



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

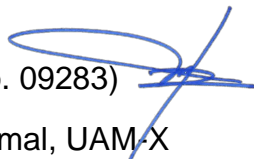
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA


REGISTRO DE INFORME FINAL DEL SERVICIO SOCIAL  
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

*“Apoyo a las actividades de investigación del  
Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la  
UAM-X”*

Que Presenta la Alumna  
Jiménez Orozco Bárbara Lorena  
2152042970

Aseoras

Dra. Ana María Rosales Torres (No. Eco. 09283)   
Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM-X

Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado (No. Eco. 41207)   
Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM-X

México, Ciudad de México a, martes 15 de agosto del 2023.

# Índice

<b>1.</b>	<b>Resumen</b> .....	2
<b>2.</b>	<b>Marco Institucional del proyecto donde se insertan las actividades del Servicio Social</b> .....	3
<b>3.</b>	<b>Introducción</b> .....	4
<b>4.</b>	<b>Antecedentes del proyecto donde se realizaron las Actividades del Servicio Social</b> .....	6
<b>5.</b>	<b>Ubicación geográfica del proyecto donde se realizaron las Actividades del Servicio Social</b> .....	8
<b>6.</b>	<b>Objetivo general del proyecto</b> .....	9
6.1.	Objetivo general del proyecto de Servicio Social.....	9
6.2.	Objetivos particulares del proyecto de Servicio Social.....	9
<b>7.</b>	<b>Especificación y fundamento de las actividades desarrolladas</b> .....	10
7.1	Preparación de soluciones, reactivos y materiales.....	10
6.1.1.	Dilución de Hormona Luteinizante.....	10
6.1.2.	Preparación de buffer fosfato salino (PBS).....	11
6.1.3.	Apoyo en la preparación de medio de cultivo.....	12
6.1.4.	Preparación de Digestión Enzimática.....	13
6.1.5.	Amortiguadores de la extracción de proteínas.....	14
6.1.6.	Buffer de lisis para MTT.....	15
6.2.	Manejo de equipos y técnicas bioquímicas.....	16
6.2.1.	Colección y procesamiento de ovarios de vacas sacrificadas para la obtención de células de la teca.....	16
6.2.2.	Determinación de progesterona, S1P y androstenediona por la prueba de ELISA competitiva.....	20
6.2.3.	Viabilidad celular por la técnica de MTT.....	21
6.2.4.	Extracción y cuantificación de proteínas de células de la teca en suspensión con homogenización y el método de Bradford.....	22
6.2.4.1.	Actividad de apoyo en la extracción de proteínas.....	22
6.2.4.2.	Actividad de colaboración en la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Ensayo de proteína azul de Coomassie).....	24
<b>8.</b>	<b>Impacto de las actividades del Servicio Social en el proyecto</b> .....	25
<b>9.</b>	<b>Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del Servicio Social</b> .....	25
<b>10.</b>	<b>Fundamento de las actividades del Servicio Social</b> .....	26
<b>11.</b>	<b>Referencias</b> .....	27

## **1. Resumen**

La reproducción animal, es el proceso por el cual los seres vivos producen nuevos individuos semejantes a los progenitores, asegurando la perpetuación de las especies. La reproducción sexual, se lleva a cabo por los órganos reproductores tanto femeninos como masculinos, el órgano reproductor bovino en el que más se enfocó este servicio social, fue en el ovario, se apoyó en actividades relacionadas con la investigación de la funcionalidad de las células de la teca de bovino, en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X), el objetivo general de este servicio social fue participar proactivamente en el funcionamiento del laboratorio "Bioquímica de la Reproducción" de la UAM-X con la finalidad de adquirir competencias específicas-profesionales. Dada la versatilidad de las sustancias que se pueden encontrar en las células de la Teca, se pueden llevar a cabo diversas técnicas bioquímicas como Ensayos de Inmunoadsorción Ligado a Enzima (ELISA- competitiva), Ensayos de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol (MTT), extracción y cuantificación de proteínas para después ser estudiadas y evaluadas a gran escala, con el fin de comprender con precisión sus interacciones y funciones generales en los diversos procesos biológicos. Igualmente, durante el procesamiento de las muestras, se fue capacitando a la suscrita para mejorar sus habilidades dentro del laboratorio, con el fin de poseer y comprender las buenas prácticas de laboratorio.

Palabras Clave: Células de la Teca, Folículo, Hormona Luteinizante, Ovario, Técnicas Bioquímicas.

## **2. Marco Institucional del proyecto donde se insertan las actividades del Servicio Social**

La Universidad Autónoma Metropolitana, se fundó en 1974, el primer rector de la Unidad Xochimilco fue el Dr. Ramón Villarreal. El Dr. Villarreal, con la colaboración de los doctores Juan César García y José Roberto Ferreira redactaron el “Documento Xochimilco”, en el cual plantearon la tarea de redefinir el papel de la educación superior. En esencia, el sistema modular incorpora dos elementos nuevos al proceso de enseñanza-aprendizaje: la interdisciplina y la aplicación del conocimiento a una problemática de la realidad socialmente definida, ambas concepciones se interrelacionan en una premisa que postula el sistema modular: el objeto de transformación, a partir del cual se desprenden los fundamentos epistemológicos y pedagógicos del sistema (Villarreal *et al.* 1974; Arbesú y Berruecos, 1996).

En el sistema modular, el estudiante debe participar en dos niveles en el proceso de transformación de la realidad o de producción de conocimientos (empírico-inductivo): en la búsqueda de información empírica, a través del experimento y en la producción de conceptos a partir de "los productos teórico-ideológicos ya existentes" (teórico-deductivo), ambos conocimientos adquiridos se ven reflejados en el “problema eje”, el cual es una investigación del objeto de transformación, se presenta como una tesina y se realiza en cada módulo trimestral (Villarreal *et al.* 1974; Arbesú y Berruecos, 1996).

Dentro de dicho documento que proporcionó el manejo de la enseñanza dentro de la UAM- Xochimilco, se encuentra la descripción del Departamento “El Hombre y su Ambiente”, para el que propusieron un enfoque que respondía a la práctica emergente de la profesión: el manejo de los recursos naturales. En este sentido la Licenciatura en Biología tiene como objetivo: *Formar profesionales creativos y críticos capaces de realizar actividades científicas para desarrollar y evaluar, con una perspectiva multidisciplinaria, estrategias de manejo de los recursos naturales bióticos con base en metodologías propias de las ciencias biológicas.*

### **3. Introducción**

La reproducción animal, es el proceso por el cual los seres vivos producen nuevos individuos semejantes a los progenitores, asegurando la perpetuación de las especies. En los animales existen dos tipos de reproducción: sexual y asexual. En la reproducción asexual, participa un solo individuo, por lo tanto, la unidad reproductora puede ser una célula o un grupo de células, dando lugar a un individuo genéticamente igual al progenitor (Gobierno de Canarias, 2012; Cervera *et al.* 2019). La reproducción sexual, se lleva a cabo por los órganos reproductores tanto femeninos como masculinos, en ellos se albergan y maduran a dos células haploides llamadas gametos, que son básicamente el espermatozoide para el caso del macho y óvulo para la hembra, ambos son esenciales para la reproducción, y ésta consiste en la unión (fecundación) de los gametos, tras ella se forma una célula diploide denominada cigoto, en la cual se mezclan los materiales genéticos, dando lugar a nuevas y únicas combinaciones genéticas, para los descendientes los cuales adoptan algunas de las características de ambos progenitores y por lo tanto aumentan la variabilidad de las especies y favorecen los procesos de adaptación al medio y la evolución (Gobierno de Canarias, 2012; Cervera *et al.* 2019; Megías *et al.* 2023).

El aparato reproductor de la hembra bovina está compuesto por dos ovarios, que además de elaborar las hormonas femeninas (Estrógenos, Progesterona, entre otras), albergan y maduran los folículos, que darán lugar a los óvulos y cuerpos lúteos, son cicatrices que crecen sobre el sitio de la ovulación del celo anterior y dos oviductos, que como su nombre lo indica, conducen los óvulos desde el infundíbulo (zona que rodea y cosecha a los ovarios) y ampulla (zona más alta, cercana al ovario), hasta el istmo (zona cercana al útero) que es dónde se produce la fecundación; dos cuernos uterinos y un útero, el cual es el órgano donde se produce la gestación; un cérvix, que comunica el útero con la vagina; la vagina, que es el órgano copulador y por último la vulva, que son los genitales externos (Megías *et al.* 2023; Gobierno de Canarias, 2012; Nebel y DeJarnette, 2011)

El órgano reproductor bovino en el que más se enfocó este servicio social, fue en el ovario, dentro de los procesos importantes que ocurren en él destaca la foliculogénesis que implica la diferenciación, proliferación y sobrevivencia de las células foliculares, la ovogénesis que comprende el desarrollo y maduración del ovocito, y en conjunto son las unidades funcionales del ovario. Los folículos que son parte de los temas centrales de la investigación donde se participó, están conformados por ovocitos (Ov), células de la

granulosa (CG), células de la teca (CT), se caracterizan por estar lleno de líquido folicular, además de tener una buena proliferación, y de poseer una alta variación de tamaño, se ha hallado que el folículo más grande en el ovario es considerado "el dominante", y es el que probablemente ovule cuando el animal entre en celo. Con el tiempo, más del 95% de los otros folículos entran en regresión y mueren sin ovular, siendo reemplazados por una nueva generación de folículos en crecimiento, existen factores de crecimiento y hormonas que promueven estos procesos como la Hormona Luteinizante (LH), la Hormona Folículo Estimulante (FSH), entre otras de origen hipofisiario. Por el momento se sabe, que los folículos crecen en oleadas y en un ciclo de 21 días se dan aproximadamente 3 oleadas foliculares, donde, de 20 a 50 folículos crecen en cada onda y sólo uno se torna en dominante por su mayor crecimiento: es el que será liberado y los restantes involucionarán. El líquido folicular contiene la hormona estrogénica, responsable de la aparición del calor o estro. (Nebel y DeJarnette, 2011; Rosales *et al.* 2011; Gasque, 2016; Liu *et al.* 2020).

