizando subcultivos. Con la propagación se debe de ir aumento la superficie de trabajo (número de cajas) lo cual se vuelve laborioso, costoso y altamente susceptible a la contaminación producto del gran número de cajas que se deben manipular (Castaño, 2008).

Cultivos en suspensión

El crecimiento en suspensión se presenta en células cuya naturaleza en su mayoría es de ese tipo hematopoyéticas, en aquellas que han perdido o disminuido la síntesis de proteínas de anclaje o de células procedentes de tumores. Las células que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies pueden ser adaptadas a crecer en suspensión después de ser sometidas a una serie de subcultivos, al hacer modificaciones genéticas o

cambiando el medio de cultivo. Ofrece ventajas económicas cuando se trata de aumentar la escala ya que los gastos de medio requerido son menores (Reyes, *et al.*, 2017).

Medios de cultivo

Es uno de los componentes esenciales para el crecimiento y la proliferación celular ya que contiene todos los nutrientes, factores de crecimiento y hormonas. Si bien la mayoría de las células comparte requerimientos nutricionales comunes, pueden ser diseñados medios especiales que optimicen el crecimiento y se utiliza el término “medio completo” el cual indica que se le han agregado todo los constituyentes y suplementos necesarios (aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, proteínas, azúcares, etc.) (Freshney, 2005).

Algunas propiedades fisicoquímicas requeridas en estos medios son pH, CO₂ y temperatura. La mayoría de las líneas celulares (de mamíferos) crecen bien en pH de 7 a 7.4, pero el óptimo para una determinada línea celular puede variar. El indicador de pH utilizado en los medios comerciales es el rojo fenol. El CO₂ en la fase gaseosa se disuelve en el medio estableciendo un equilibrio con los iones de carbonato y estabilizando el pH. Cada medio tiene una concentración de bicarbonato y porcentaje de CO₂ recomendada para alcanzar el pH correcto, también es importante para el crecimiento celular ya que la ausencia podría ser un limitante (Beltrán & González, 2016). La temperatura óptima para el cultivo depende principalmente de la temperatura corporal del organismo del que se obtuvieron las células. Es así que la temperatura recomendada para líneas celulares de mamíferos es a 37 °C (Freshney, 2005).

Suero

Es una fuente de minerales, lípidos, hormonas, proteínas, factores de crecimiento (promueven la proliferación de células) y factores de adhesión (fomentan la adhesión celular al recipiente de cultivo) así como también tiene una actividad inhibidora de tripsina. La mayoría de los sueros usados en los cultivos son de ternera, caballo o bovino adulto, siendo el suero fetal bovino (SFB) el más utilizado (Freshney, 2005), la cantidad utilizada es la sugerida en la ficha técnica de la línea celular en específico.

Separación celular

Las células deben ser desprendidas ya sea del tejido para iniciar el cultivo celular o de la superficie del material para realizar subcultivos (transferir células de un recipiente de cultivo a otro), se puede realizar de manera enzimática (tripsina la

cual es utilizada principalmente esta es una enzima proteasa que digiere aquellas proteínas implicadas en la adhesión celular, actúa de manera eficiente a temperatura de 37°C o pepsina), mecánica (bisturí, tijeras, aguja), mediante reactivos químicos como EDTA o EGTA, o detergentes (Nonidet P-40, Triton X-100, etc). Estos mecanismos de separación van a depender del tipo de células utilizadas (Castaño & Zapata, 2000).

Microportadores

Los microportadores son pequeñas esferas cuyo diámetro no supera los 500 micrómetros, estas pequeñas esferas (también llamados microportadores o perlas) proporcionan una superficie adecuada para el crecimiento en monocapas de células dependientes de anclaje, estas perlas se suspenden en el medio de cultivo.

Debido a que el material de fabricación tiene efectos físicos y químicos sobre las células se han desarrollado diferentes tipos de microportadores, estos pueden dividirse en portadores de carga positiva como Cytodex 1 los cuales están basados en dextrano; recubiertos de colágeno (esto proporciona que las células tengan una mayor adherencia) como Cytodex 3; en poliestireno como HyQ sphere Pro-F102-4; portadores sin carga como HyQsphere P1024; o macroporosos a base de gelatina (cultisphere) y a base de celulosa (cytopore), lo cual introduce nuevas posibilidades y, por primera vez hace posible el cultivo práctico de alto rendimiento de células dependientes del anclaje en cultivo en suspensión (Merten, 2015).

Ventajas del cultivo en suspensión mediante el uso de microportadores

Las aplicaciones del cultivo en suspensión incluyen, la producción de grandes cantidades de células, virus y productos celulares, estudios sobre diferenciación y función celular, recolección de células mitóticas, aislamiento de células, estudios de membrana, almacenamiento y transporte de células, ensayos que implican transferencia de células y estudios sobre la absorción de compuestos marcados, entre otros más.

Los microportadores proporcionan una relación entre el área de superficie de cultivo y el volumen de trabajo, se pueden cultivar grandes cantidades de células en pequeños volúmenes (más de 10^9 cel/l). Se requieren menos recipientes de cultivo, facilitando altos rendimientos celulares sin tener que recurrir a equipos voluminosos ni a una metodología tediosa. Para una cantidad determinada de células o sus productos, los cultivos de microportadores requieren mucho menos espacio que otros tipos de cultivos en monocapa. La posibilidad de cultivar células

en pequeños sistemas de cultivo compactos es especialmente importante cuando se trabaja con organismos patógenos. Con el cultivo de microportadores un técnico puede manejar una producción de vacunas equivalente a 900 botellas rotativas por semana (Meignier *et al.*, 1980). Un litro de cultivo de microportadores puede producir tantas células como 50 botellas giratorias (botellas de 490 cm²).

