

2019

Evaluación comparativa del crecimiento de la línea celular BHK 21 en un medio suplementado con suero bovino adulto y otro medio libre de suero

Kevin Andrés Rivera Rivera
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>

 Part of the [Biology Commons](#)

Citación recomendada

Rivera Rivera, K. A. (2019). Evaluación comparativa del crecimiento de la línea celular BHK 21 en un medio suplementado con suero bovino adulto y otro medio libre de suero. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/54>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

**EVALUACIÓN COMPARATIVA DEL CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR
BHK 21 EN UN MEDIO SUPLEMENTADO CON SUERO BOVINO ADULTO Y OTRO
MEDIO LIBRE DE SUERO**

KEVIN ANDRES RIVERA RIVERA

Universidad de La Salle

Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología

Bogotá, Colombia

2019

**EVALUACIÓN COMPARATIVA DEL CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR
BHK 21 EN UN MEDIO SUPLEMENTADO CON SUERO BOVINO ADULTO Y OTRO
MEDIO LIBRE DE SUERO**

Trabajo de investigación presentado para optar al título de:

BIÓLOGO

Director:

JAIRO JOSE OVIEDO HERNANDEZ, M.V. PhD.,

Codirectora:

YENNY YOLANDA LOZANO JIMÉNEZ, Química y Bacterióloga. PhD.,

Modalidad de grado:

Pasantía

Grupo de Investigación:

Limor de Colombia S.A.

Universidad de La Salle

Facultad de Ciencias, Programa de Biología

Bogotá, Colombia

2019

Agradecimientos

A la Universidad de La Salle y el Programa de Biología por proporcionarme las herramientas y recursos de aprendizaje necesarios para formarme como profesional y como persona.

A Limor de Colombia S.A por permitir mi ingreso para desarrollar esta pasantía y proporcionarme sus instalaciones para desarrollar el trabajo de grado.

Al doctor Jairo José Oviedo por su gran colaboración como tutor de este trabajo y su acompañamiento durante el tiempo que tomo realizarlo.

A la profesora Yenny Yolanda Lozano por su apoyo, tutoría y recomendaciones en calidad de cotutora de este trabajo.

A David Siabatto por su acompañamiento y capacitación en el manejo de equipos y metodologías durante la parte práctica de esta pasantía.

Un agradecimiento especial a mis padres que son la inspiración y el ejemplo que me motiva a seguir adelante, sin sus esfuerzos y sacrificios nada de esto hubiera sido posible

Resumen

Los principales medios de cultivo por los que se da el crecimiento de diferentes líneas celulares se basan en proteínas y nutrientes, entre las más usadas son la L-glutamina y la triptosa y principalmente algunos sueros en cantidades moderadas, sin embargo se ha demostrado que el uso de estos sueros tiene una serie de desventajas en la calidad del cultivo, por lo que se ha desarrollado un nuevo medio llamado RDMP 68, que se caracteriza por no depender del uso de sueros para la manutención celular; dada la problemática, se desea obtener la línea celular BHK21 adaptada al medio de cultivo RDMP 68 a partir de comparar el crecimiento de la línea celular en este medio con un medio de cultivo a base de suero bovino (Eagle MEM), y evaluar la eficiencia de estos medios para demostrar que los cultivos sin suero pueden proveer los mismos o mejores resultados, se inició con un proceso de adaptación de BHK 21 al medio RDMP 68, posteriormente una comparación de crecimiento de la línea celular en los dos medios. Se obtuvo una línea celular adaptada al medio RDMP 68 con una concentración por encima de $0,3 \times 10^6$ cel/ml, los resultados obtenidos en cuanto a crecimiento indicaron que el medio suplementado con suero bovino y el medio libre de suero no presentan diferencias significativas, además el medio libre de suero está provisto de una mejor estabilidad al estar químicamente definido, por lo que extiende el panorama investigativo para posibles mejoras.

Palabras clave: Crecimiento, BHK 21, adaptación, comparación

Abstract

The main culture media for which the growth of different cell lines occurs are based on proteins and solvents, among the most used are L-glutamine and tryptose and mainly some sera in moderate amounts, however it has been shown that the use of these sera has a series of disadvantages in the quality of the culture, which is why a new medium called RDMP 68 has been developed, which is characterized by not depending on the use of sera for cellular maintenance; given the problems, it is desired to obtain the BHK21 cell line adapted to the RDMP 68 culture medium by comparing the growth of the cell line in this medium with a culture medium based on bovine serum (Eagle MEM), and to evaluate the efficiency of these means to demonstrate that cultures without serum can provide the same or better results, began with a process of adaptation of BHK 21 to RDMP 68 medium, later a comparison of growth of the cell line in the two media. A cell line adapted to the RDMP 68 medium with a concentration above 0.3×10^6 cells / ml was obtained, the results obtained in terms of growth indicated that the medium supplemented with bovine serum and the serum-free medium do not present significant differences, In addition, the serum-free medium is provided with better stability and free handling since it is chemically defined, thus extending the research landscape for possible improvements