Las células con las que se trabajó todo el tiempo durante el servicio fueron las Células Teca (CT), éstas incluyen células de la teca externa o estromal (CTE), las cuales se componen principalmente de células similares a fibroblastos, que forman una cubierta de lámina basal, cuya función es revestir el folículo ovárico, y las células de la teca interna o intersticial (CTI), compuestas por células del endotelio vascular y células inmunitarias, que su ocupación es secretar algunos factores de crecimiento (IGF) y hormonas (esteroidogénesis). Estas células juegan un papel importante en el reclutamiento, crecimiento, selección, ovulación y atresia folicular (Descriptores en Ciencias de la Salud, 2018; Gan *et al.* 2020; Maturin, 2021). Las CTI son esteroidogénicas y producen principalmente andrógenos, los cuales son transformados, mediante la aromatización, que sirven como precursores de los estrógenos en las CG. Estudios previos han demostrado que la proliferación, diferenciación y regulación del desarrollo folicular de las CT requieren la asistencia de CG (Descriptores en Ciencias de la Salud, 2018; Gan *et al.* 2020; Maturin, 2021). Aunque las células de la teca interna no están en contacto directo con el ovocito, su papel en la maduración de éste lo ejercen mediante la producción de andrógenos, mismos que son convertidos en estrógenos por las células de la granulosa. Además, las células de la teca favorecen el establecimiento de la red capilar que apoya el desarrollo folicular. Por otra parte, los nuevos conocimientos indican que el ovocito no es un elemento pasivo en el desarrollo folicular, sino que regula la función de las células foliculares; lo que significa que él mismo participa en la creación de un microambiente óptimo para su maduración.

También, es posible que el ovocito tenga un papel en la activación del desarrollo de los folículos primordiales (Hernández, 2016).

Los pasos que conciernen la esteroidogénesis de las Células de la Teca, suceden cuando éstas responden a la LH durante el desarrollo de folículos antrales, ésta se une al receptor acoplado a proteína Gs, incrementando la producción de AMP cíclico (AMPc) con la subsecuente activación de la proteína cinasa A dependiente de AMPc (PKA) para estimular la síntesis de hormonas esteroideas como los andrógenos, factores de crecimiento, la proliferación y sobrevivencia de CT (Guzmán *et al.* 2017; Medina, 2021). Asimismo, contribuyen en el transporte de nutrientes a las CG y a los Ov a través de las estructuras vasculares (Descriptores en Ciencias de la Salud, 2018; Liu *et al.* 2020; Gan *et al.* 2020; Maturín, 2021).

Dada la versatilidad de las sustancias que se pueden encontrar en las CT, se pueden extraer considerando su rendimiento para posteriormente ser sometidas a diversas técnicas como a Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima (ELISA- competitiva), Ensayos de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol (MTT), extracción de proteínas para después estudiarlas y ser evaluadas a gran escala, para comprender con precisión sus interacciones y funciones generales en los diversos procesos biológicos mencionados, es por eso que es importante que se lleve a cabo dentro de una institución con alto prestigio y capital, para poder solventar el alto gasto económico que puede representar, además de que sirve como apoyo para el incremento de conocimiento dentro de la sociedad, es por ese motivo que el objetivo de este Servicio Social fue: *Participar proactivamente en el funcionamiento del laboratorio “Bioquímica de la Reproducción” de la UAM-X con la finalidad de adquirir competencias específicas-profesionales.*

#### **4. Antecedentes del proyecto donde se realizaron las Actividades del Servicio Social**

La misión del laboratorio “Bioquímica de la Reproducción” es construir y abonar conocimiento a la Biología Reproductiva de los animales de producción. El proyecto en el que se participó lleva como nombre “Estudio celular y molecular de gónadas y gametos”, específicamente se ha enfocado en moléculas y procesos biológicos involucrados en el funcionamiento de las células ováricas, células de la granulosa y teca. Para estos fines, se han establecido diversas técnicas de laboratorio como la obtención y procesamiento de

muestras biológicas de ovarios de vacas sacrificadas en rastro, determinaciones hormonales, viabilidad celular, extracción y cuantificación de proteínas, así como, técnicas de biología molecular, entre otras.

Con este servicio social, se apoyó en actividades relacionadas con la investigación de la funcionalidad de células de la teca de bovino. Los antecedentes directos que cuenta el grupo de investigación del Laboratorio "Bioquímica de la Reproducción" involucran la participación de un metabolito de esfingolípidos denominado esfingosina 1-fosfato (S1P) como mediador de los efectos biológicos de la hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). Dentro de los efectos biológicos que se han estudiado, son la viabilidad y esteroidogénesis de células de la teca y granulosa.

En la actualidad está bien documentado que los esfingolípidos actúan como reguladores de la dinámica de la membrana plasmática, participan como segundos mensajeros en diversas cascadas de señalización, regulando procesos importantes en la fisiología celular como crecimiento, diferenciación y muerte celular (Hernández, 2016).

La esfingosina-1-fosfato (S1P) pertenece a la familia de los esfingolípidos, que incluyen a las ceramidas, la esfingomielina y otros derivados fosforilados y glicosilados. Los esfingolípidos son una clase de lípidos que contienen un esqueleto de bases esfingoide y están involucrados en varios procesos funcionales. La ceramida y la esfingosina se han descrito como potentes inhibidores del crecimiento celular y como inductores de la apoptosis. Por el contrario, S1P es un mediador de lípidos pleiotrópicos, que regulan la supervivencia, migración y proliferación celular, así como reordenación del citoesqueleto, formación de uniones gap y angiogénesis, entre otras funciones. El equilibrio entre el nivel intracelular de ceramida y esfingosina con S1P, también referido como el reóstato ceramida/S1P, es esencial para el destino celular. Es importante señalar que la ceramida, la esfingosina y la S1P son interconvertibles y, por tanto, dependiendo del estímulo que reciban las células, el reóstato de ceramida/S1P puede inducir la degradación del tejido o crecimiento (Hernández *et al.* 2019).

Cada vez hay más pruebas que involucran a los esfingolípidos, en general, y particularmente a S1P en funciones reproductivas. En las células ováricas, la síntesis de S1P está asociada con la salud folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo, así como la síntesis de esteroides sexuales. Además, la eliminación del S1P (es decir, S1PR2/S1PR3) reduce la fertilidad, mientras que la administración de hexógeno S1P protege las células ováricas

de la radiación o de los fármacos citotóxicos utilizados en la terapia del cáncer. Si bien S1P ha estado involucrado en procesos fisiológicos normales, también está involucrado en condiciones fisiopatológicas como hipertensión, aterosclerosis, diabetes y algunos trastornos cardíacos. A nivel ovárico, una reducción de S1P está asociado con el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), mientras que la sobreproducción de S1P promueve el crecimiento del carcinoma epitelial de ovario (Hernández *et al.* 2019).

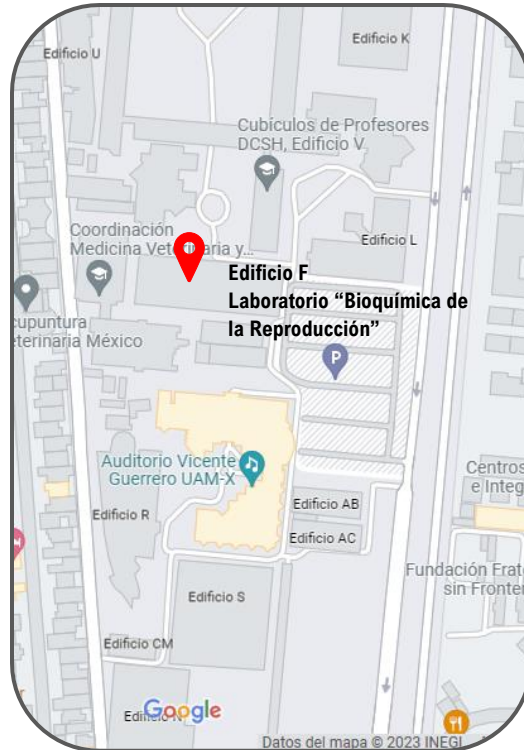
Los resultados de este laboratorio indican que, la viabilidad de células de la teca en cultivo por 96 h fue mayor con la adición de 0.1 y 1 ng/mL de LH. Mientras que, con el uso de una dosis mayor de LH (10 ng/mL) existe una reducción en el número de células de la teca viables ( $P < 0.05$ ) en comparación con 0.1 y 1 ng/mL, pero similar a las células a las que no se adiciona LH. De manera similar, la adición de 0.1 ng/mL de LH al medio de cultivo de células de la teca de bovino, incrementa la síntesis de S1P en comparación con el control (0 ng/mL de LH). Sin embargo, dosis mayores a 0.1 ng/mL de LH (1 ng/mL y 10 ng/mL) no incrementan la síntesis de S1P respecto al control ( $P < 0.05$ ) (Medina *et al.* 2021).

