



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES



Maestría en  
Investigación  
Biomédica

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**TESIS**

“CARACTERIZACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO OBTENIDO DE  
LA INDUSTRIA CÁRNICA PARA CULTIVO CELULAR”

**PRESENTA**

Francisco Javier Preciado Gutiérrez.

**PARA OBTENCIÓN DEL GRADO**

Maestría en Investigación Biomédica

**TUTOR**

Dr. David Masuoka Ito

**INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL**

**Cotutor:** Dr. Ricardo Ernesto Ramírez Orozco

**Asesor:** Mtro. Bryan Iván Martín del Campo Téllez

Aguascalientes, Ags, 23 de mayo de 2022

## AUTORIZACIONES

CARTA DE VOTO APROBATORIO  
COMITÉ TUTORAL

**DRA. PAULINA ANDRADE LOZANO**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTE**

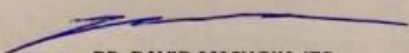
Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **FRANCISCO JAVIER PRECIADO GUTIERREZ** con ID 147849 quien realizó la tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO OBTENIDO DE LA INDUSTRIA CARNICA PARA EL CULTIVO CELULAR**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirlo/la así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.


Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.


**ATENTAMENTE**

*"Se Lumen Proferre"*

Aguascalientes, Ags., a 23 de mayo de 2022

  
**DR. DAVID MASUOKA ITO**  
Tutor de tesis

  
**DR. RICARDO ERNERSTO RAMIREZ OROZCO**  
Co-Tutor de tesis

  
**MTRO. BRYAN IVAN MARTIN DEL CAMPO TELLEZ**  
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16  
Actualización: 00  
Emisión: 17/05/19

**Biotechnology and Bioprocess Engineering - Submission Notification to co-author - [EMID:022bde4c82ffbaa3]**



em.bben.0.7b684d.a4907cde@editorialmanager.com <em.bben.0.7b684d.a4907cde@editorialmanager.com> en nombre de Biotechnology and Bioprocess Eng 18/05/2022 06:21 p. m.

Para: Francisco Javier Preciado-Gutiérrez

Submission ID: BBEN-D-22-00151

Re: "Characterization of fetal bovine serum obtained from the meat industry for cell culture"

Full author list: Francisco Javier Preciado-Gutiérrez; David Masuoka-Ito; José Luis Barrera-Bernal; Bryan Ivan Martín del Campo-Téllez; Vicente Esparza-Villalpando; Ricardo E Ramírez-Orozco

Dear MSc Francisco Preciado-Gutiérrez,

We have received the submission entitled: "Characterization of fetal bovine serum obtained from the meat industry for cell culture" for possible publication in Biotechnology and Bioprocess Engineering, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr Ricardo E Ramírez-Orozco who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office  
Biotechnology and Bioprocess Engineering

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/bben/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.





DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 25/05/22

NOMBRE: FRANCISCO JAVIER PRECIADO GUTIÉRREZ ID 147849

PROGRAMA: MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA LGAC (del posgrado): BIOMEDICINA MOLECULAR Y CELULAR

TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo Práctico

TÍTULO: CARACTERIZACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO OBTENIDO DE LA INDUSTRIA CÁRNICA PARA CULTIVO CELULAR

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Esta tesis busca un método innovador en el desarrollo de suero fetal bovino a un menor costo y con la misma efectividad que los productos comerciales

Table with columns: INDICAR, SI, NO, N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA. Rows include criteria for academic review, graduation requirements, and publication status.

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: Si X No

FIRMAS

Elaboró: DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO
NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: DR. LUIS FERNANDO BARBA GALLARDO
Revisó: DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO
Autorizó: DRA. PAULINA ANA DE LOZANO

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, quiero agradecer a la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes por estos 2 años de formación, en donde viví una gran diversidad de experiencias gratificantes que permitieron mi formación como “Maestro en Investigación Biomédica”.