Key words: Growth, BHK 21, adaptation, comparison

Contenido

Resumen.....	4
Abstract	5
1. Introducción	8
2. Objetivos	11
2.1 General.....	11
2.2 Específicos.....	11
3. Metodología	12
3.1 Preparación del medio Eagle MEM y adaptación celular.....	12
3.2 Preparación del medio RDMP 68 y adaptación celular.....	12
3.2.1 Preparación.	12
3.2.2 Adaptación.....	12
3.3 Esterilidad.....	13
3.4 Crecimiento.	13
3.5 Análisis de datos.....	13
4. Resultados y Discusión	14
4.1 Adaptación celular al medio RDMP 68.....	14
4.1.2 pH.....	15
4.2 Crecimiento celular en EAGLE MEM y RDMP 68.....	17
5. Conclusiones	20
6. Referencias bibliográficas	21

Lista de figuras

Figura 1. Adaptación de la línea celular BHK 21 al medio RDMP 68	14
Figura 2. pH de la adaptación de la línea celular BHK 21 al medio RDMP 68.	16
Figura 3. Comparación del crecimiento celular de la línea BHK 21 cultivada en los medios Eagle MEM y RDMP 68.	18

1. Introducción

Los principales medios de cultivo por los que se da el crecimiento de diferentes líneas celulares se componen de proteínas y nutrientes, entre las más usadas son la L-glutamina, la triptosa y principalmente algunos sueros en cantidades moderadas, los más usados son sueros provenientes de los bovinos, en especial de los fetos o ejemplares adultos (Escobar *et al*, 2011), estos sueros poseen una mezcla de glucosa, proteínas, vitaminas, oligoelementos, hormonas y factores de crecimiento (van der Valk *et al*, 2010), siendo estos factores fundamentales para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo de las líneas celulares (Lee *et al*, 2003), por lo que es considerado como uno de los suplementos tradicionales en los medios de cultivo.

Una de las líneas celulares más ampliamente usada en cultivo celular son las BHK 21 (*Baby Hamster Kidney*) extraídas de los fibroblastos de los riñones de la cría de hámster, en promedio de una semana a un mes de su nacimiento, éstas se caracterizan por ser fácilmente cultivables tanto en suspensión como en adherencia, su alta tasa de división pasa ilimitados y alta eficiencia de plaqueo (Lee *et al*, 2011), además los numerosos usos que posee, entre los que se destacan la transfección génica, producción de antibióticos de resistencia a diversas enfermedades como la poliomielitis y la rabia, y como medio contenedor de agentes retrovirales, entre otros (Pardo *et al*, 2000)

Las BHK-21 son excelentes sustratos para la producción de varios virus como el *adenovirus*, *vaccinia virus*, *simplexvirus*, *Vesicular stomatitis Indiana virus* y *rabies virus* (Pardo *et al*, 1999), y han sido objeto de innumerables proyectos de investigación, especialmente en el tema de la transfección, inhibición e inducción génica viral y retroviral debido a su alta capacidad de alojamiento de estos agentes biológicos (Hernandez & Brown, 2010), con el empleo de esta línea se han producido millones de dosis de vacunas contra la fiebre aftosa desde cultivos en suspensión y de vacuna antirrábica para uso veterinario (Reculard, 1996); sin embargo, son pocos los estudios de adaptación de BHK 21 a diferentes medios de cultivo dadas las limitantes comerciales entre compañías, uno de los pocos estudios publicados fue presentado por el grupo de Leiva *et al* 2011 donde compararon el crecimiento celular de BHK 21 con un medio a base de suero fetal bovino y otro con suero de ternero, donde concluyeron que el suero fetal bovino es más eficaz para el crecimiento celular; por otro lado, Kallel *et al*, 2002, evaluaron la capacidad de varios medios

libres de suero y medios libres de proteína animal para permitir el crecimiento de la línea celular BHK 21 y así producir vacunas contra la rabia, obteniendo mejores resultados para los primeros; Hernandez & Brown, 2010 en su estudio, realizaron un ensayo del cultivo y mantenimiento de las líneas celulares en diferentes medios, con un retrovirus hospedado y evaluaron la efectividad de cada medio en donde los medios suplementados con suero tuvieron los mejores resultados; Moreira *et al*, 1995 realizaron una comparación entre varios medios de cultivo y determinaron la viabilidad de cada uno en cuanto al crecimiento de varias líneas celulares incluyendo BHK 21 donde se determinó que el medio suplementado con suero fetal bovino era el más viable para las células; sin embargo, se ha demostrado que el uso de sueros de origen animal tiende a provocar alteraciones y ser propensos a contaminar cultivos celulares, se han descrito casos de suero bovino contaminado con virus de la diarrea viral bovina (VDVB) (Mucci *et al*, 2006), causando alteraciones mitocondriales (Dorland *et al*, 1994), excesiva producción de lactato y presencia de células oscuras y granuladas (Bavister *et al*, 1992), inducción de apoptosis celular (Byrne *et al*, 1999), reducción en la síntesis proteica (Kuran *et al*, 2001) y disminución de las células trofoblásticas (Fouladi-Nashta *et al*, 2005), lo cual supone un riesgo enorme para la fabricación de productos biológicos de uso veterinario y humano (Iturriaga, 2003); asimismo, otros estudios han demostrado que la ausencia de suero en el medio no altera de manera significativa el cultivo de células BHK 21 (Leiva *et al*, 2011) (Mucci *et al*, 2006); por otro lado, el uso de estos sueros supone un costo económico adicional a la producción del medio; encareciendo el producto biotecnológico obtenido de las células; a partir de lo anterior, recientemente se ha desarrollado un nuevo medio de cultivo de nombre RDMP 68, que se caracteriza por no depender del uso de sueros para la manutención celular, lo cual es importante en cuanto a ventajas biológicas y económicas; dada la importancia en áreas de investigación y producción biotecnológica de la línea celular BHK 21 surge la pregunta ¿Es posible que la línea celular BHK 21 pueda adaptarse a este medio libre de suero?; los estudios citados anteriormente y muchos otros más son fundamentales en cuanto a la información de referencia que se debe tener en cuenta para aplicar la prueba de esta investigación, principalmente para comparar los resultados obtenidos con los reportados y así llegar a una conclusión sobre el comportamiento celular en las condiciones de este estudio.