Adicionalmente, se identificó por Western Blot la presencia de la esfingosina cinasa 1 fosforilada (SK1p), enzima encargada de convertir esfingosina a S1P. Para determinar el papel de S1P como mediador de LH en los efectos de viabilidad celular y esteroidogénesis, se realizaron cultivos de CT a los que se les adicionó el inhibidor SKI-178 en presencia o ausencia de 0.1 ng/mL de LH. La viabilidad celular se determinó por la técnica de MTT y observó un incremento en presencia de 0.1 ng/mL de LH y una reducción en presencia del SKI-178. Estos resultados revelan por primera vez que la LH estimula la síntesis de S1P en CT y, además, reconoce el papel de S1P como mediador de los efectos de LH en la viabilidad celular y síntesis de progesterona en CT de bovino en cultivo (Medina *et al.* 2021).

### **5. Ubicación geográfica del proyecto donde se realizaron las Actividades del Servicio Social**

En el Laboratorio "Bioquímica de la Reproducción" (*Figura 1*), se desarrollaron las actividades referentes a este servicio social. Forma parte de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Producción Agrícola y Animal, que se encuentra dentro de la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana, con dirección

Edificio F, segundo piso, ala poniente, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04960, CDMX, México.



**Figura 1.** Ubicación Geográfica del Laboratorio “Bioquímica de la Reproducción” dentro de la UAM-Xochimilco (Google Maps, 2023; Adaptado de Ubicación de Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la UAM-X [Captura de Pantalla], por Google Maps, 2023, Google. (<https://www.google.com.mx/maps/place/19%C2%B018'08.1%22N+99%C2%B006'11.8%22W/@19.3020615,-99.1032511,17z/data=!4m4!3m3!8m2!3d19.30225!4d-99.1032778>)).

## **6. Objetivo general del proyecto**

### *6.1. Objetivo general del proyecto de Servicio Social*

Participar proactivamente en el funcionamiento del laboratorio “Bioquímica de la Reproducción” de la UAM-X con la finalidad de adquirir competencias específicas-profesionales.

### *6.2. Objetivos particulares del proyecto de Servicio Social*

1. Colaborar para su entendimiento en las actividades relacionadas con el manejo general del Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción.

2. Intervenir en algunas de las técnicas que se realizan de manera cotidiana en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, para entender el fundamento de éstas.
3. Comprender la relevancia de las buenas prácticas del Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la UAM-X.

## **7. Especificación y fundamento de las actividades desarrolladas**

Previo a cada una de las actividades que se desarrollaron en este servicio social, se debió limpiar, desinfectar y esterilizar cada uno de los materiales, envases de reactivos y zonas de trabajo, siguiendo el protocolo de sanidad e inocuidad del laboratorio, el cual consta del uso constante de guantes, bata y de limpieza con detergentes enzimáticos y/o con etanol al 75%, y/o con el uso del autoclave, y/o con irradiación U.V., en determinados casos, para materiales, y limpieza con cloro al 4% para las instalaciones, esto con el fin de tener un buen manejo y funcionamiento de los materiales, lo cual se vio reflejado en los resultados de los experimentos.

### *7.1 . Preparación de soluciones, reactivos y materiales*

#### *6.1.1. Dilución de Hormona Luteinizante*

Las gonadotropinas (LH y FSH) son producidas por los gonadotrofos de la adenohipófisis, en el sistema endocrino. Específicamente la LH es una glucoproteína, esto quiere decir que es un dímero formado por dos subunidades glicoproteicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), la subunidad  $\alpha$  es común entre la LH y FSH, mientras que  $\beta$ LH y  $\beta$ FSH son específicas para cada hormona respectivamente, diferenciando así su actividad biológica, su regulación la ejerce principalmente la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Guzmán *et al.*, 2017). En las hembras, la LH desempeña un papel importante en el ciclo estral y en la producción de hormonas sexuales, durante la fase ovulatoria del ciclo estral, los niveles de LH aumentan rápidamente, lo que desencadena la liberación del óvulo maduro de los ovarios. Este aumento en los niveles de LH se conoce como "pico de LH" y es necesario para la ovulación. La célula de la teca tiene receptores para la LH, por lo que cuando los niveles de LH aumentan durante la fase ovulatoria, estimula a las células de la teca para que produzcan hormonas esteroides, como los andrógenos, estos se difunden a través de la granulosa y se convierten en estrógenos por acción de la enzima aromatasa. Estos estrógenos son

importantes para el desarrollo y maduración del ovocito en el folículo ovárico (Guzmán *et al.* 2017; Medina, 2021).

Las diluciones de los tratamientos hormonales fueron: 0 como control y 0.1 ng/mL de LH, estudios previos del laboratorio, indicaron que, esa concentración de LH es la ideal para favorecer la proliferación y sobrevivencia de las Células de la Teca (Ruíz *et al.* 2005; Chedid y Padilla, 2008; Guzmán *et al.* 2017; Medina, 2021). En las diluciones los materiales utilizados fueron micropipetas, puntas blancas, azules y amarillas, filtros de 70 µL, jeringas de 5 mL, reservorios de tubos de 50 y 15 mL, crioviales de 2 mL, tubos de 200 µL y de 1.5 mL, y los reactivos fueron la hormona LH del laboratorio (Sigma L5264) y la donada por la UNAM, medio de cultivo sin suplementar y agua inyectable.

Para la dilución de la Hormona Luteinizante se utilizó una regla de tres, donde la relación inicial fue de 0.1= 0.5, se sabe que las hormonas (Sigma L5264 y UNAM) tuvieron 24 mg que equivalen a 24 000 µg, los cuales se diluyeron en 1 000 µL de agua según el inserto, se obtuvo una concentración de 24ng en 1 µL de agua, después se realizó otra regla de tres, donde se buscaba obtener una concentración de 500 ng de LH, entonces se multiplicó los 500 ng de la hormona previamente diluida por 1 µL de agua, entre los 24 ng, teniendo un resultado de 20.83 µL de hormona a tomar, esta cantidad se llevó a 1 000 µL con la ayuda de 979.19 µL de agua para obtener la concentración de 500 ng/mL. Para crear la concentración de 10 ng/mL, se tomó 200 µL de la dilución previa y se adicionó 1 800 µL de agua para obtener 2 mL, después se tomó 200 µL de la dilución de 10ng/mL para generar la concentración de 1 ng/mL, igualmente se le agregó 1800 µL de medio sin suplementar (McCoy's 5<sup>a</sup> modificado), para la concentración de 0.1 ng/ µL, se ocupó 200 µL de la concentración anterior y 1 800 µL de medio sin suplementar, para obtener 2 mL de la dilución que se utilizaron durante los experimentos.

#### 6.1.2. Preparación de buffer fosfato salino (PBS)

El PBS, es una solución amortiguadora e isotónica, cuya función es mantener el pH y la presión osmótica lo más parecido al ambiente fisiológico, por lo tanto, no es tóxico para las células (Gil, 2019).

Los materiales utilizados para esta solución fueron: balanza analítica, matraz aforado de 500 mL, potenciómetro, vaso de precipitados de 1 L, parrilla de agitación, mosca, micropipeta de 1 000  $\mu$ L y los reactivos que contuvo el PBS son Cloruro de sodio (NaCl), Cloruro de potasio (KCl), Fosfato de sodio bifásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), se necesitó la Molaridad y Peso Molecular (P.M.) de los compuestos para poder conocer la cantidad en gramos que se necesitaba de cada uno en 1 litro de una solución. Es por eso que se ocupó la siguiente ecuación:

$$g = (P.M.)(V)(M \text{ o } N)$$

g= Gramos.

P.M.= Peso Molecular.

V= Volumen en litros.

M o N= Molaridad o Normalidad.

NaCl: (58.44 PM) (1 L) (0.137 M) = 8.00628g NaCl.

KCl: (74.56 PM) (1 L) (0.0027 M) = 0.201312g KCl.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : (358.14 PM) (1 L) (0.01 M) = 3.5814g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : (136.09 PM) (1 L) (0.002 M) = 0.27218 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Todos los reactivos se diluyeron en 500 mL de agua destilada y se llevaron a agitación, después de que se solubilizaron las sales, se ajustó a un pH de 7.4 y se aforó a 1 L, la solución se colectó en frascos de vidrio y se esterilizaron con la ayuda de una autoclave por 45 min, una vez fría la solución se mantuvo en refrigeración a 20°C, hasta su uso.