La técnica del microportador proporciona un método para cultivar células dependientes de anclaje en un sistema que tiene todas las ventajas del cultivo en suspensión. Permiten un sistema de cultivo homogéneo que tiene una amplia variedad de diseños de procesos (van Hemert *et al.*, 1969). El monitorear y muestrear cultivos en microportadores es más simple que con cualquier otra técnica para producir un gran número de células dependientes del anclaje así brindan oportunidades para el control de los parámetros de cultivo (por ejemplo, pH, tensiones de gas, etc.).

En cultivo celular, el riesgo de contaminación está relacionado con el número de pasos de manipulación (apertura y cierre de recipientes de cultivo) necesarios para producir una determinada cantidad de células o sus productos. El cultivo de microportadores proporciona un método para reducir el número de pasos de manipulación. Hay un riesgo mucho menor de contaminación cuando la producción de una gran cantidad de células proviene de un solo cultivo de microportadores en lugar de varios cientos de botellas giratorias (Crespi & Thilly, 1981).

La separación de las células del medio de cultivo es sencilla; cuando se detiene la agitación, los microportadores con células adheridas sedimentan bajo la influencia de la gravedad y se puede eliminar el sobrenadante. A diferencia de los sistemas de cultivo de células tradicional en el cultivo en suspensión no se necesita pasos de centrifugación.

Por éstas y otras razones es que en el Departamento de Investigación en Virología y Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias nos proponemos realizar lo necesario para emplear esta tecnología. Por lo que proponemos lo siguiente:

Objetivos

Objetivo general: Establecer cultivos celulares en suspensión a partir de líneas celulares adherentes mediante el uso de microportadores.

Objetivos particulares:

- Determinar la cantidad ideal de microportadores para cultivos de células MDCK
- Determinar la cantidad ideal de microportadores para cultivos de células HBEC-5i
- Determinar la cantidad ideal de microportadores para cultivos de células Vero
- Establecer las condiciones físicas necesarias para el cultivo en suspensión de las tres líneas celulares en microportadores

Materiales y métodos

Para el presente trabajo se emplearon tres líneas celulares de mamíferos con propiedades adherentes. La primera línea celular es de tejido renal de un Cocker Spaniel hembra adulto sano (MDCK por sus siglas en inglés).

La segunda línea celular utilizada es de endotelio microvascular cerebral humano (HBEC-5i por sus siglas en inglés). Se obtuvo de pequeños fragmentos de corteza cerebral humana.

La tercera línea celular es procedente de tejido renal de un mono verde africano adulto sano (Vero por sus siglas en inglés).

Las tres líneas celulares fueron proporcionadas del stock del departamento de investigación en cajas T25 (de plástico desechable, de superficie de 25 cm²) confluentes, con número de pases de entre 2 y 5. Para la propagación de estas líneas se procedió a retirar el medio, se agregó tripsina, una vez separadas de la superficie se recuperaron con medio (el recomendado para cada línea celular). El subcultivo se realizó en cajas T75 (con una superficie de 75 cm² y un volumen de 10 ml, este es el óptimo utilizado en el departamento de investigación donde se han visto mejores resultados en el cultivo) suplementado con 10% de SFB. Se incubaron en una atmósfera controlada a 37 °C y 5% de CO₂, con un cambio de medio de 2 a 3 veces por semana (según lo recomendado por la American Type Culture Collection —ATCC—). Al alcanzar un 90-100% de confluencia, se realizó un subcultivo celular, dividiendo la cantidad total de células en tres cajas T75 (pase 1:3). Este procedimiento se repitió para cada línea celular.

Una vez propagadas las líneas celulares se procedió a la preparación de los microportadores.

El procedimiento es el recomendado por el fabricante. Brevemente se pesó una cantidad determinada de microportadores Cytodex 1 (C0646-5G) y Cytodex 3 (17048501). Para su hidratación se colocaron en un tubo falcón con 30 ml de buffer fosfato salino (PBS) y 40 µl de tween 20 (mínimo 3 hrs). Posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 30 minutos. Una vez esterilizados, se descartó el PBS obteniendo los microportadores los cuales se recuperaron con 15 ml de medio y se transfirieron a una caja T25.

Las pruebas fueron realizadas en cajas T25 (para cada sistema) con un volumen final de medio de 30 ml, la cantidad de microportadores a probar y el 10% de SFB.

Los experimentos realizados en agitación constante fueron con un Roto mix (Type 50800 orbital shaker).

Método de conteo de microportadores

Para el conteo de perlas se adecuó una técnica con los materiales disponibles en el Departamento de Investigación de Virología y Micología. Se tomó un volumen de cada caja (obtenido medio y microportadores) y fueron observados en un microscopio invertido (Zeiss PrimiVert Inverted Microscope Whit Integrated Screen), se observaron tres campos visuales al azar y se procedió a realizar un conteo de perlas totales. Se obtuvieron datos de microportadores con presencia (se consideró como perla positiva aquellas con una célula o más células adheridas) y sin presencia de células, una vez teniendo el resultado del conteo de los tres campos visuales, se obtuvo un promedio y porcentaje de perlas con presencia de células.

Resultados y discusión

Las células Vero tienen una mejor adherencia con agitación constante en Cytodex 3

Se comparó las propiedades de los microportadores Cytodex 1 (con carga positiva) y Cytodex 3 (recubrimiento de colágena) en sistemas con y sin agitación constante, así como dos densidades celulares, estas condiciones fueron probadas en las tres líneas celulares con el fin de determinar las concentraciones y tipo de perlas óptimas donde se obtenga un mejor porcentaje de microportadores con células adheridas.