Al Centro de Ciencias de la Salud, Departamento de Posgrados y al Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Diagnóstico Molecular y Biomateriales, por las atenciones y servicios brindados para poder llevar a cabo el proyecto de tesis “Caracterización de Suero Fetal Bovino obtenido de la Industria Cárnica para cultivo celular”

A la Dirección General de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por proveer el apoyo para la elaboración del proyecto.

A los profesores Dr. David Masuoka Ito, Dr. Ricardo Ernesto Ramírez Orozco, Mtro. Bryan Iván Martín del Campo Téllez, Dr. José Luís Barrera Bernal, Dr. Vicente Esparza Villalpando por las lecciones de vida, la confianza y apoyo depositados en mi persona durante todo el proceso de formación.

A los integrantes del equipo de trabajo del Laboratorio de Impresión 3D de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, por el tiempo, esfuerzo y seguimiento durante todo el trabajo experimental.

A mis hermanos Luz Elena Preciado Gutiérrez y Rafael Preciado Gutiérrez, por siempre estar presentes en mi vida, por la confianza depositada en mí. Esperando que éste trabajo les demuestre que el apoyo incondicional siempre da frutos.

Finalmente, a mis padres Ma. Elena Gutiérrez Romo y Rafael Preciado López, por estar presentes en esta etapa y apoyarme en todo momento que lo necesité. Les seré eternamente agradecido, esperando que todo mi esfuerzo los siga enorgullecendo como ellos me enorgullecen.

**ÍNDICE**

**ÍNDICE DE TABLAS ..... 3**

**ÍNDICE DE GRÁFICAS O FIGURAS ..... 4**

**RESUMEN..... 6**

**ABSTRACT ..... 7**

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ..... 8**

**JUSTIFICACIÓN ..... 10**

**MARCO TEÓRICO ..... 11**

**Introducción..... 11**

**Cultivos celulares..... 11**

**Suero Fetal Bovino ..... 14**

**Contaminación de cultivos y esterilización ..... 18**

**Tipos de contaminación de cultivos ..... 19**

**Mycoplasma..... 21**

**Presencia de material genético en el suero ..... 22**

**Técnicas de esterilización del SFB..... 23**

**Tipos de filtración ..... 23**

**Impresión 3D ..... 25**

**Características del material a utilizar..... 26**

**OBJETIVOS..... 26**

**HIPÓTESIS ..... 27**

**METODOLOGÍA..... 27**

**Tipo y diseño de estudio ..... 27**

**Definiciones conceptuales y operacionales. .... 28**

**Obtención de sangre fetal bovina..... 29**

**Separación del suero de la sangre fetal bovina..... 30**

**Filtración del SFB obtenido para la eliminación de componentes celulares..... 31**

**Evaluación de esterilidad con pruebas microbiológicas ..... 31**

**Evaluación de la presencia/ausencia de Mycoplasma..... 32**

Evaluación de pH .....	33
Preparación de muestras en dilución para las mediciones de concentración de proteínas totales y concentración de DNA.....	33
Evaluación de osmolaridad .....	34
Evaluación de concentración de proteínas totales.....	34
Evaluación de concentración de DNA .....	36
Evaluación de la proliferación celular .....	37
Procedimientos de recolección de información, instrumentos a utilizar y métodos de control de calidad de datos. ....	40
Procedimientos para garantizar los aspectos éticos en investigaciones .....	40
Conflicto de interés .....	40
Plan de tabulación y análisis de los resultados.....	40
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
Características del suero obtenido de la industria cárnica .....	41
Evaluación de esterilidad con pruebas microbiológicas .....	42
Evaluación de la presencia/ausencia de Mycoplasma.....	43
Concentración de DNA .....	45
Concentración de proteínas totales .....	46
Evaluación del pH .....	48
Osmolaridad .....	48
Viabilidad celular .....	50
Dispositivo de Filtración .....	51
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>54</b>
<b>PROSPECTOS FUTUROS PARA EL PROYECTO</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>55</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>62</b>
Anexo 1: Dispositivo de filtración obtenido por la impresión 3D. ....	62

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Composición de medios de cultivo para células de mamífero.....09