### 6.1.3. Apoyo en la preparación de medio de cultivo

El medio de cultivo es un líquido que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables y específicas, tanto de pH, como de temperatura, las funciones biológicas de las células, como el crecimiento (Bolaños, 2017; Mediavilla, 2018). El medio de cultivo puede ser enriquecido adicionalmente con suplementos como sales, aminoácidos, antimicrobianos, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, extracto de tejidos, sueros

Para la preparación del medio de cultivo se pesaron los siguientes reactivos: 2.6 gr de Hepes (SIGMA H6147), 0.2192 gr de L-Glutamina (Sigma G8540), 0.5 gr de Albúmina Sérica Bovina (Sigma A7030), 100  $\mu$ L de Selenito (20 ng/mL), 5 mL de Penicilina y Estreptomina (Sigma P4333), 125  $\mu$ L de Transferrina (10 mg/mL), 50  $\mu$ L de Insulina (100 g/mL), 50  $\mu$ L de IGF-1 (1ng/mL) y 500 mL de Medio de McCoy's 5<sup>a</sup> modificado, y se utilizaron los siguientes materiales: 1 parrilla de agitación, 1 espátula, 1 mosca, 1 par de guantes estériles, 5 tubos de 50 mL, 5 tubos de 15 mL, micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L y de 10 a 100  $\mu$ L, puntas de 200  $\mu$ L y de 1000  $\mu$ L, 4 viales estériles de 10' mL y 1 de 250 mL, 1 manguera de látex, 1 unidad de filtración (Thermo Scientific con poro de 0.45 $\mu$ m), 1 balanza analítica y 1 campana de flujo laminar. El proceso de preparación fue el siguiente, se introdujo la parrilla de agitación a la campana de flujo laminar, en ella se colocó la botella de medio y dentro de ella se insertó la mosca, se comenzó a agitar y se vertieron los demás reactivos hasta que se homogenizó la mezcla. Una vez integrados todos los componentes al medio de cultivo, se colocó la manguera en la unidad de filtración y en el vacío de la campana, para filtrar el medio y ya filtrado se alicuotó en los viales estériles, anteriormente etiquetados, para ser almacenados en el refrigerador entre 4 a 8 °C.

#### 6.1.4. Preparación de Digestión Enzimática

El procesamiento tradicional para la disgregación celular primaria de tejidos sólidos requiere de tratamientos mecánicos y/o enzimáticos, permitiendo la rapidez del análisis celular a favor del investigador en el menor tiempo posible. Las técnicas que se usan para aislar células primarias son diversas, sin embargo, para la liberación celular, se requieren enzimas que desintegren componentes estromales, uniones de adherencia intercelular y extracelular, cuya gama de enzimas comerciales son aptos para la desintegración tisular (Buttery y Bishop, 2005), las enzimas que se usan con mayor frecuencia son las colagenasas del tipo clostridial (de la bacteria anaerobia, *Clostridium histolyticum*), las tripsinas purificadas de origen animal; ambos reactivos hidrolizan proteínas estructurales como el colágeno trihelicoidal, que actúa como andamios de tejidos para el crecimiento de células, que al ser hidrolizados liberan y facilitan la separación de células del tejido animal, produciendo una alta viabilidad celular (López *et al.* 2007; Cisneros, 2019; Merck, 2023a). Las DNAasas ayudan a reducir la viscosidad resultante de la liberación elevada de ácidos nucleicos de las células dañadas durante la disgregación, su función consiste en la rotura

enzimática del ADN y el ARN, además su uso incrementa la viabilidad celular (Merck, 2023b). Algunos autores realizan combinaciones enzimáticas de colagenasa/tripsina para obtener mayor densidad celular, asimismo infieren que no altera la expresión de ciertos marcadores de pluripotencial (Cisneros, 2019).

Los reactivos que conformaron la solución amortiguadora de lisis son: 10 mL de digestión enzimática por cada 1000 mg de tejido son: 11.3 mg de Colagenasa (Sigma C2674), 1 mg de DNAsa (Sigma DN25), 1 mL de DPBS 1x (Gibco 14200-075) y 9 mL de agua estéril, estos reactivos fueron pesados con la ayuda de una balanza analítica y 1 espátula limpia, todos los reactivos se mezclaron en un tubo de 15 mL hasta homogenizarse y se mantuvieron en reposo hasta llegar al paso donde se utilizaron, esta digestión se detuvo con 100 µL de Suero Fetal Bovino (SFB) por cada mL de digestión.

#### 6.1.5. Amortiguadores de la extracción de proteínas

Las proteínas son biomoléculas abundantes en los sistemas vivos, realizan una gran variedad de funciones esenciales, por lo que se les considera como protagonistas en gran número de procesos bioquímicos para el mantenimiento y función de cada organismo. La purificación de proteínas permite su estudio de manera individual, lo que ha permitido conocer su función biológica, además de que brinda la oportunidad de su enfoque en aplicaciones tecnológicas (Berg *et al.* 2002; Bauer *et al.* 2015; Ramírez *et al.* 2021; Arteaga *et al.* 2021).

En el caso de las soluciones para la extracción de proteínas se utilizará una mezcla de 50 mM de Tris- hidroclorehidrico (Tris-HCl), 6 M de Urea y 5 mM de Ditiotretitol (DTT), con un pH de 7.4, para el primer amortiguador, además se le adicionará un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich, 0.20 mM de Aprotinina, 5.25 mM de Leupeptina y 1.8 mM de PepstatinaA) y uno de fosfatasa (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail, Pierce, Thermo Scientific, 1mM de Ortovanadato de Sodio) en proporción 2 y 5 µL a 1 mL, se utilizará 300 µL en cada pozo, el segundo amortiguador contendrá 50 mM de Tris-HCl, 6 M de Urea, con un pH de 8. Para conocer los gramos que se necesitarán de cada reactivo se empleará la misma fórmula que en el caso de la preparación de PBS, igualmente se utilizará balanza analítica, potenciómetro, parrilla de agitación, una mosca, vaso de precipitado y agua destilada, todos los reactivos se vertieron en el vaso de precipitados con la cantidad de

agua que se necesitaba y se homogenizó en la parrilla, posterior a esto se midió el nivel de pH que tuvieron las soluciones y se ajustó al pH necesario con la ayuda de ácido clorhídrico (HCl) o con hidróxido de sodio (NaOH).

El empleo de inhibidores de proteasas y fosfatasa es fundamental pues ellos mantienen la integridad de las proteínas, ya que el rompimiento de las membranas celulares permite la interacción de la proteína de interés con proteínas de la misma célula que tienen la capacidad de romper los enlaces peptídicos (enzimas proteasas) y la función de los amortiguadores es solubilizar la proteína para poder separarla de los restos celulares mediante centrifugación, además los distintos niveles de pH permiten que las moléculas que no se unieron al tuvo se disocien y se recuperen (Ramírez *et al.* 2021). Los amortiguadores son por lo general soluciones de ácidos débiles y de sus bases conjugadas o de bases débiles y sus ácidos conjugados (Túnez *et al.* 2001).

El uso de HCl y NaOH consiste en la neutralización, basificación o acidificación de los amortiguadores, pues es fundamental que estos mantengan el pH en los mismos niveles de los procesos vitales, a pesar de que se agreguen pequeñas cantidades de los lisados celulares ácidos o básicos, de esto dependió la efectividad de la técnica, pues la acción enzimática y las transformaciones químicas de las células se realizan dentro de unos estrictos márgenes de pH (Túnez *et al.* 2001; Ibero, s.f.).

#### 6.1.6. *Buffer de lisis para MTT*

El buffer de lisis para MTT, se utiliza para la lisis preferencial de los glóbulos rojos de la sangre, con el fin de obtener una muestra más limpia a la hora de verificar la viabilidad celular (Novachem, s.f.). Las sustancias que se utilizaron para 10 mL de buffer de lisis fueron: 5 mL H<sub>2</sub>O destilada, 5 mL de N-Dimetilformamida (D4551-sigma), 2 gr de SDS (161-0301-Biorad), 250 µL de ácido acético 1 N (9507-02- J. T. Baker) y 250 µL ácido clorhídrico 1 N y el equipo utilizado fue; 1 mosca, 1 parrilla de agitación, 1 vaso de precipitado, 1 balanza analítica, micropipeta de 1000 µL, puntas azules y un reservorio. Las sustancias se mezclaron en la parrilla con la ayuda de la mosca hasta homogenizarse y se colocó en el reservorio hasta utilizarse, este producto no era necesario hacerlo en un ambiente estéril.