La empresa Limor de Colombia S.A dedicada a la producción y comercialización de vacunas que involucran el cultivo, crecimiento y mantenimiento de líneas celulares, cada vez emplea medios de cultivos más eficaces, el nuevo medio desarrollado (RDMP 68) no tiene como

suplemento los sueros por lo que supone una ventaja tanto biológica como económica de tal forma que un medio libre de suero podría ser una alternativa excelente para desarrollar el crecimiento de la línea celular BHK 21, poniendo en funcionamiento un medio de cultivo alternativo y más avanzado, que puede generar los mismos o mejores resultados.

2. Objetivos

2.1 General

- Evaluar el crecimiento de la línea celular BHK 21 en un medio de cultivo a base de suero y un medio libre de suero (RDMP 68).

2.2 Específicos

- Adaptar la línea celular BHK21 al medio de cultivo RDMP 68 libre de suero.
- Comparar el crecimiento de la línea celular BHK 21 en un medio de cultivo a base de suero y un medio libre de suero

3. Metodología

3.1 Preparación del medio Eagle MEM y adaptación celular

Se inició por cultivar la línea celular BHK 21 en el medio Glasgow Minimal Esencial Medium (GMEM) con glutamina y aminoácidos al 90%, con caldo triptosa fosfato (CTF) al 10%, L-glutamina al 1%, bicarbonato de sodio al 1% y suero bovino adulto (SBA) al 10%, este es el medio tradicional de cultivo usado en Limor de Colombia S.A por lo que no fue necesario hacer adaptación celular. Este cultivo se mantuvo durante todo el proyecto dado que los resultados experimentales se compararon con las células que crecieron en medio libre de suero.

3.2 Preparación del medio RDMP 68 y adaptación celular

3.2.1 Preparación.

Para realizar la adaptación de las células al medio libre de suero (RDMP 68), se comenzó con la preparación del medio, para ello se empleó un frasco de cultivo de 2 litros al cual se le agregaron 1800 ml de agua osmosis, 35 g del medio en polvo RDMP 68, 20 ml de Poloxamer 188 al 10%, 2,2 g de bicarbonato de sodio y 12 ml de HEPES, se procedió a medir el potencial de hidrogeno (pH), posteriormente se adiciono 40 ml de L-glutamina, se completó con agua osmosis el resto de volumen del frasco para llegar al volumen de 2 litros, se solubilizo con agitación durante 30 minutos y se filtró bajo cabina de seguridad biológica por medio de un filtro de laboratorio estéril de 0,22 μm ; en otro frasco también estéril del mismo volumen, esta preparación se realizó varias veces durante el proyecto debido al crecimiento celular exponencial y un límite marcado por los volúmenes de los recipientes de cultivo usados.

3.2.2 Adaptación.

Para adaptar las células al medio sin suero se comenzó por cultivarlas en suspensión en un frasco con el medio RDMP 68 con suero bovino adulto al 10% durante 24 horas, cuando el recuento celular superó los $0,5 \times 10^6$ cel/ml y alcanzó una viabilidad mayor o igual al 90%, se aumentó el volumen de medio de cultivo al doble del volumen inicial cada 24 horas con una concentración de suero reducida en dos unidades cada tres días hasta llegar al 0% de suero completando 16 días, luego de tener un cultivo celular optimo, se separaron las células del medio

mediante un proceso de centrifugación y se agregó medio de cultivo RDMP 68 libre de suero para así obtener las células BHK 21 adaptadas a un medio sin suero y continuar con su crecimiento hasta completar 32 días (GE Healthcare, 2016). Para la determinación de la concentración las células de todos los cultivos fueron contados con la ayuda de un hemocitómetro o cámara de Neubauer mediante el método de exclusión de azul tripán, y para la determinación del pH se utilizó el potenciómetro (Martínez et al 1989)

3.3 Esterilidad.

Se midió la esterilidad tomando muestras de 1 ml de la suspensión celular con pipetas estériles desechables para inocular en los medios de cultivo caldo tripticasa de soya, agar sangre y agar BHI incubándose durante 24 horas en una citocámara a 37°C, de tal manera que la ausencia de colonias bacterianas, de hongos y/o levaduras pueda indicar que el cultivo se encuentra en condiciones de esterilidad, también se extrajeron de cada cultivo 0,5 ml que fueron sometidos a la metodología de tinción de Gram (USP. 2008).