La densidad celular utilizada en las pruebas fue de 2.5×10^5 cel/ml (Yang *et al.*, 2019). La primera prueba se realizó con células Vero en microportadores Cytodex 1 (figura 1), las cantidades probadas de perlas fueron: 50, 100 y 150 mg (Genzel *et al.*, 2006, 2007), y los tiempos de muestreo fueron 24, 48, 72 y 96 hrs (Arifin *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos mostraron un mejor porcentaje de perlas con células adheridas en 50 mg en 48 hrs (61.17%), pasando este tiempo el porcentaje fue disminuyendo (36.79% en 72 hrs y 1.73% en 96 hrs) (ver Fig. 1 en los Anexos), esto puede deberse a una disminución de nutrientes ya que la ATCC en las fichas técnicas de las líneas celulares recomienda que el cambio de medio se realice 2 ó 3 veces por semana y al no ser realizado, los nutrientes fueron insuficientes para el mantenimiento y crecimiento de las células.

En una segunda prueba se decidió considerar 24, 48 y 72 hrs para la toma de muestreo y en vista de que en 50 mg hubo un mejor porcentaje de perlas con células (primera prueba), se propuso probar 2 cantidades nuevas, 25 y 75 mg de microportadores Cytodex 1, mostrando un mejor resultado en 25 mg a las 24 y 48 hrs (97.33 y 97.57% respectivamente) (ver Fig. 2 en los Anexos).

En una tercera prueba se realizó cambio de microportadores a Cytodex 3 con el fin de probar si el recubrimiento de colágena favoreciera que una mayor cantidad de células se adhirieran a las perlas y obtener mejores resultados en un menor tiempo de cultivo. Las cantidades de microportadores fueron cambiadas a 30, 60 y 90 mg siguiendo las recomendaciones del fabricante y así determinar la cantidad adecuada para esta línea celular (la cantidad recomendada por el fabricante es opcional, depende de cada línea celular), realizando un muestreo a las 12, 24 y 48 hrs, se obtuvo como resultado una mayor cantidad de perlas con células en 30 y 60 mg en 48 hrs (94.13 y 94.4% respectivamente) (ver Fig. 3 en los Anexos).

Dado a los resultados obtenidos en la prueba 3, se decidió probar un cuarto ensayo con cantidades de 30 y 60 mg de microportadores Cytodex 3 y la toma de muestras en 8, 24 y 48 hrs manteniendo en agitación constante a 112 rpm, teniendo un mejor resultado con 60 mg a las 24 y 48 hrs (100 y 99.66% de perlas

con células adherida), seguido de 30 mg a las 24 y 48 hrs (99.46% y 99.32%, respectivamente) (ver Fig. 4 en los Anexos).

Mantener el sistema en agitación constante proporcionó que un mayor número de perlas (100%) tuviera presencia de células en un tiempo corto (imágenes no mostradas), esto puede deberse a lo mencionado por Yang *et al.* (2019), el movimiento interviene en la distribución uniforme de las perlas, los nutrientes y las células, así como evitar que se asienten y formen grumos.

Los resultados obtenidos mostraron que mantener el sistema a 112 rpm en microportadores Cytodex 3 fue lo óptimo ya que el 99% de perlas tuvo presencia celular. Mientras que el estudio realizado por Sun *et al.* (2000) quienes estudiaron la influencia de la velocidad de agitación en el rango de 20 a 45 rpm sobre la adhesión de células Vero sobre microportadores Cytodex 3, observaron que las bajas velocidades de agitación (20 rpm) favorecieron la adhesión celular, pero causaba una distribución celular no homogénea en los microportadores. A 45 rpm, la adhesión celular disminuyó significativamente, concluyendo que la velocidad de agitación óptima fue de 30 rpm, mientras que, en el trabajo realizado por Souza y colaboradores en el 2005, 40 rpm fue la velocidad de agitación más adecuada utilizando células Vero en Cytodex 1.

Las células HBEC-5i tienen una mejor adherencia con agitación constante en Cytodex 3

Se realizaron pruebas en la línea celular HBEC tomando como base las cantidades de 25, 50 y 75 mg de Cytodex 1 (utilizados en la línea celular Vero), la toma de muestreo fue a las 8 y 24 hrs con una densidad celular de 2.5×10^5 cel/ml, obteniendo un mejor resultado con 25 mg a las 24 hrs (100% de perlas con células adheridas) (ver Fig. 5 en los Anexos).

Se realizó una tercera y cuarta prueba con microportadores Cytodex 3 en cantidades de 30 y 60 mg, se disminuyó la densidad celular a 8.3×10^4 tomando como referencia la ficha de la ATCC donde se recomienda realizar pases de 1:4 o 1:10 teniendo una mayor área de superficie de proliferación y una mayor cantidad de nutrientes, la toma de muestras se realizó a las 8, 24 y 48 hrs. Sumando a estas condiciones el mantener en agitación constante (112 rpm) proporcionó un mejor resultado con 30 mg en 8 hrs teniendo el 100% de perlas con células adheridas en un menor tiempo (ver Fig. 6 en los Anexos).

Se desconoce trabajos realizados sobre esta línea celular en cultivos en suspensión con microportadores, por lo que los resultados obtenidos permitieron establecer un acercamiento para la obtención de las condiciones óptimas para la proliferación y un mayor rendimiento celular en estos sistemas.

Las células MDCK tienen una mejor adherencia con agitación constante en Cytodex 3

La primera prueba realizada fue con cantidades de 30, 60 y 90 mg de microportadores Cytodex 3 y una densidad celular de 2.5×10^5 , el muestreo se realizó a las 8, 24 y 48 hrs. La cantidad de perlas y el tiempo que mostró un mejor resultado en el porcentaje de microportadores con células adheridas fue 30 mg en 24 hrs (99.3%) (ver Fig. 7 en los Anexos).