## 6.2. Manejo de equipos y técnicas bioquímicas

### 6.2.1. Colección y procesamiento de ovarios de vacas sacrificadas para la obtención de células de la teca

#### 6.2.1.1. Actividad para la colección de ovarios y obtención de sacos foliculares de bovinos

Se obtuvieron de 4 a 6 ovarios de vacas sacrificadas de un rastro municipal ubicado en Temamatla, Estado de México. Los ovarios fueron lavados y transportados al laboratorio "Bioquímica de la Reproducción" de la UAM Xochimilco en solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% a una temperatura de 35-37°C en un lapso no mayor a 120 min. Una vez en el laboratorio, se procedió a retirar el exceso de tejido, se realizaron varios lavados, en frascos estériles, con SSF al 0.9% a 37°C, y un lavado con 10 a 15 mL de etanol al 75% a 37°C y posteriormente se hicieron más lavados con SSF, esto con la finalidad de quitar el exceso de sangre y contaminantes. Posteriormente los ovarios se mantuvieron a 37°C en SSF y medio de cultivo (10:1), hasta la disección, es importante que se conserven en esa temperatura durante todo el proceso pues ayuda a mantener el estado funcional de los tejidos desde el momento en que se corta la circulación sistémica del organismo, dado que los fenómenos hipóxicos e isquémicos que alteran el metabolismo celular por la ausencia de energía ATP, conducen al desequilibrio osmótico e iónico afectando a los organelos que conllevan a la necrosis celular, por tales consecuencias, es que se suplen los requerimientos energéticos con SSF al 0.9% para la estabilización de la homeostasis celular. Por otro lado, el tipo de preservación, la elección del medio de soporte y el tiempo de transporte, también influirían en la sobrevivencia de células foliculares (Cisneros, 2019).

Se diseccionaron los folículos de 4 a 8 mm de diámetro, como se muestra en la Figura 2, para realizar una incisión en el folículo y poder liberar el líquido folicular, el ovocito y exponer el saco en su interior, se retiraron las células de la granulosa a través de un ligero raspado, todo este proceso sucedió sobre una plancha de calentamiento para que las células no pierdan la temperatura basal, hasta que fueron cultivadas en las placas. Posteriormente, se lavaron los sacos foliculares con medio McCoy's 5a modificado, previamente gaseado con el propósito de eliminar en su totalidad los restos de CG y el líquido folicular (Rosales *et al.* 2011; Descriptores en Ciencias de la Salud, 2018; Gan *et al.* 2020; Liu *et al.* 2020; Maturin, 2021). Con ayuda de unas tijeras curvas se procedió a cortar los sacos en fragmentos más pequeños y se depositaron en medio McCoy's 5a modificado.

Posteriormente los fragmentos se filtraron (filtro de Nylon de 70  $\mu\text{m}$ ), para obtener únicamente las trazas de los sacos foliculares y someterlos a digestión enzimática (Medina, 2021).



**Figura 2.** Ovario de Bovino y Sacos Foliculares de 4mm de diámetro.

*6.2.1.2. Apoyo en la extracción de células de la teca de bovinos;  
Digestión enzimática (disgregación de sacos foliculares)*

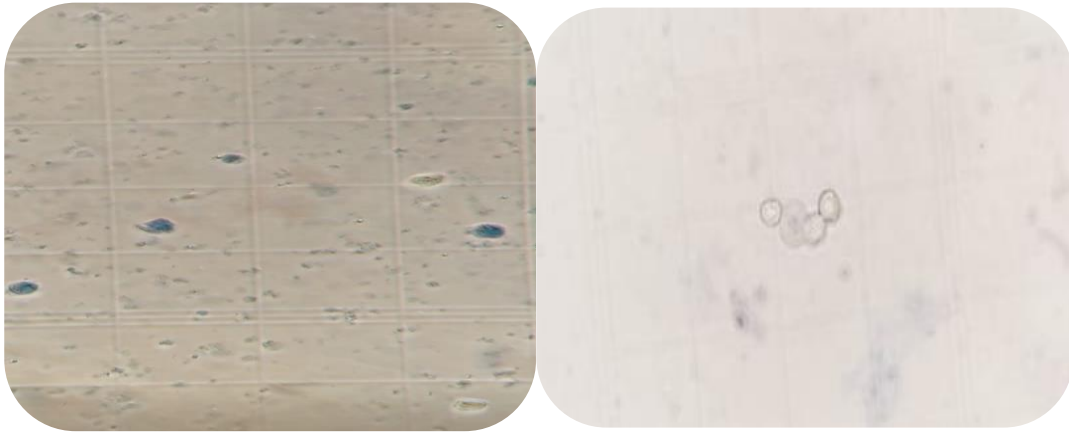
Los fragmentos de sacos foliculares se colocaron en un buffer de digestión enzimática. Se colocó la suspensión de células en una estufa a 37°C en agitación constante durante 20 minutos. La digestión se detuvo con la adición de suero fetal bovino (Sigma F2442) 100  $\mu\text{l}/\text{mL}$  de suspensión y se incubó durante 10 minutos a 37°C en agitación constante. Se filtró la suspensión en Filtros Falcón de nylon de 70  $\mu\text{m}$  para obtener únicamente las Células de la Teca, descartando el tejido no digerido y se procedió a centrifugar a 1 700 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 2.5 mL de DPBS 1x a cada pool para eliminar los glóbulos rojos y se centrifugó nuevamente por 10 min a 1 700 rpm. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células de la teca en un mililitro de medio gaseado y se realizó la cuantificación celular usando azul de tripán.

*6.2.1.3. Actividad para el conteo de número de células de la teca por azul de tripán (4%)*

La tinción con azul tripán, azul tripano o trypan blue nos permite distinguir las células no viables de las viables expresando en función del porcentaje de estas últimas su viabilidad, esta técnica consiste en que las células vivas, con membrana citoplasmática íntegra,

excluyen el colorante y no se tiñen; en cambio penetra en las muertas con lesión de la membrana celular lo que hace que se vean de color azul, como se muestra en la Figura 3 y Figura 4 (Strober, 2001).

El número de células de la teca fue evaluado tomando 90  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y 10  $\mu\text{L}$  de solución azul Tripán (4%). Esta mezcla fue colocada en una cámara de Neubauer doble para realizar el conteo de las 2 cámaras en 5 cuadrantes de cada una, el conteo de las células se tomaba en forma de Z para la cámara y en forma de L para cada cuadrante. El número de células totales fue obtenido usando la siguiente fórmula: promedio del número de células totales contadas en las 2 cámaras X 10,000 (constante) X 5 (Número de cuadrantes) X la dilución (mL), determinando así el número de células viables.



**Figura 3 y 4.** Cámaras de Neubauer con Células de la Teca de Bovino muertas (azules) y vivas (transparentes).

#### 6.2.1.4. Actividad de apoyo para el cultivo de células de la teca

Las células se cultivaron en placas de 4 o 96 pozos con tapa (Thermo scientific, NUNC estéril, 167008) en medio de cultivo McCoy's 5a modificado. Previo al sembrado de células, las placas se pre incubaron con medio de cultivo, 200  $\mu$ l por pozo para placas de 96 pozos y 900  $\mu$ l para placas de 4 pozos, durante 4 horas. Se realizaron 4 cultivos independientes con 4 réplicas y se mantuvieron en un periodo de estabilización de 48 horas en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y 90-95% humedad. Pasadas las 48 horas, se realizó el recambio de medio con los tratamientos siguientes: Control, 0.1  $\mu$ g/mL de LH de la marca Sigma y la misma cantidad de una Hormona Luteinizante donada por un laboratorio de la UNAM, además se revisaron las células con ayuda de un microscopio invertido (Microscopio de Fluorescencia Trinocular Olympus Optika Modelo 8X51), para verificar el correcto sembrado y proliferación de éstas, como se muestra en la Figura 5. Nuevamente a las 48 horas, se hizo el recambio de medio con los mismos tratamientos, manteniendo las condiciones en la incubadora, pasado el tiempo se extrajo 180  $\mu$ L o 720  $\mu$ L de medio de cada pozo, para placas de 96 y 4 pozos respectivamente, y fue almacenado en otra placa de 96 o 4 pozos, esto dependió de que tipo de placa se haya utilizado, con el fin de realizar otras actividades como pruebas ELISAS para el medio, y las células se mantuvieron en las mismas placas y fueron sometidas a otros ensayos como MTT o extracción de proteínas.



**Figura 5.** Células de la Teca de Bovino, en un pozo de placa, de 96 pozos, con tratamiento (LH). Fotografía tomada con microscopio invertido (Microscopio de Fluorescencia Trinocular Olympus Optika Modelo 8X51).

### 6.2.2. *Determinación de progesterona, S1P y androstenediona por la prueba de ELISA competitiva*

La técnica ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo, un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre (Equipos y Laboratorios de Colombia, 2011).

Para determinar la participación de S1P en la esteroidogénesis de células de la teca (Geethani *et al.* 2017; Pors *et al.* 2020; Medina, 2021), se cuantificó las hormonas progesterona, androstenediona y al mismo S1P en el medio de cultivo que se recolectó y se almacenó de los cultivos, para la prueba de ELISA se usaron los estuches comerciales DRG progesterona (EIA-1561), DRG androstenediona (EIA-2693) y DRG S1P (EIA-1559), se siguieron las instrucciones del inserto del fabricante. En este paso del proceso, se llevó a descongelación las placas de 96 pozos, hasta llegar a la temperatura ambiental, así como temperar los Kits para comenzar con las indicaciones del inserto.