3.4 Crecimiento.

Para la comparación del crecimiento celular entre el medio GMEM (suplementado con 10% SBA) y el medio RDMP 68 (libre de suero), se tomaron $0,6 \times 10^6$ cel/ml provenientes de cada medio y fueron inoculadas en un frasco de cultivo estéril de 50 ml, para posteriormente agregarle a cada frasco una porción de 50 ml de medio, manteniendo las condiciones iniciales, hasta llegar al doble del volumen inicial del cultivo (100ml), cada 24 horas, durante 54 días. Para la determinación de la concentración; las células de todos los cultivos fueron contadas con la ayuda de un hemocitómetro o cámara de Neubauer mediante el método de exclusión de azul tripán (Martínez et al 1989).

3.5 Análisis de datos.

Por último, para realizar el procesamiento de datos para la adaptación se tomaron como variables relevantes el recuento celular y el número de días, así como también el pH que fueron analizados mediante una prueba de regresión lineal múltiple, para el crecimiento se tomaron variables como la concentración celular y pH, de donde se construyó una matriz que posteriormente fue analizada mediante un análisis de varianza.

4. Resultados y Discusión

4.1 Adaptación celular al medio RDMP 68.

A partir de la modificación del sistema de crecimiento, los resultados obtenidos permitieron la adaptación de la línea celular BHK21 al crecimiento en el medio de cultivo RDMP 68, se observó que desde la primera vez que se agregó el medio RDMP 68 con 0% de suero la línea celular mantuvo un crecimiento por encima de $0,3 \times 10^6$ cel/ml.

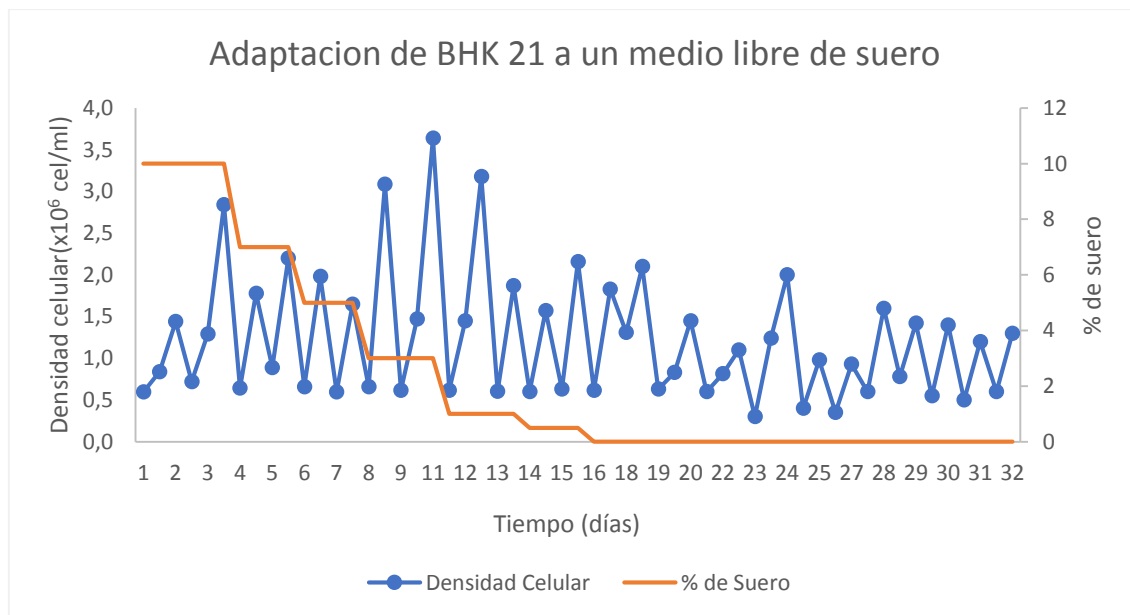


Figura 1: Adaptación de la línea celular BHK 21 al medio RDMP 68 libre de suero. Relación significativa con la densidad celular (Tiempo, T Test < 0,05) (%de suero, T-Test < 0,05)

La figura 1 muestra que la línea celular BHK 21 se adaptó al crecimiento libre de suero alcanzando concentraciones de hasta $2,1 \times 10^6$ cel/ml en el día 24, sin presencia de contaminantes según la prueba de esterilidad aplicada, concordando con el resultado reportado por Moreira *et al* 1995 y Hernandez & Brown, 2010, estos autores plantearon que la proliferación de las células en suspensión de la línea BHK 21 libre de suero ocurre a un valor medio de $1,2 \times 10^6$ cel/ml, este buen resultado de adaptación puede explicarse ya que los medios libres de suero han sido diseñados de