Tabla 2. Causas comunes y prevención de la contaminación microbiana.....19

Tabla 3. Preparación de la albumina diluida para la curva patrón.....35

Tabla 4. Características del SFB obtenido de la industria cárnica.....41





**ÍNDICE DE GRÁFICAS O FIGURAS**

Figura 1. Punción cardiaca para fetos bovinos.....17

Figura 2. Pruebas microbiológicas de los grupos primera medición.....42

Figura 3. Pruebas microbiológicas segunda medición de esterilidad del grupo control.....42

Figura 4. Pruebas microbiológicas. Segunda medición de esterilidad del grupo suero..... 42

Figura 5. Pruebas microbiológicas. Control positivo..... 43

Figura 6. Mycoplasma control.....44

Figura 7. Mycoplasma plasma.....44

Figura 8. Mycoplasma suero.....44

Figura 9. Mycoplasma control F1.....44

Figura 10. Mycoplasma plasma F1.....44

Figura 11. Mycoplasma suero F1.....44

Figura 12. Control Positivo de mycoplasma.....44

Figura 13. Interacción entre grupos DNA.....45

Figura 14. Qqplot, concentración de DNA.....46

Figura 15. Interacción entre grupos Proteínas totales.....47

Figura 16. Qqplot, concentración de proteínas totales.....47

Figura 17. pH muestra antes de filtrar.....48

Figura 18. pH muestra después de filtrar.....48

Figura 19. Interacción Osmolaridad.....49

Figura 20. Qqplot, Osmolaridad.....50

Figura 21 Curva de viabilidad celular.....51

Figura 22. Visualización de la jeringa y el filtro desechable, unidos por el sistema de rosca o cuerda.....52

Figura 23. Visualización del dispositivo de filtración.....52



## RESUMEN

**Antecedentes:** El suero fetal bovino (SFB), es el suplemento más utilizado para el cultivo celular, ya que su compleja composición aporta los nutrientes necesarios para el crecimiento de la mayoría de las células. Es un subproducto de la industria cárnica, y su disponibilidad y producción depende principalmente de dos factores externos no controlables, las condiciones climáticas y cambios en el consumo de la res. Actualmente, el uso creciente de SFB en cultivo celular para la investigación, el diagnóstico y la fabricación farmacéutica, lo ha llevado a ser un negocio global que cotiza grandes valores monetarios en el mercado, lo que ha provocado que en ciertas ocasiones el suero fetal bovino no sea de la calidad adecuada. Las características que debe presentar un SFB para su uso en cultivo celular, están estrictamente establecidas por la International Serum Industry Association (ISIA). Por lo que, el presente trabajo pretende realizar la caracterización de un SFB obtenido de la industria cárnica para su uso en el cultivo celular.

**Resultados:** En las pruebas de presencia o ausencia de contaminantes biológicos se obtuvieron resultados negativos. Las pruebas de caracterización del suero presentaron diferencias significativas entre el suero obtenido de la industria cárnica y el suero comercial control. Finalmente, en las pruebas de viabilidad no se observó ninguna complicación para el crecimiento celular pese a las diferencias mencionadas en la caracterización de los sueros.

**Conclusiones:** De acuerdo con los resultados, se puede concluir que el suero obtenido de la industria cárnica no mostró diferencias significativas en los aspectos de manutención y proliferación celular en comparación con el suero comercial. Si no se tiene a disposición SFB, el plasma podría utilizarse en casos de emergencia como sustituto para mantener ciertos cultivos celulares.

**Palabras clave:** Suero fetal bovino, caracterización, suplemento, cultivo celular, estéril, International Serum Industry Association.

## ABSTRACT

**Background:** Fetal bovine serum (FBS) is the most widely used supplement for cell culture since its complex composition provides the necessary nutrients for the growth of most cells. It is a by-product of the meat industry, and its availability and production depend mainly on two uncontrollable external factors, climatic conditions, and changes in beef consumption. Currently, the increasing use of SFB in cell culture for research, diagnosis, and pharmaceutical manufacturing, has led it to be a global business that trades large monetary values in the market, which has caused that on certain occasions fetal bovine serum is not of adequate quality. The characteristics that an SFB must present for its use in cell culture are strictly established by the International Serum Industry Association (ISIA). Therefore, the present work aims to characterize an SFB obtained from the meat industry for use in cell culture.