Los pasos para la ELISA competitiva de S1P fueron:

1. Preparar la solución de lavado con ayuda de un matraz aforado, se mezcló agua inyectable con el reactivo de *wash solution* y se mantuvo en un vial estéril.
2. La dilución de los reactivos estándar entre ellos para obtener mayor cantidad de puntos en la curva.
3. La dilución de los reactivos estándar con PBS para obtener mayor cantidad de puntos en la curva.
4. Las diluciones se homogenizaron, primero se resuspendieron y después con la ayuda de un vortex de 3 segundos.
5. Los estándares y las diluciones se adicionaron a la placa que contiene el kit.
6. Se tomaron 100  $\mu$ L de medio de cultivo de las placas de 96 pozos y se vertieron a la placa del kit.
7. Se agregó 10  $\mu$ L de la *solución balance* a todos los pozos utilizados y se mezcló con la ayuda de pequeños golpes.

8. Inmediatamente se agregó 50  $\mu$ L de la *solución conjugada* a cada pozo, excepto en los pozos de los controles, nuevamente se mezcló con la ayuda de pequeños golpes y se cubrió con el plástico protector del kit y aluminio, y se incubó por 1 hora a 37°C.
9. Pasado el tiempo se lavaron las placas con ayuda del manifold y una jeringa de 50 mL llena de la *solución de lavado*, se realizó este paso 5 veces con duración de 10 segundos por lavado y con una agitación de 5 segundos.
10. Al término de los lavados, se sacudió el agua excedente y se secó a golpes en una toalla absorbente.
11. Después se agregó 50  $\mu$ L de los *sustratos A y B* a cada pozo, se cubrió la placa con el protector y el aluminio, y se incubó de 15 a 20 min a 37°C, sin pasar de los 30 min. En este paso a luz solar los reactivos de la placa dieron un color azul.
12. Posteriormente, se agregó 50  $\mu$ L de la *solución stop* a cada pozo y se mezcló bien a golpes pequeños.
13. Finalmente se leyó la placa en un espectrofotómetro (Smartec Plus-BIORAD) a una onda de 450 n.m.

### 6.2.3. Viabilidad celular por la técnica de MTT

El ensayo con MTT se utiliza para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, la proliferación y la citotoxicidad celulares (Castro, 2006; Acosta *et al.* 2018; Merck, 2023c).

El MTT es un ensayo colorimétrico, que se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán de color morado por las células metabólicamente activas, o sea las células viables (cuanto más oscura sea la disolución, mayor será el número de células metabólicamente activas viables), éstas contienen enzimas oxidorreductasas dependientes del NAD(P)H que reducen el MTT a formazán, además la actividad metabólica de las células incluye a las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la succinato deshidrogenasa, que se considera que son las principales en tener acción sobre el MTT, pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares. Las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT en formazán (Merck, 2023c; Herráez, s.f.)

Para esta actividad se alicuotó un poco de medio en un tubo de 50 mL, para ser gaseado en la incubadora durante 3 a 4 horas con condiciones de 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C con una humedad del 90%, durante el gaseado del medio, se calculó la cantidad de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol (MTT) que se utilizó en la dilución de 10mg de MTT por 2 mL de medio gaseado, se desarrolló como lo describe Hernández-Coronado et al (2016). Una vez gaseado, se retiró 180 µL de medio a cada pozo guardándolo en una placa nueva y estéril, y se adicionó 20 µL de la solución MTT a las células cultivadas, y se incubó nuevamente en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y 90% humedad durante 24 horas. Pasadas las 24 horas se agregó a cada pozo 100 µL de buffer de lisis para MTT, la placa se incubó por 4 horas a temperatura ambiente, en oscuridad. Finalmente, se midió la densidad óptica del medio a 595 n.m. en un espectrofotómetro Smartec Plus-BIORAD. El número de células se obtuvo mediante una curva estándar, la cual se construyó por duplicado mediante 7 diluciones sembrando 500 000, 250 000, 125 000, 62 500, 31 250, 15 625, y 7 812 células por pozo en placas de 96 pozos con tapa (Thermo scientific, NUNC estéril, 167008). A través de una ecuación de regresión se determinó la relación entre absorbancia y el número de células, con el programa 1x Assay Zap 3.0.

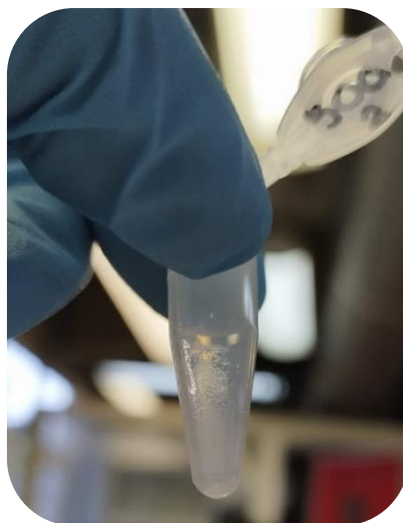
#### 6.2.4. *Extracción y cuantificación de proteínas de células de la teca en suspensión con homogenización y el método de Bradford.*

##### 6.2.4.1. *Actividad de apoyo en la extracción de proteínas*

Como se comentó con anterioridad, la extracción de proteínas es un proceso utilizado para obtener proteínas de una muestra biológica, como tejido, células o fluidos corporales. La extracción de proteínas es un paso fundamental en la investigación y el análisis de proteínas, ya que permite obtener una muestra purificada de proteínas para su posterior estudio. Cabe mencionar que el primer paso durante la purificación de las proteínas es romper las células o el tejido para tener acceso a las proteínas específicas, pues esta lisis celular y la solubilización de proteínas son fundamentales para un análisis eficaz y un procesamiento eficiente. El método de extracción puede ser enzimático, químico, mecánico o una combinación, los más utilizados se basan esencialmente en la homogenización de los tejidos y la destrucción de los límites celulares por medio de procedimientos mecánicos y químicos, obteniendo lo que se denomina *extracto crudo*, si es necesario se pueden realizar centrifugaciones diferenciales para obtener fracciones subcelulares o para aislar

organelos específicos, y básicamente, las proteínas asociadas a la membrana quedarán en el pellet y las solubles en el sobrenadante (Farina *et al.* 2015; Merck, 2023d).

Para la extracción de proteínas se descongeló la placa de 4 pozos que contenía las células de la teca, y se comenzó a raspar cada pozo con el primer amortiguador. Una vez obtenidas las células con el primer amortiguador en tubos de 1.5 mL, la mezcla se mantuvo en hielo y se homogenizó durante 7 min mediante un homogeneizador Tissue Tearor homogenizer (Bioespec Products, INC., Bartlesville, OK, USA), en un tubo de cristal. Posteriormente, las muestras se sonicaron durante 5 min en un sonicador (Branson Ultrasonics, St. Louis, MO, USA), el extracto proteico se clarificó por centrifugación a 13,000 rpm durante 10 min a 0°C. Posteriormente se tomó 400 µL del sobrenadante y se vertió en un tubo limpio, estéril y etiquetado de 1.5 mL, y se desechó el pellet que se obtuvo. Al sobrenadante se le añadió 450 µL de la solución de Ácido Tricloroacético al 20% en Acetona (TCA) y 0.14% de Ditiotreitól (DTT), se realizó un homogenizado ligero y se esperó a la precipitación de proteínas, alrededor de 2 a 4 horas a -20°C. Una vez que se precipitó, se centrifugó a 13 000 rpm a 0°C por 15 min para obtener el pellet y comenzar con dos lavados de 500 µL de acetona al 100% y un tercero al 80%. Después de cada lavado, se introducía el pellet a centrifugación con las mismas condiciones a 13 000 rpm a 0°C por 5 min. Posterior al último lavado, se dejó secar el tubo por 5 minutos aproximadamente, por medio de decantación sobre una gasa, finalmente las proteínas precipitadas fueron solubilizadas en 50 µL del segundo amortiguador, y el pellet se dejó reposar 24 horas a 4°C.



**Figura 6.** *Pellet de proteínas, de Células de la Teca de Bovinos.*

El uso del homogeneizador es para triturar el tejido y someterlo a presiones altas con la finalidad de romper las células mecánicamente y exponer las proteínas, es una medida tosca pero eficaz, pues las membranas celulares se rompen por las fuerzas mecánicas líquidas, quedando en el amortiguador frío (Ramírez *et al.* 2021; Merck, 2023d). Y en el caso de la sonicación se aplica energía sonora (ultrasonido) mediante una sonda vibratoria sumergida en el líquido donde se encuentra la suspensión celular. Este tipo de energía mecánica agita las partículas en el líquido, generando la ruptura de las membranas celulares y la liberación del contenido celular al medio (Ramírez *et al.* 2021).