forma estandarizada para el cultivo de una línea celular determinada e incluyen cantidades ya predefinidas de factores de crecimiento purificados, aminoácidos, lipoproteínas, etc, los cuales cumplen una función homologa a los suplementos y proteínas provenientes del suero (Romijn, 1988); a estos medios se les conoce como medios de cultivo químicamente definidos ya que las sustancias que lo conforman son previamente conocidas (Kumar *et al* 1991), contienen gran variedad de ingredientes orgánicos e inorgánicos puros que se encuentran libres de agentes contaminantes y a la vez reducen la aparición de estos, constituyéndose también de aditivos proteicos puros, como factores de crecimiento (Mariani *et al* 1991). La producción de sus componentes está hecha mediante diversas técnicas de ingeniería genética en organismos como bacterias y levaduras a las que posteriormente se le pueden agregar colesterol, vitaminas, aminoácidos específicos y ácidos grasos, tratando de simular lo mejor posible las condiciones de los medios a base de suero (Stoll *et al* 1996); esta adaptación permite disminuir los riesgos de contaminación y daño celular al carecer de suero, teniendo un crecimiento celular aceptable, además, se obtiene un cultivo en suspensión más manejable al estar químicamente definido.

4.1.2 pH

El seguimiento del pH para la adaptación se realizó durante los mismos 32 días, con el objetivo de mantenerlo en el pH óptimo para el buen desarrollo y crecimiento celular que debe tener tendencia a un pH de 7, con un rango de aceptación entre 6,8 y 7,2. Los pH registrados para la adaptación antes del día 12 fueron de entre 6,5 hasta 7,4. La figura 2 representa gráficamente los valores obtenidos.

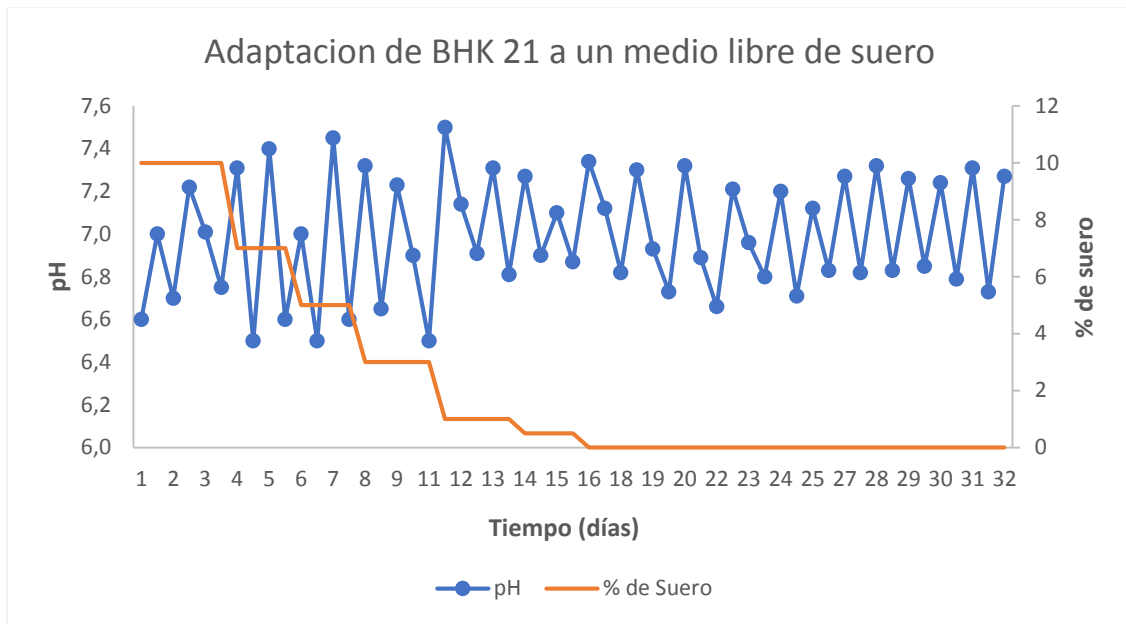


Figura 2: pH de la adaptación de la línea celular BHK 21 al medio RDMP 68 libre de suero.

Relación significativa con el pH (Tiempo, T Test < 0,05) (%de suero, T- Test < 0,05)

Los resultados obtenidos de las mediciones de pH presentados en la figura 2 muestran que antes del día 12 la adaptación con presencia de suero presento niveles de pH de entre 6,5 y 7,4, lo que no concuerda con Hernandez & Brown, 2010 quienes plantean que el pH de un medio de cultivo adecuado debe tener un rango de entre 6,8 y 7,2, esto se debe a que durante el tiempo del experimento en el medio GMEM se presentaron con frecuencia transiciones de niveles muy bajos a muy altos de pH que pueden ser explicados ya que el suero animal al poseer una gran cantidad de hormonas, proteínas, factores estimulantes e inhibidores del crecimiento, los cuales en sus determinadas funciones metabólicas, pueden tener efectos aleatorios o no deseados sobre las células en estudio, ya que utilizan los hidrogeniones disponibles en el medio interfiriendo en otros procesos metabólicos pudiendo provocar tanto acidosis como alcalosis a lo largo del tiempo, afectando la calidad celular y por ende comprometiendo negativamente el cultivo de las células y pH (Cortes & Ordoñez 2006, Freshney, 2000).