La segunda prueba realizada fue con 30 y 60 mg de microportadores Cytodex 1, se utilizó una densidad celular de 8.3×10^4 cel/ml, el tiempo de toma de muestras fue a 8 hrs. La cantidad de microportadores que mostró un mejor en porcentaje con células adheridas fue 30 mg (80.52%) (Ver figura 8). Después de este tiempo se observó la formación cúmulos de microportadores con células evitando una correcta visualización y conteo de microportadores, esto puede deberse a que las células tienen una alta adherencia entre ellas y con la superficie.

La tercera prueba se realizó con 30 y 60 mg de Cytodex 3, se utilizó una densidad celular de 8.3×10^4 cel/ml, el muestreo se realizó a las 8 hrs, este sistema se mantuvo en agitación constante (112 rpm) para evitar la formación de grumos lo que ayudó a una homogeneización (Yang *et al.*, 2019) dentro de este periodo de tiempo, favoreciendo que en 30 mg se diera 100% y en 60 mg 89.57% de perlas con células adheridas.

Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en la línea celular MDCK se tiene como perspectivas realizar más pruebas con el objetivo de prevenir la formación de grumos, determinar la cantidad y el tipo de microportadores, y conocer el medio de cultivo donde se tengan los mejores resultados para el Departamento de Investigación. Se propone probar medio con y sin SFB (probablemente la ausencia de SFB ayude a evitar la formación de grumos) para disminuir la fuerza de adherencia, esto basándonos en el estudio realizado por Genzel *et al.* (2006) donde compararon el crecimiento de MDCK en perlas Cytodex 1 con medio MEM de Glasgow (GMEM por sus siglas en inglés) contra el medio libre de suero (Ex-Cell MDCK). Observaron que las células se unieron inicialmente a los microportadores en medio GMEM, posteriormente las células mostraron una propagación deficiente y un desprendimiento fácil de los portadores, mientras que en el medio Ex-Cell MDCK tuvieron como resultado un aumento de la densidad celular sin dificultad.

Otra propuesta es la realización de pruebas para poder llevar a cabo subcultivos y así poder propagar las líneas celulares dependientes de anclaje en cultivos en suspensión mediante el uso de microportadores.

Conclusiones

En la línea celular Vero se obtuvo como resultado que la cantidad de 30 mg de microportadores Cytodex 3, la velocidad de agitación a 112 rpm y la densidad de 2.5×10^5 cel/ml fueron las condiciones óptimas donde en 24 hrs de cultivo el 99.46% de perlas tuvieron células adheridas.

En las células HBEC-5i se obtuvo el mejor resultado con 30 mg de Cytodex 3, en agitación constante a 112 rpm y con una densidad celular de 8.3×10^4 cel/ml. En 8 hrs de cultivo el 91.9% de perlas tuvo presencia de células.

En el caso de la línea celular MDCK se tienen como perspectivas realizar estudios más detallados con dos medios (con y sin suero) en microportadores Cytodex 1 y Cytodex 3. Esto con el objetivo de evitar la formación de agregados.

Se tiene como propósito realizar pruebas para realizar subcultivos y poder implementar este sistema de cultivo en el Departamento de Investigación.

Referencias citadas

1. Arifin, MA, Mel, M., Abdul Karim, MI & Ideris, A. (2010). Production of Newcastle virus by Vero cells grown on cytodex 1 microcarriers in a 2-litre stirred tank bioreactor. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 586363.
2. Beltrán, N. E. & González, C. H. (2016). *Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos*. UAM-Cuajimalpa, México, 198 pp.
3. Castaño, M. E. & Zapata, J. C. (2000). Cultivos celulares. En Ossa, J. (Ed.), *Principios de virología*, 3ra ed, Fondo Editorial Biogénesis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, pp. 49-64.
4. Castaño, M. E. (2008). Cultivos celulares. En Ossa, J. (Ed.), *Principios de virología*, 4ta ed, Fondo Editorial Biogénesis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, pp. 29-46.
5. Crespi, C. L. & Thilly, W. G. (1981). Continuous cell propagation using low-charge microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering*, 23 (5), 983-993.
6. Freshney, R. I. (2005). *Culture of animal cells, a manual of basic technique*. 5th ed, Wiley-Liss, Hoboken NJ, USA, 696 pp.
7. Genzel, Y., Olmer, RM, Schäfer, B. & Reichl, U. (2006). Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. *Vaccine*, 24 (35-36), 6074-6087.
8. Genzel, Y., Fischer, M., Olmer, RM, Schäfer, B., Best, C., König, S. & Reichl, U. (2007). Serum-free influenza vaccine production with MDCK cells in wave-bioreactor and 5L-stirred tank bioreactor. En Smith, R. (Ed.), *Cell Technology for Cell Products*, Vol. 3, Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 563-565.
9. Meignier, B., Mougeot, H. & Favre, H. (1980). Foot and mouth disease virus production on microcarrier-grown cells. *Developments in Biological Standardization*, 46, 249-256.
10. Merten, O-W (2015). Advances in cell culture: anchorage dependence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370 (1661), 20140040.
11. Reyes, L. S., Jimenez, Á. M., Herrera, C. R., & Gama, J. M. (2017). Historia de los cultivos de células animales in vitro y su importancia en la actualidad. *Biociencias*, 12(2), 123-136.
12. Sun, X., Zhang, Y., Tan, W., Zhou, Y. & Hua, P. (2000). Attachment kinetics of Vero cells onto to CT-3 microcarriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (1), 32-36.
13. Van Hemert, P., Kilburn, D. G. & van Wezel, A. L. (1969). Homogeneous cultivation of animal cells for the production of virus and virus products. *Biotechnology and Bioengineering*, 11 (5), 875-885.

14. Yang, J., Guertin, P., Jia, G., Lv, Z., Yang, H. & Ju, D. (2019). Large-scale microcarrier culture of HEK293T cells and Vero cells in single-use bioreactors. *AMB Express*, 9 (1), 1-14.