**Results:** In the tests for the presence or absence of biological contaminants, negative results were obtained. The serum characterization tests showed significant differences between the serum obtained from the meat industry and the commercial control serum. Finally, in the viability tests, no complication for cell growth was observed despite the differences mentioned in the characterization of the sera.

**Conclusions:** According to the results, it can be concluded that the serum obtained from the meat industry did not show significant differences in the aspects of cell maintenance and proliferation compared to the commercial serum. If FBS is not available, plasma could be used in emergencies as a substitute for maintaining certain cell cultures.

**Keywords:** Fetal bovine serum, characterization, supplement, cell culture, sterile, International Serum Industry Association.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo celular fue desarrollado por primera vez a principios del siglo XX como una metodología para estudiar el comportamiento de las células animales *in vitro* (1,2) . Los cultivos celulares también son definidos como sistemas conformados por células provenientes de órganos o tejidos, que pueden ser normales o tumorales, que, si mantiene ciertas características como la composición química, las condiciones de temperatura, el pH, la aireación y la humedad, se puede asegurar su supervivencia y proliferación de las células fuera del huésped (1).

El cultivo celular *in vitro* puede realizarse mediante diversas estrategias, de entre las cuales destacan el método del explante y el método de disgregación por técnicas enzimáticas o mecánicas. El primero consiste en la inoculación y mantenimiento de pequeños fragmentos no disgregados de tejido vivo y el segundo implica la disociación de fragmentos de tejido en células individuales mediante el uso de enzimas proteolíticas para la destrucción de la matriz extracelular (el soporte o andamio natural de las células en el tejido) y los enlaces intercelulares (3).

Las ventajas que se pueden encontrar con el uso de tejidos son: la fácil manipulación en condiciones controladas, una alternativa para evitar el uso de animales, trabajar a pequeña/mediana/gran escala y, además, las células pueden durar congeladas por largos periodos de tiempo con una mínima pérdida de viabilidad, por lo que es sencillo conservarlas y resguardarlas. Si se deseara trabajar con una línea celular en especial, se puede obtener de los bancos internacionales existentes (4).

Pero, ¿cuáles son los componentes que conforman un cultivo celular? En la siguiente tabla, Castro M.M. y Herrero Martinez 2014 nos muestran cuales son esos componentes.

Aminoácidos	Vitaminas	Sales	Otros compuestos	Proteínas requeridas en los medios definidos libres de suero
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosa	Insulina
Cisteína	Colina	KCl	Penicilina	Transferrina
Glutamina	Folato	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Estreptomicina	Factores de crecimiento
Histidina	Nicotinamida	NaHCO <sub>3</sub>	Anfotericina	específicos
Isoleucina	Pantotenato	CaCl <sub>2</sub>	Rojo fenol	
Leucina	Piridoxal	MgCl <sub>2</sub>	Suero fetal bovino	
Lisina	Tiamina			
Metionina	Riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptofano				
Tirosina				
Valina				

Tabla 1. Composición de medios de cultivo para células de mamífero. Tabla tomada de Castro M.M. y Herrero Martínez E. *Desarrollo de las Técnicas de Cultivos Celulares. Esc gestión Sanit [Internet]. 2014;0–71.*

Como se puede observar en la tabla, uno de los suplementos más utilizados para el cultivo celular es el suero fetal bovino (SFB). Este es fuente de aminoácidos, proteínas, vitaminas (particularmente vitaminas liposolubles como A, D, E, y K), carbohidratos, lípidos, hormonas, factores de crecimiento, minerales y oligoelementos. Además, el suero amortigua el medio de cultivo, inactiva las enzimas proteolíticas, aumenta la viscosidad media y condiciona la superficie de crecimiento del recipiente de cultivo (5).