A partir del día 12 en adelante, los resultados obtenidos de las mediciones de pH presentaron un rango entre 6,6 y 7,2 por lo que presenta cierta estabilidad debido a que las células ya se

encuentran en un medio con porcentajes muy bajos de suero, ya después del día 16 el pH se sigue manteniendo en el mismo rango puesto que ya se encuentra en el medio totalmente libre de suero además de tener dos amortiguadores de pH que son el HEPES y el bicarbonato de sodio, estos medios al estar químicamente definidos y estandarizados para determinadas líneas celulares, pueden contener proteínas que podrían contribuir y proporcionar una mejor estabilidad al pH en cantidades moderadas y carecer de otras que puedan afectarlo negativamente (Hernandez & Juarez 2009), la ausencia de suero favorece el mantenimiento de estos valores ya que al no poseer la cantidad de nutrientes y proteínas exclusivas que aporta el suero, se logra un control de metabolismo y síntesis de proteínas y factores de crecimiento en el medio que lo que no permite, que se acidifique el cultivo (Kallel *et al*, 2002).

4.2 Crecimiento celular en EAGLE MEM y RDMP 68

Los seguimientos del crecimiento de las células de la línea BHK 21 en los medios GMEM y RDMP 68 se realizaron durante 54 días donde ambos medios partieron de una concentración de $0,6 \times 10^6$ cel/ml y llegando a tener hasta $3,2 \times 10^6$ cel/ml en GMEM en el día 4, mientras que en RDMP 68 logro alcanzar $2,4 \times 10^6$ cel/ml en el día 52, las pruebas de esterilidad no detectaron ningún agente contaminante. La figura 3 presenta una comparación de la tasa de crecimiento de los cultivos en suspensión.

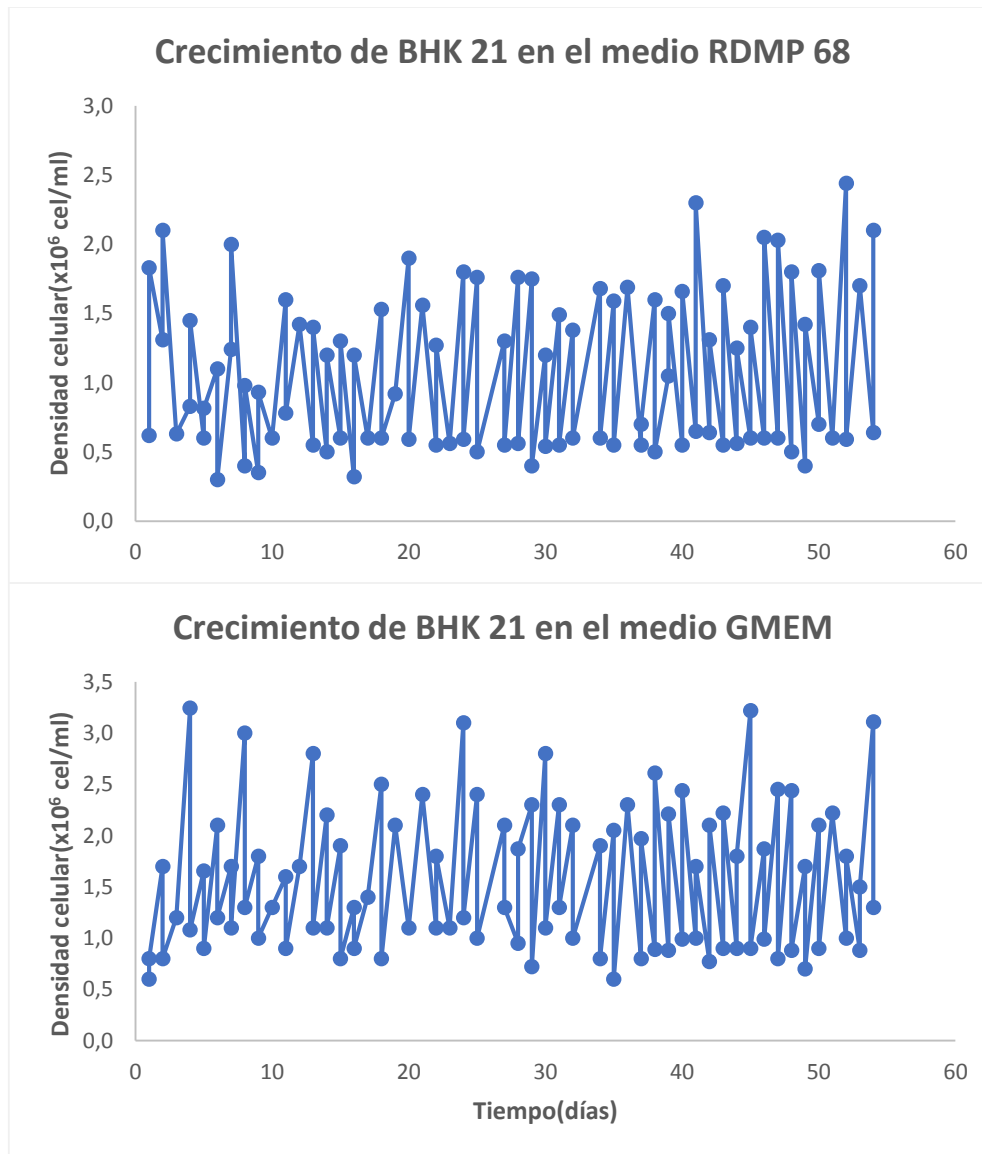


Figura 3: Comparación del crecimiento celular de la línea BHK 21 cultivada en los medios Eagle MEM y RDMP 68. No difieren entre si significativamente ($p > 0.05$)