Referencias consultadas

1. Giard, D. J., Thilly, W. G., Wang, D. I. & Levine, D. W. (1977). Virus production with a newly developed microcarrier system. *Applied and Environmental Microbiology*, 34 (6), 668-672.
2. Mered, B., Albrecht, P. & Hopps, H. E. (1980). Cell growth optimization in microcarrier culture. *In vitro*, 16 (10), 859-865.
3. Meignier, B. (1979). Cell culture on beads used for the industrial production of foot-and-mouth disease virus. *Developments in Biological Standardization*, 42, 141-145.
4. Nicholson, B. L. (1980). Growth of fish cell lines on microcarriers. *Applied and Environmental Microbiology*, 39 (2), 394-397.
5. Griffiths, B., Thornton, B. & McEntee, I. (1980). Production of herpes viruses in microcarrier cultures of human-diploid and primary chick fibroblast cells. *European Journal of Cell Biology*, 22 (1), 606-606.
6. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden. (1979). Save with Cytodex™ 1. *Separation News*, 4, 5.
7. Souza, MCDO, Freire, MDS & Castilho, LDR (2005). Influence of culture conditions on Vero cell propagation on non-porous microcarriers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (Spec. Iss.), 71-77.
8. Van Wezel, A. L. (1971). New trends in the preparation of cell substrates for the production of virus vaccines. *Progress in Immunobiological Standardization*, 5, 187-192.

Anexos

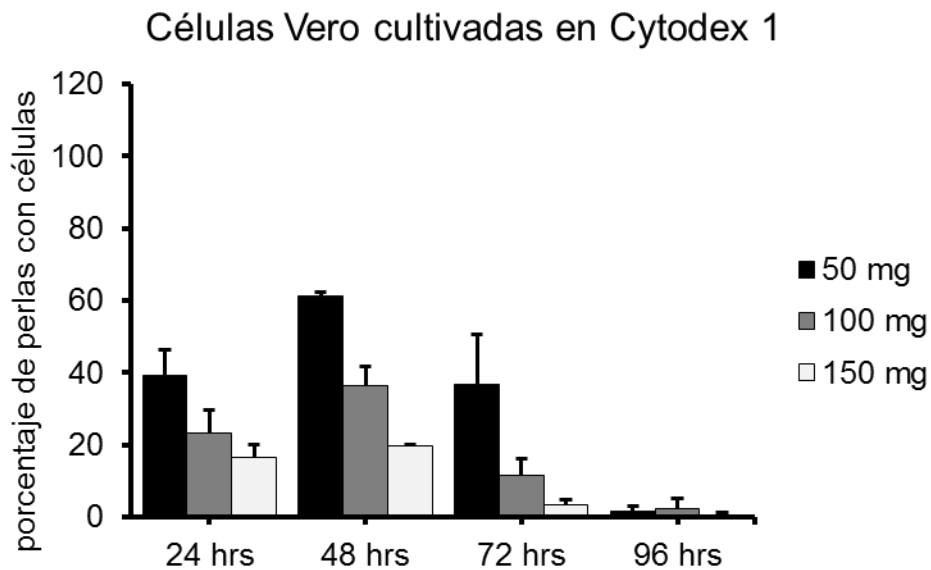


Figura 1. La gráfica representa el porcentaje de perlas Cytodex 1 con células Vero adheridas, se utilizó la misma densidad celular para cada botella de cultivo (2.5×10^5 cel/ml). Las barras negras corresponden a 50 mg de microportadores, las barras grises corresponden a 100 mg de microportadores y las barras blancas corresponden a 150 mg de microportadores. Los tiempos de toma de muestras fueron 24, 48, 72 y 96 hrs. La cantidad de perlas y el tiempo que mostró un mejor resultado en el porcentaje de microportadores con células adheridas fue 50 mg a las 48 hrs (61.17%). Diferencia significativa ($P < 0.05$, prueba *t* student, media \pm S.D.; $n=3$).

Células Vero cultivadas en Cytodex 1

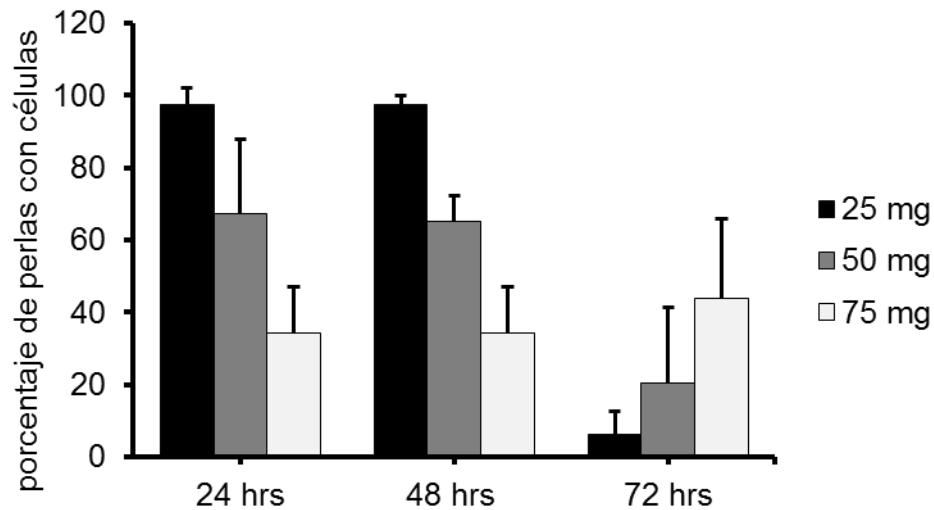


Figura 2. La gráfica representa el porcentaje de perlas Cytodex 1 con células Vero adheridas, se utilizó la misma densidad celular para cada botella de cultivo (2.5×10^5 cel/ml). Las barras negras corresponden a 25 mg de microportadores, las barras grises a 50 mg de microportadores y las barras blancas a 75 mg de microportadores. Los tiempos de toma de muestras fueron 24, 48 y 72 hrs. La cantidad de perlas y los tiempos que mostró un mejor resultado en el porcentaje de microportadores con células adheridas fue 25 mg a las 24 y 48 hrs (97.33 y 97.57% respectivamente). Diferencia significativa ($P < 0.05$, prueba *t* student, media \pm S.D.; $n=3$).