El SFB es un subproducto de la industria de la carne de res. Su producción depende de una serie de factores externos no controlables, como las condiciones climáticas o cambios en el consumo de la res (6).

Actualmente, el uso creciente de SFB en cultivo celular para la investigación, el diagnóstico y la fabricación farmacéutica, lo ha llevado a ser un negocio global que cotiza grandes valores en el mercado. Aunque, los volúmenes exactos de la producción global de SFB y su disponibilidad, así, como la demanda mundial aún se desconocen, se ha visto, que en ocasiones los sueros no cumplen con las expectativas de esterilidad que piden los clientes, por lo que conseguir sueros de alta fidelidad sigue siendo costoso (7).

En 1994, se reportó una venta aproximada 30,000 L de suero proveniente de Nueva Zelanda en todo el mundo, aunque en realidad la cantidad recolectada solo fue de 15,000 L (8). Una investigación de FDA en EE. UU. Mostró que 143 lotes de SFB (280,000 L) se vieron afectados por casos de fraude a nivel global. Como resultado muy visible de esta agitación en el mercado del suero, los precios de SFB se dispararon en 2015 desde aproximadamente € 80 por 500 ml hasta € 1,200 por 500 ml (7,9–11).

Por lo anterior dicho, es que se pretende buscar la manera de obtener un SFB “funcional” propio, que, para llevarlo a cabo, se buscaron algunos procesos de esterilización del SFB y pruebas de caracterización, ya que para que se apruebe un SFB para el uso en cultivo celular, el suero tiene que pasar por diferentes pruebas de seguridad. Este proyecto evaluará como primera etapa, algunas de las pruebas solicitadas por la International Serum Industry Association (ISIA, por sus siglas en inglés), y los resultados obtenidos se compararán con los valores de los sueros comerciales también establecidos por la ISIA.

## **JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, el uso del cultivo celular se ha disparado exponencialmente. Esto es gracias a que el cultivo celular permite observar el comportamiento de diferentes tejidos en forma *in vitro* fuera del organismo (2).

Uno de los componentes principales para el cultivo celular, es el suero fetal bovino (SFB), el cual es uno de los productos biológicos más utilizados para la suplementación, ya que aporta factores de crecimiento, hormonas, minerales, lípidos y otros micronutrientes, que, al ser usados en las concentraciones apropiadas en el medio de cultivo, suplen satisfactoriamente los requerimientos metabólicos que garantizan la proliferación celular (5).

El SFB en los últimos años ha tenido un gran impacto en el mercado, por lo cual se produce y comercia en cantidades inimaginables. Por dicho impacto, se han descuidado las previsiones para el control de su calidad, y como éste no ha podido ser reemplazado definitivamente por su compleja composición nutrimental, se

pretende producir y obtener un SFB libre de agentes contaminantes (como bacterias, virus y mycoplasma), por medio de las diferentes técnicas de esterilización de suero, y que al caracterizarlo, mantenga los niveles estándares pedidos por la ISIA procurando obtener un producto final estéril y funcional (7,12).

## **MARCO TEÓRICO**

### **Introducción**

La célula es considerada la unidad básica estructural de todos los organismos vivos. Los organismos conformados por diferentes tipos de células eucariotas se les conoce como multicelulares; cada una de las diferentes células tienen diferentes tamaños, formas y funciones que permiten la formación de tejidos y/u órganos, que, finalmente da como resultado la formación de un organismo con funciones y capacidades más complejas a la de sus componentes individuales. La supervivencia de dicho organismo, depende de la organización metabólica de los millones de células que lo conforman. Entre las funciones principales, podemos encontrar: nutrición, relación intercelular y reproducción, en donde, estas similitudes de todas las células, proporcionan un marco común para la biología celular permitiendo que los principios básicos puedan ser extrapolados y generalizados a todos los diferentes tipos de células. Es por lo anterior, que diversos tipos de organismos y células son utilizados para el cultivo celular (13).