Se pudo observar que el crecimiento celular en el medio de GMEM no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al crecimiento celular en RDMP 68 alcanzando niveles de $3,2 \times 10^6$ cel/ml, lo cual concuerda con Moreira *et al* 1995, que reportaban crecimientos por encima de 3×10^6 cel/ml, si se tiene en cuenta la importancia del suero, se infiere que es una buena fuente de nutrientes lábiles, hormonas involucradas en el aumento del crecimiento, funciones celulares especializadas, inhibidores de proteasas, y tiene la capacidad neutralizar algunas sustancias tóxicas (Lane & Miller 1976), aporta proteínas de unión como la albúmina, y la transferrina la cual se

encarga del transporte de otras moléculas a la célula, aumentando su capacidad y probabilidad de absorción de nutrientes suspendidos en el medio que influyen positivamente en su crecimiento (Hornsby *et al* 1983) así como también es fuente de proteínas, como la fibronectina, la cual promueve la adhesión celular al sustrato y algunos minerales, como Sodio, Potasio y Zinc, además aumenta la viscosidad del medio y, por ende, protege las células del daño mecánico que ocurre en la agitación de cultivos en suspensión (Kallel *et al*, 2002), lo cual explica los resultados de crecimiento obtenidos y ; además soporta para que sea uno de los componentes más importantes en los medios tradicionales de cultivo.

Por otro lado se pudo observar que el crecimiento celular en RDMP 68 partió desde $0,6 \times 10^6$ cel/ml alcanzando niveles de crecimiento de $2,4 \times 10^6$ cel/ml, sin diferencias significativas con lo reportado en GMEM, lo cual concuerda con los resultados reportados por Moreira *et al* 1995, quienes emplearon medios libres de suero, obteniendo valores de crecimiento celular similares, pero con descarte de algunos cultivos por bajo crecimiento; los medios libres de suero por lo general están suplementados con oligoelementos como el Zinc, Selenio y Cobre y el ácido tricarbóxico que son elementos químicos que se necesitan en pequeñas cantidades para el correcto crecimiento celular. Estos micronutrientes tienen relevancia en distintos procesos biológicos, por ejemplo, el mantenimiento de la funcionalidad de enzimas, así como también , aminoácidos, lipoproteínas, y otras proteínas, las cuales cumplen una función homologa a los suplementos y proteínas provenientes del suero (Sandstrom *et al* 1994), sin embargo el medio RDMP 68 carece de una innumerable cantidad de nutrientes y proteínas como la albumina y la transferrina que si poseen los medios con suero bovino adulto (SBA) esto podría llevar a que RDMP 68 tenga un crecimiento menos abundante (Escobar *et al* 2011). Sin embargo, en cuestiones de crecimiento el medio libre de suero RDMP 68 proporciona resultados similares a GMEM, y a pesar de que carece de algunas vitaminas y proteínas; el empleo de medios libres de suero en el estudio de las células, facilita en relevancia la comprensión de una variada cantidad de funciones biológicas, en parte gracias a que la mayoría de estos están químicamente definidos y tienen la ventaja de que sus componentes puedan ser cambiados (Hernandez & Juarez 2009).

5. Conclusiones

- A partir de este estudio se obtuvo una línea celular adaptada a un medio de cultivo libre de suero que cumple con una buena parte de requisitos para presentar un crecimiento adecuado, además de ser más estables, sin embargo el medio RDMP 68 y otros libres de suero requieren aun de una serie de mejoras y adición de suplementos en sus componentes para poder igualar y posteriormente superar el crecimiento y producción de líneas celulares en los medios tradicionales; teniendo en cuenta lo anterior, es claro que el futuro de los medios libres de suero para el cultivo de células de producción de vacunas está en el mejoramiento continuo de los mismos, mediante la fabricación y uso de nuevas sustancias que optimicen las condiciones de proliferación y diferenciación celular.
- Los resultados obtenidos de este estudio indican que el medio es apto para posteriores investigaciones donde pueda ser mejorado a partir del estudio de sustancias que puedan ser integradas a su composición e imite las características del medio a base de suero, ya que tiene la ventaja de poder ser diseñado para líneas celulares específicas y proveer estabilidad al cultivo.