Células Vero cultivadas en Cytodex 3

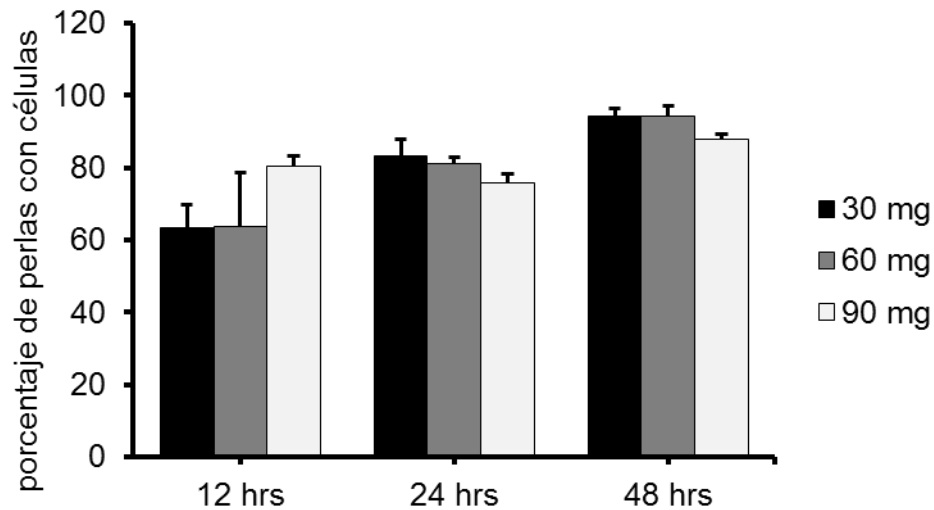


Figura 3. La gráfica representa el porcentaje de perlas Cytodex 3 con células Vero adheridas, se utilizó la misma densidad celular para cada botella de cultivo (2.5×10^5 cel/ml). Las barras negras corresponden a 30 mg de microportadores, las barras grises a 60 mg de microportadores y las barras blancas a 90 mg de microportadores. Los tiempos de toma de muestras fueron 12, 24 y 48 hrs. Las cantidades de perlas y los tiempos que mostró un mejor resultado en el porcentaje de microportadores con células adheridas fue 30 y 60 mg a las 48 hrs (94.13 y 94.4% respectivamente). Diferencia significativa ($P < 0.05$, prueba *t* student, media \pm S.D.; $n=3$).

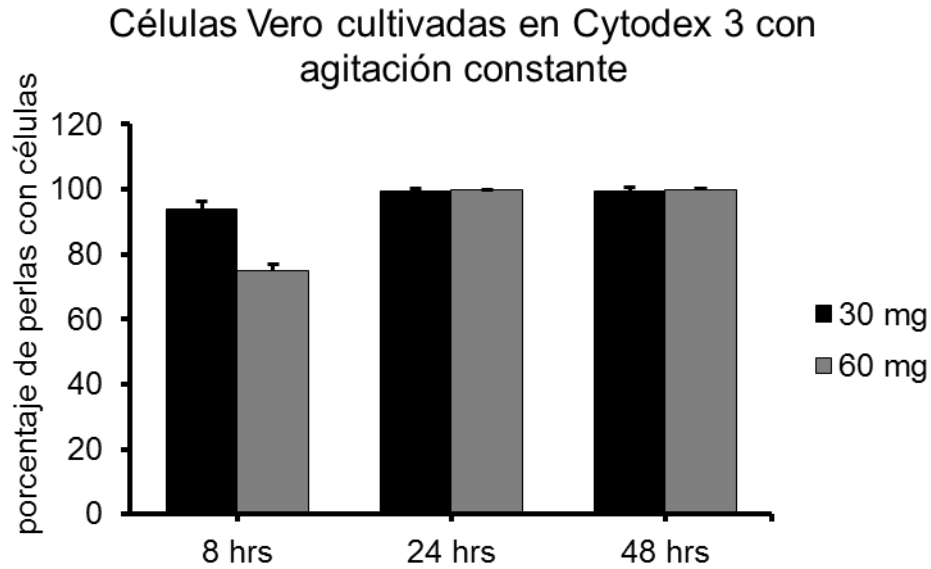


Figura 4. La gráfica representa el porcentaje de perlas Cytodex 3 con células Vero adheridas, se utilizó la misma densidad celular para cada botella de cultivo (2.5×10^5 cel/ml). Las barras negras corresponden a 30 mg de microportadores y las barras grises a 60 mg de microportadores. Los tiempos de toma de muestras fueron 8, 24 y 48 hrs. Se mantuvo en agitación constante. Las cantidades de perlas y los tiempos que mostraron un mejor resultado en porcentaje de microportadores con células adheridas fue 30 mg (99.46 y 100%), y 60 mg (99.32 y 99.66%) a las 24 y 48 hrs. Diferencia significativa ($P < 0.05$, prueba *t* student, media \pm S.D.; $n=3$).