#### 6.2.4.2. Actividad de colaboración en la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Ensayo de proteína azul de Coomassie)

El ensayo de Bradford es un método colorimétrico para la determinación de la concentración de proteína, se basa en una reacción colorimétrica de proteínas con un tinte, Coomassie Azul Brillante G-250, que cambia de absorbancia bajo condiciones ácidas, induciendo un cambio espectral del color marrón (absorbancia máxima a 465 nm) al azul (absorbancia máxima a 610 nm), que se une a la proteína que se está ensayando (González *et al.* 2014). Las interacciones hidrófobas e iónicas con las proteínas de la muestra estabilizan la forma aniónica del tinte, provocando un cambio de color visible. Mediante la creación de una curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de proteínas como la Albúmina Sérica Bovina (BSA), es posible descubrir la concentración de proteína desconocida de una solución, basado en la absorbancia de la solución después de agregar el tinte, por lo tanto, el color azul desarrollado es proporcional al contenido de proteína y puede medirse espectrofotométricamente a 595 nm, la longitud de onda donde la diferencia de absorbancia entre las dos formas coloreadas del tinte es mayor (Bradford, 1976; González *et al.* 2014).

Se realizaron diluciones seriadas de la proteína Albúmina Sérica Bovina (BSA), que sirvieron para construir una curva estándar que fue de 0 a 15 mg/mL. Se empleó, en una solución con agua destilada de 800 a 785  $\mu$ L dependiendo la concentración y tanto a la curva como a las muestras se les adicionó 200  $\mu$ L de Bradford (BIO RAD), y se procedió a medir la absorbancia a 470 y 595 nm, con celdas de cuarzo de paredes negras.

## **8. Impacto de las actividades del Servicio Social en el proyecto**

En este servicio social se apoyó a la investigadora a realizar cultivos de CT estimuladas con dos marcas de LH, con el fin de realizarles diferentes técnicas bioquímicas, ya antes descritas, para perfeccionar la extracción y cuantificación de proteínas, siendo este uno de los objetivos de las investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de “Bioquímica de la Reproducción” del Departamento de Producción Agrícola y Animal en la UAM Xochimilco, por parte de los estudiantes de doctorado, ya que ellos buscan que los extractos proteicos obtenidos se empleen en investigaciones posteriores para analizarlos mediante un estudio de proteínas a gran escala como la proteómica y así identificar las vías de señalización que sigue S1P para mediar los efectos de LH en CT de bovino en cultivo.

## **9. Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del Servicio Social**

Todas las actividades que la suscrita realizó durante su servicio social, se articulan al plan y programa de la Licenciatura de Biología de la UAM- Xochimilco, de las Unidades de Enseñanza- Aprendizaje (UEA), “Energía y Consumo de Substancias Fundamentales”, con los temas de: aminoácidos y proteínas, lípidos, enzimas, utilización de los nutrimentos en los organismos, así como la UEA “Historias de Vida”, con los contenidos de definición de ciclos de vida, fases de ciclo de vida de los seres vivos, reproducción sexual, elementos reguladores bióticos y abióticos en los ciclos de vida, métodos de muestreo para el estudio de ciclos de vida en animales y plantas, conocimiento y comprensión de las técnicas de mejoramiento genéticos y estrategias de manejo de los ciclos de vida, estos conocimientos previos adquiridos durante mi formación profesional, los pude ver aterrizados con el entendimiento de los temas que se trabajan en el laboratorio, así pude incorporar a la práctica los aprendizajes obtenidos en las diversas asignaturas del Plan de Estudios, por lo que creo firmemente que el objetivo fundamental del servicio social consistente en aproximar al estudiante con el área laboral se ha cubierto de manera evidente.

Además, las labores que se llevaron a cabo en el Servicio Social se apegaron a las cinco dimensiones de la formación de los biólogos egresados de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, pues la formación teórica y epistemológica que se obtuvo durante la licenciatura permitió vislumbrar el impacto ecológico que tendría la aplicación de los conocimientos de laboratorio sobre los problemas que posee la industria ganadera, y la formación científica, profesional técnico-metodológica y crítico-social, me permiten diagnosticar, pronosticar, proyectar y proponer medidas de manejo que permitan al sector

ganadero satisfacer las necesidades de la población, con afectaciones moderadas o sin perjudicar al ecosistema de la zona donde se pretenda efectuar algunos pasos de las investigaciones.

Las habilidades obtenidas durante el servicio social fueron:

1. Buen funcionamiento de laboratorio.
2. Esterilización de material.
3. Preparación de soluciones.
4. Buen pipeteo con diferentes volúmenes.
5. Obtención de muestras biológicas de rastro (ovario).
6. Disección de ovarios de vaca para obtención de folículos.
7. Conteo y siembra de células de la teca.
8. Conocimientos en Técnicas bioquímicas (ELISA competitiva y MTT).
9. Conocimientos sobre la extracción y cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

#### ***10. Fundamento de las actividades del Servicio Social***

El apoyo generado con este servicio social contribuye en las actividades que se desarrollan de manera cotidiana en el laboratorio "Bioquímica de la Reproducción". Como se mencionó al inicio de este informe, la misión es construir y abonar conocimiento a la Biología Reproductiva de los animales de producción y nos hemos enfocado en moléculas y procesos biológicos involucrados en el funcionamiento de las células ováricas, células de la granulosa y teca.

Específicamente, a lo largo de estos seis meses de apoyo de servicio social, se lograron implementar, establecer y perfeccionar técnicas que realizamos día con día para estudiar los distintos procesos biológicos que permiten el funcionamiento de las células de la teca de bovino tales como la proliferación, sobrevivencia y esteroidogénesis.

En ese sentido, la labor como laboratorio ahora será continuar con las líneas de investigación establecidas sobre la fisiología reproductiva y continuar con la formación de recursos humanos a nivel licenciatura y posgrado.

## 11. Referencias

Acosta Torres, L., Arenas Arrocena, M.C., García Contreras, R. y Rodríguez Torres, M.P. (2018) Manual para la enseñanza práctica del ensayo MTT para evaluarla citotoxicidad de nanopartículas. *DGAPA-UNAM*, 1-23. <https://doi.org/03-2018-082312291200-01>.

Arbesú García, M. I. y Berruecos Villalobos, L. (1996) El Sistema Modular en la Universidad Autónoma Metropolitana. *Universidad Autónoma Metropolitana*. 1-17.

Arteaga García, Y., Hernández Coronado, C.G., Guzmán Sánchez, A. y Rosales Torres, A.M. (2021) Manual de extracción, cuantificación e identificación de proteínas. *Programa Editorial División de Ciencias Biológicas y de la Salud*. <https://publicaciones.xoc.uam.mx/Recurso.php>

Bauer, N.C., Doetsch, P.W. y Corbett, A.H. (2015) Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic*, 16, 1039-1061. <https://doi.org/10.1111/tra.12310>

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. y Stryer, L. (2002) *Biochemistry*. Chapter 3, protein structure and function. New York: W H Freeman.

Bolaños M. (2017) *Estandarización de un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de células primarias de fibroblastos de piel de neonato de rata in vitro*. [Tesis de maestría, Universidad ICESI].

Bradford, M.M. (1976) Rápido y sensible para la cuantificación de microgramos de proteína utilizando el principio de unión proteína-colorante. *Bioquímica analítica*, 72, 248-254.

Buttery LDK, Bishop AE. (2005) Introduction to tissue engineering. *L. L. Hench & J. R. Jones (Eds.), Biomater Artif Organs Tissue Eng.* 193-200. <https://doi.org/10.1533/9781845690861.4.193>.

Castro de Pardo, C. (2006) Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba MTT, *IUPAC Medicinal Chemistry*, 1-11. Recuperado de: [https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-IV-2.pdf](https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf).

Cervera Cobos, N. P., Huesca Guillén, G.D., Luna Martínez, L.M., Martínez Aroche, L.T., Portilla González, A., Rodríguez Arteaga, J.G., y Solís Lugo, A. (2019) *Ciencias Naturales*. Capítulo 2, ¿Cómo somos los seres vivos?. Ciudad de México: *Secretaría de Educación Pública*. Pp. 43- 53.

Cisneros Huamaní, C. E. (2019). *Evaluación de dos métodos enzimáticos para aislamiento de células primarias de placenta de alpaca (Vicugna pacos)* [Tesis de

Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].  
<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/16802>

Chedid, S. y Padilla, F. (2008) Pacientes jóvenes normogonadotropas; agonistas de la GnRH. En J., Bellever Pradas y A., Requena Miranda. *Manual Práctico sobre el uso de la Hormona Luteinizante en Reproducción Asistida* (pp. 7-12). Editorial Médica Panamericana.  
[https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=-QUV7GYX7cC&oi=fnd&pg=PA7&dq=hormona+luteinizante&ots=LxmLEs5ikL&sig=UxG93RhNKfZQovXJa9HNTRm6Msg&redir\\_esc=#v=onepage&q=hormona%20luteinizante&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=-QUV7GYX7cC&oi=fnd&pg=PA7&dq=hormona+luteinizante&ots=LxmLEs5ikL&sig=UxG93RhNKfZQovXJa9HNTRm6Msg&redir_esc=#v=onepage&q=hormona%20luteinizante&f=false)

Descriptores en Ciencias de la Salud (2018) Células Tecaes. *DeCS/MeSH*, Recuperado de <https://decs.bvsalud.org/es/ths/resource/?id=14177#Details>

Equipos y Laboratorio de Colombia. (2011) Técnica Elisa Generalidades, *Equipos y Laboratorio de Colombia*. Recuperado de: [https://www.equposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/tecnica-elisa-generalidades#:~:text=La%20t%C3%A9cnica%20ELISA%20\(%22Enzyme%2D,un%20colorante%2C%20puede%20ser%20medido.](https://www.equposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/tecnica-elisa-generalidades#:~:text=La%20t%C3%A9cnica%20ELISA%20(%22Enzyme%2D,un%20colorante%2C%20puede%20ser%20medido.)