6. Referencias bibliográficas

- Bavister B, TA Rose-Hellekant, T Pinyopummintr. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37,127-146.
- Byrne AT, J Southgate, DR Brison, HJ Leese. 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryos using TUNEL. *J Reprod Fertil* 117,97-105.
- Cortes VD, Ordoñez O. 2006. Evaluación del pH y la agitación del medio más adecuada para el crecimiento de *Dunaliella salina* en condiciones de laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana
- Dorland M, DK Gardner, AO Trounson. 1994. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fert* 13,70.
- Escobar M, Linamaría, Morantes, Sandra, Cordero, Claudia P., & Aristizábal, Fabio A.. 2011. Implementación de estrategias *in vitro* para evaluar la funcionalidad de un suero fetal bovino colombiano. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 40(2), 201-221. Retrieved November 08, 2016.
- Fouladi-Nashta AA, R Alberio, M Kafi, B Nicholas, KHS Campbell, R Webb. 2005. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reproductive Biomedicine Online* 10, 497-502.
- Freshney R. Ian. 2000. Culture of animal cells a manual of basic technique; 4a Ed. New York Wiley-Liss.. 1-6, 105-120.
- GE Healthcare, 2016. Medios HyClone para cultivo de células en suspensión y producción de virus. *General electric company*. 2016.
- Hernandez, R., & Brown, D. T. 2010. Growth and maintenance of baby hamster kidney (BHK) cells. *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 4, Appendix 4H.

- Hernandez E, Juarez E. 2009. Evolution of culture medium in the study of neural stem cells. Laboratorio de Cultivo Celular, Departamento de Biomedicina. Instituto de Ciencias de la Salud.17-21
- Hornsby P, Sturek M, Harris S, Simonian M. 1983. Serum and growth factor requirements for proliferation of human adrenocortical cells in culture: comparison with bovine adrenocortical cells. *In Vitro*.19:863-9
- Iturriaga, M. 2003. Pesquisa de contaminantes de origen viral, en sueros comerciales de origen bovino y equino. Memoria título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 47.
- Kallel, H., Jouini, A., Majoul, S., & Rourou, S. 2002. Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells. *Journal of Biotechnology*, 95(3), 195–204.
- Kuran M, JJ Robinson, ME Staines, TG McEvoy. 2001. Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. *Theriogenology* 55, 593-606.
- Kumar RK, O'Grady R, Li W, Smith LW, Rhodes GC. 1991. Primary culture of adult mouse lung fibroblasts in serum-free medium: Responses to growth factors. *Exp Cell Res*.193: 398-404.
- Lane B, Miller S. 1976. Preparation of large numbers of uniform tracheal organ cultures for long term studies. I. Effects of serum on establishment in culture. *In Vitro*.;12:147-54
- Lee, J.; Parrett, B.; Conejero, J.; Laser, J.; Chen, J.; Kogon, A.; Nanda, D.; Grant, RT.; Breitbart, AS. 2003. Biological alchemy: Engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 50(6):610-617.
- Leiva.O, F. Lorenzo, R. Calderón, R. Barrero y R. Gálvez. 2011. Adaptación de la línea celular bhk21 clon 13 al crecimiento en suspensión para vacunas virales porcinas. Empresa de Producciones Virales y Bacterianas UP7, Grupo Empresarial LABIOFAM.

- Mariani E, Mariani A, Monaco M, Lalli E, Vitale M, Facchini A. 1991. Commercial serum-free media: hybridoma growth and monoclonal antibody production. *J Immunol Methods.*;145:175-83
- Martínez J., Barrio, G. y Pasos, V. 1989. *Microbiología General*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, pp 106
- Moreira, J. L., Alves, P. M., Feliciano, A. S., Aunins, J. G., & Carrondo, M. J. T. 1995. Serum-free and serum-containing media for growth of suspended BHK aggregates in stirred vessels. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(5), 437–444.
- Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. H. 2006. Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 97–104.
- Pardo, Georgina, Almora, Ernesto, Fidalgo, Odalys, Zamora, Arelys, Rodríguez, Niurka, & Pérez, Ela María. 1999. Ensayo in vivo para determinar agentes extraños en células BHK-21 empleadas en la obtención de biológicos. *Vaccimonitor*, 9(2), 23-28. Recuperado en 08 de noviembre de 2016.
- Reculard P. Cell culture vaccines for veterinary use. 1996. En Meslin FX, Kaplan MM and Koprowski H. *Laboratory techniques in rabies: Fourth Edition*. Geneva: WHO; 1996; 314-322.
- Romijn HJ. 1988. Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve tissue. *Biol Cell.*; 63: 263-268
- Sandstrom C, Miller W, Papoutsakis E. 1994. Serum-free media for cultures of primitive and mature hematopoietic cells. *Biotechnol Bioeng.*43:706-33
- Serrato J, Hernandez V, Sandino M, Tonatiuh O. 2001. Efecto del suero fetal bovino en el crecimiento de hibridomas y sobre el patrón de glicosilacion del AcM producido. *Medicina molecular y bioprocesos*. UNAM.
- Stoll T, Muhlethaler K, von Stockar U, Marison I. 1996. Systematic improvement of a

chemically-defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production. *J Biotechnol.*;45:111-23

- United States Pharmacopeia 2008. Sterility Test. Harmonized Method.
- Van der Valk, J.; Brunner, D.; De smet, K.; Fex Svenningsen, A.; Honegger, P.; Knudsen, LE.; Lindl, T.; Noraberg, J.; Price, A.; Scarino, ML.; Gstraunthaler, G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro* 24(4):1053-1063.
- Zigler J, Lepe-Zuniga J, Vistica B, Gery I. 1985. Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol.*21:282-7