Células HBEC-5i cultivadas en Cytodex 1

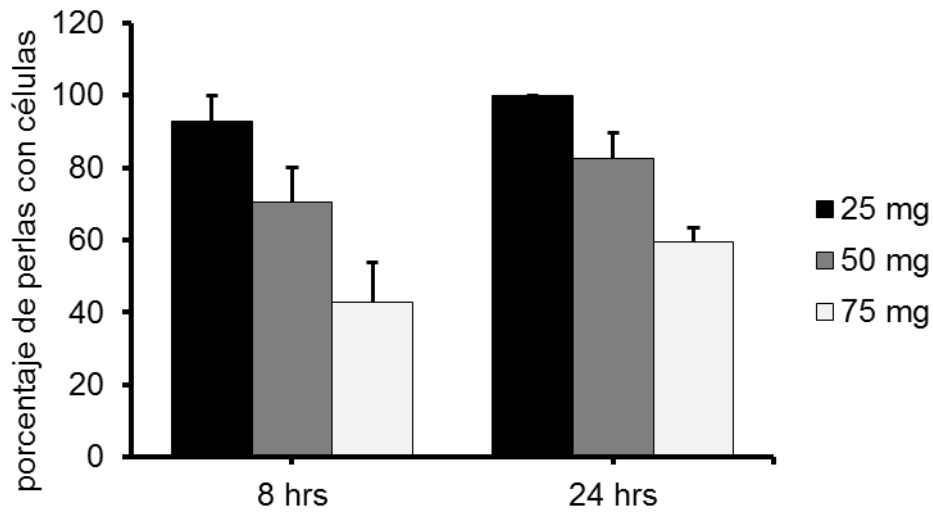


Figura 5. La gráfica representa el porcentaje de perlas Cytodex 1 con células HBEC-5i adheridas, se utilizó la misma densidad celular para cada botella de cultivo (2.5×10^5 cel/ml). Las barras negras corresponden a 25 mg de microportadores, las barras grises a 50 mg de microportadores y las barras blancas a 75 mg de microportadores. Los tiempos de toma de muestras fueron 8 y 24 hrs. La cantidad de perlas y el tiempo que mostró un mejor resultado en el porcentaje de microportadores con células adheridas fue 25 mg a las 24 hrs (100%). Diferencia significativa ($P < 0.05$, prueba *t* student, media \pm S.D.; $n=3$).

Células HBEC-5i cultivadas en Cytodex 3 con agitación constante

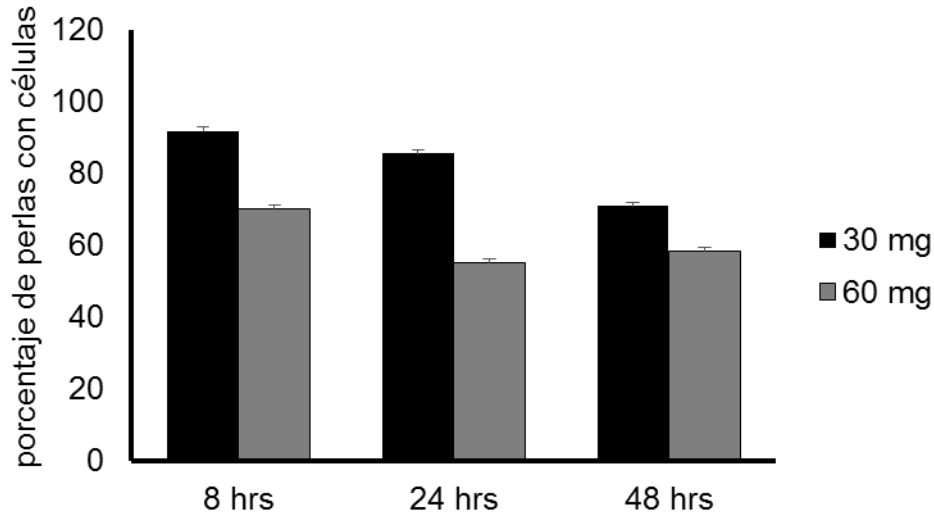


Figura 6. La gráfica representa el porcentaje de perlas Cytodex 3 con células HBEC-5i adheridas, se utilizó la misma densidad celular para cada botella de cultivo (8.3×10^4 cel/ml). Las barras negras corresponden a 30 mg de microportadores, las barras grises a 60 mg de microportadores. Los tiempos de toma de muestras fueron 8, 24 y 48 hrs. La cantidad de perlas y el tiempo que mostró un mejor resultado en el porcentaje de microportadores con células adheridas fue 30 mg a las 8 hrs (91.9%). Diferencia significativa ($P < 0.05$, prueba *t* student, media \pm S.D.; $n=6$).