Farina, H. G., Gabri, M., Ripoll, G., Rodríguez, V., y Romanowski, A. (2015) TP2: Extracción y cuantificación de proteínas. *Introducción a la Biología Celular y Molecular*. Recuperado de: [http://cronos.unq.edu.ar/ibcm/guiastp/2008/manana/tp2\\_tm.pdf](http://cronos.unq.edu.ar/ibcm/guiastp/2008/manana/tp2_tm.pdf).

Gan, X., Wang, Y., Gao, S., Chen, X., Hu, S., Wang, J., Hu, J., Li, L. y Han, C. (2020) Co-culture model reveals the characteristics of theca cells and the effect of granulosa cells on theca cells at different stages of follicular development. *Reproduction in Domestic Animals*, 56, 58-73. <https://doi.org/10.1111/rda.13849>

Gasque Gómez, R. (2016) Reproducción Bovina. *BM Editores*, 150, 1-10. Recuperado de: [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/245-Reproduccion\\_bovina.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/245-Reproduccion_bovina.pdf)

Geethani, B., Munoz Cano, R., Desai, A., Tobio, A., Metcalfe, D.D., y Olivera, A. (2017) Sphingosine Kinase 1 Inhibitor SK178 Preferentially Hinders Growth of KIT D816V Mast Cells In Vitro and In Vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139 (2), <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.552>

Gil, M. (2019) Buffer de fosfatos (PBS): fundamento, preparación y usos. *Lifeder*. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/buffer-fosfatos/>.

González de la Rosa, C.H., López Camacho, P.Y., Pérez Hernández. G., Vázquez Contreras, E. (2014) *Manual de prácticas de laboratorio de Bioquímica*. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana. 29-34. [http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/01MANUAL\\_PRACTICAS\\_LAB\\_BQ\\_IS\\_BN.pdf](http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/01MANUAL_PRACTICAS_LAB_BQ_IS_BN.pdf)

Guzmán Sánchez, A., Rosales Torres, A.M. y Hernández Coronado, C.G. (2017) *Hormonas que regulan la reproducción: Mecanismo de Acción*. Editorial Académica Española.

Herráez, A. (s.f.) Ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT. *Biomodel*. Recuperado de: <https://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm>.

Hernández Cerón, J. (2016) *Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros*. Ciudad de México: Universidad Autónoma de México.

Hernández Coronado, C.G. (2016) *Moduladores de la producción de S1P y efectos de este esfingolípido sobre la proliferación y sobrevivencia de células de la granulosa de bovino* [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana]. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/1868/1/190701.pdf>.

Hernández Coronado, C.G., Guzmán, A., Espinosa Cervantes, R., Romano, M.C., Verde Calvo, J.R. y Rosales Torres, A.M. (2015) Sphingosine-1-phosphate and ceramide are associated with health and atresia of bovine ovarian antral follicles. *Animal*, 9 (2), 308-312.

Hernández Coronado, C.G., Guzmán, A., Rodríguez, A., Mondragón, J.A., Romano, M.C., Gutiérrez, C.G. y Rosales Torres, A.M. (2016) Sphingosine-1-phosphate, regulate by FSH and VEGF, stimulates granulosa cell proliferation. *General and Comparative Endocrinology*, 236 (2016), 1-8.

Hernández Coronado, C.G., Guzmán, A., Castillo Juárez, H., Zamora Gutiérrez, D., y Rosales Torres, A.M. (2019) Sphingosine-1-phosphate (S1P) in ovarian physiology and disease. *Annales d'Endocrinologie*, 80 (2019), 263-272.

Ibero (s.f.) 5. Reacciones de neutralización. Recuperado de: <https://ibero.mx/campus/publicaciones/quimanal/pdf/5reaccionesneutralizacion.pdf>.

Liu, T., Qin, Q.Y., Qu, J.X., Wang, H.Y. y Yan, J. (2020) Where are the theca cells from: the mechanism of theca cells derivation and differentiation. *Chinese Medical Journal*, 133 (14), 1711-1718. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000850>

López Barrera, J., Quijano Gómez, P., Suárez Londoño, L. y Roa Molina, N. S. (2007) Comparación de técnicas de disgregación mecánica, enzimática y mecano-enzimática en la extracción de poblaciones linfocitarias y macrófagos en tejidos con periodontitis crónica avanzada. *Universitas Odontológica*, 26 (58), 26-33. ISSN 0120-4319.

Maturin, J.B. (2021) Células de la Teca. *Aleph*. Recuperado de: <https://aleph.org.mx/que-funcion-cumple-la-teca-interna>.

Mediavilla, M. G. (2018) Cultivos Primarios: Concepto y Tipos. Etapas en el establecimiento de un cultivo primario. *Library*. Recuperado de: <https://1library.co/document/zko2vo4y-cultivo-primario-concepto-tipos-etapas-establecimiento-cultivo-primario.html>.

Medina Moctezuma, Z. B. (2021) *La esfingosina 1-fosfato (S1P) como mediador de los efectos biológicos de la hormona luteinizante (LH) en células de la teca de bovino* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=23502&docs=UAMII23502.pdf> .

Megías, M., Molist, P, y Pombal, M.A. (2023) Órganos Animales: Sistema Reproductor. *Atlas de Histología Vegetal y Animal*. Recuperado de: [https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/quida\\_o\\_a\\_07reproductor.php](https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/quida_o_a_07reproductor.php).

Merck (2023a) Disociación de los tejidos, *Merck*. Recuperado de: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/products/protein-biology/proteins-and-enzymes/tissue-dissociation?country=MX&language=es&cmsRoute=products&cmsRoute=protein-biology&cmsRoute=proteins-and-enzymes&cmsRoute=tissue-dissociation&page=2>.

Merck (2023b) Nucleasas (ADNasas y ARNasas), *Merck*. Recuperado de: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/products/protein-biology/proteins-and-enzymes/nucleases>.

Merck (2023c) Protocolo del análisis de la viabilidad y la proliferación celulares con MTT, *Merck*. Recuperado de: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>.

Merck (2023d) Lisis y extracción de proteínas. *Merck*. Recuperado de: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/applications/protein-biology/lysis-and-protein-extraction>.

Nebel, R., y DeJarnette, M. (2011). Anatomía y fisiología de la reproducción bovina. *SELECT SIRE INC*, 6.

Novachem del Ecuador (s.f.) Solución buffer (Lisis células sangre roja). *Novachem del Ecuador*. Recuperado de: [https://www.novachem.com.ec/producto/solucion-buffer-lysis-celulas-sangre-roja/#:~:text=Descripci%C3%B3n&text=Utilizado%20para%20el%20aislamiento%20de%20gl%C3%B3bulos%20rojos\)%20para%20otras%20aplicaciones](https://www.novachem.com.ec/producto/solucion-buffer-lysis-celulas-sangre-roja/#:~:text=Descripci%C3%B3n&text=Utilizado%20para%20el%20aislamiento%20de%20gl%C3%B3bulos%20rojos)%20para%20otras%20aplicaciones).

Pors, S.E., Harðardóttir, L., Ørnes Olesen, H., Lundgaard Riis, M., Bejstrup Jensen, L., Sten Andersen, A., Cadenas J, Grønning A.P., Berdiin Colmorn L., Dueholm, M., Yding Andersen, C. y Gry Kristensen, S. (2020) Effect of sphingosine-1-phosphate on activation of dormant follicles in murine and human ovarian tissue. *Molecular Human Reproduction*, 26 (5), 301-311.

Ramírez Carreto, S., Miranda Zaragoza, B. y Rodríguez-Almazán, C. (2021). Purificación de proteínas. *Mensaje Bioquímico*, 45, 35-47.

Rosales Torres, A. M., Guzmán Sánchez, A. y Gutiérrez Aguilar, C. (2011). Follicular development in domestic ruminants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(1), 147-160.

Ruíz Anguas, J., Carballo Mondragón, E., Anta Jaen, E., Díaz Calvillo, J. y Kably Ambre, A. (2005) Utilidad de las concentraciones de la hormona luteinizante para determinar la calidad ovocitaria. *Ginecología y Obstetricia de México*, 73 (1), 28-35.

Strober, W. (2001). *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Current protocols in immunology, 21(1), A-3B.

Tatsuma, Y. y Yuta, A. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*. 16(2). 99-117.

Túnez Fiñana, I., Galván Cejudo, A., y Fernández Reyes, E. (2001). pH y amortiguadores: Tampones fisiológicos. *Amortiguadoras*, 3, 1-11. Recuperado de: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/06%20pH%20AMORTIGUADORES.pdf>.

Villarreal, R., García, J.C. y Ferreira, J.R. (1974) Documento Xochimilco. *Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco*. 1-25.

Whitford, W. (2005) Supplementation of animal cell culture media. *BioProcess Int*. 3 (6). 28-36.