Células MDCK cultivadas en Cytodex 3

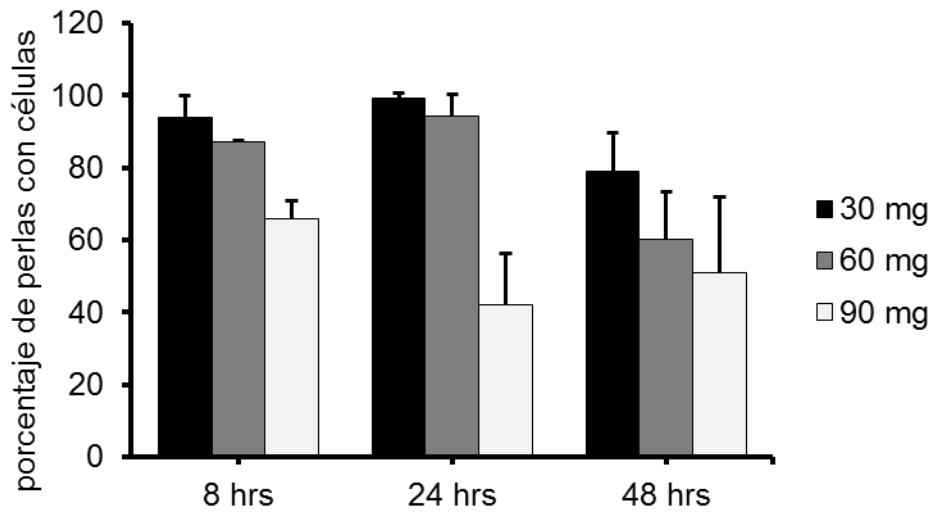


Figura 7. La gráfica representa el porcentaje de perlas Cytodex 3 con células MDCK adheridas, se utilizó la misma densidad celular para cada botella de cultivo (2.5×10^5 cel/ml). Las barras negras corresponden a 30 mg de microportadores, las barras grises a 60 mg de microportadores y las barras blancas a 90 mg de microportadores. Los tiempos de toma de muestras fueron 8, 24 y 48 hrs. La cantidad de perlas y el tiempo que mostro un mejor resultado en porcentaje de microportadores con células adheridas fue 30 mg a las 24 hrs (99.3%). Diferencia significativa ($P < 0.05$, prueba *t* student, media \pm S.D.; $n=3$).

Células MDCK cultivadas en Cytodex 1

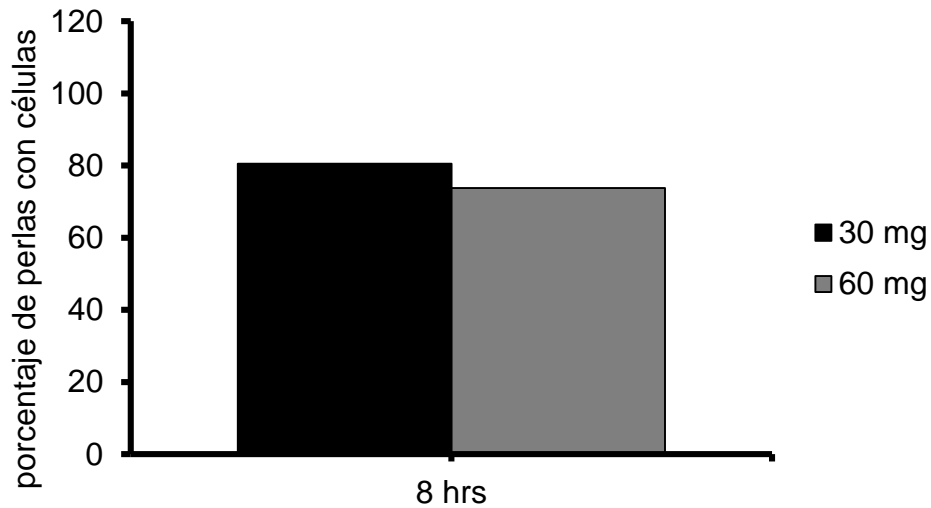


Figura 8. La gráfica representa el porcentaje de perlas Cytodex 1 con células MDCK adheridas, se utilizó la misma densidad celular para cada botella de cultivo (8.3×10^4 cel/ml). La barra negra corresponde a 30 mg de microportadores, la barra gris a 60 mg de microportadores. El tiempo de toma de muestra fue a 8 hrs. La cantidad de microportadores que mostró un mejor en porcentaje de microportadores con células adheridas fue 30 mg (80.52%). Diferencia significativa ($P < 0.05$, prueba *t* student, media \pm S.D.; $n=3$).

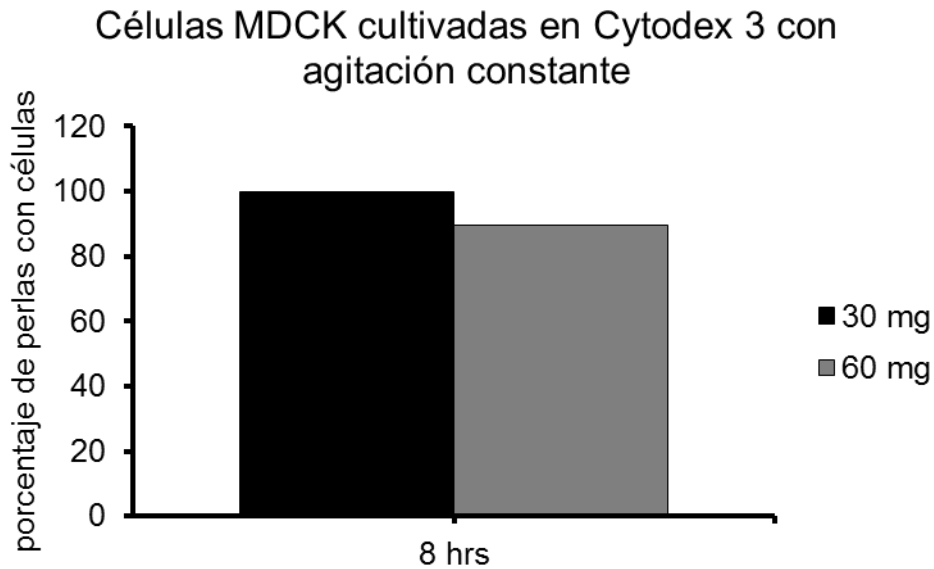


Figura 9: La gráfica representa el porcentaje de perlas Cytodex 3 con células MDCK adheridas, se utilizó la misma densidad celular para cada botella de cultivo (8.3×10^4 cel/ml). La barra negra corresponde a 30 mg de microportadores y la barra gris a 60 mg de microportadores. El tiempo de toma de muestras fue a 8 hrs. La cantidad de microportadores que mostró un mejor en porcentaje de microportadores con células adheridas fue 30 mg (100%); se mantuvieron en agitación constante. Diferencia significativa ($P < 0.05$, prueba *t* student, media \pm S.D.; $n=3$).