### **Cultivos celulares**

El cultivo de tejidos se inició a principios del siglo XX, como un método para estudiar el comportamiento de células animales fuera de las variaciones sistémicas que pueden ocurrir *in vivo*. Por lo tanto, el cultivo celular puede definirse como la obtención de células animales y su propagación *in vitro*. Lo anterior, gracias a un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento, la supervivencia y/o multiplicación de células provenientes de órganos específicos que tratan de conservar la mayoría de sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas en un entorno artificial adecuado para su crecimiento(2,3,13).



Algunas de las ventajas del uso del cultivo celular son las siguientes: “a) Fácil manipulación bajo condiciones controladas b) Alternativa al uso de animales c) Permite trabajar en pequeña, mediana y gran escala d) Las células pueden mantenerse congeladas por largos períodos de tiempo con mínima pérdida de viabilidad e) Menor variabilidad debido a que se tiene un cultivo de un linaje celular definido f) Se cuenta con acceso fácil a múltiples líneas celulares en bancos internacionales” (4).

Si se habla de las aplicaciones, los cultivos celulares se utilizan tanto en la investigación básica como en la investigación aplicada. En la investigación básica, permite estudiar diversos fenómenos complejos, tales como (14):

- *La actividad intracelular:* transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, ciclo celular, diferenciación, apoptosis, etc.
- *El flujo intracelular de biomoléculas:* procesamiento del ARN, el movimiento del ARN desde el núcleo hacia el citoplasma, el movimiento de las proteínas hacia diversos orgánulos, el ensamblaje y desensamblaje de los microtúbulos, etc.
- *Genómica y proteómica:* análisis genético, infección, transformación celular, inmortalización, senescencia, expresión génica, rutas metabólicas, etc.
- *Ecología celular:* el estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular y de su diferenciación, el estudio de las necesidades nutricionales, la cinética de la población celular, etc.
- *Las interacciones celulares:* morfogénesis, proliferación celular, adhesión celular, interacciones con la matriz, invasión celular, etc.

En el caso de la investigación aplicada, las técnicas de cultivo se utilizan en diversas áreas, tales como (14):

- *Virología:* Cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas, etc.
- *Biotecnología:* producción industrial de fármacos en biorreactores (interferón, insulina, hormona de crecimiento, etc.)

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- *Inmunología*: Producción de anticuerpos monoclonales, señalización, fenómenos de inflamación.
  - *Farmacología*: Efecto de diversos fármacos, interacciones con el receptor, fenómenos de resistencia, etc.
  - *Ingeniería de tejidos*: Producción de tejidos artificiales (piel, cartílagos) para el tratamiento de grandes quemados, injertos o autotransplantes, desdiferenciación y diferenciación inducida, etc.
  - *Toxicología*: citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis, etc.

Se sabe que muchos cultivos celulares se encuentran anclados a una superficie celular gracias a que sintetizan proteínas relacionadas con la matriz extracelular, la cual, está encargada de mantener unidas a las células y posee un papel regulador sobre las mismas *in vivo*. Por lo que, la elaboración de los medios de cultivo celulares se puede realizar de tres formas tomando en cuenta lo anteriormente mencionado (13,14):

1. *Los cultivos en monocapa*: Representa una de las formas de crecimiento celular *in vitro* de células dependientes de anclaje. En este tipo de cultivo celular, las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio) y es el método más utilizado para la mayoría de las células.
2. *Los cultivos en suspensión*: Lo podemos utilizar para células cuya naturaleza es parecida a la de las células hematopoyéticas o aquellas que han disminuido la síntesis de proteínas de anclaje, tales como células transformadas artificialmente o células provenientes de tumores. En este cultivo celular las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo.
3. *Los cultivos tridimensionales*: Esta forma de cultivar células, lo que busca es conservar la arquitectura *in vivo* del tejido original. Permite evaluar el efecto de las sustancias que actúan inter e intra celularmente, además, en este tipo de cultivo es posible mantener la diferenciación celular, procurando tener una buena réplica del tejido origen.

## Suero Fetal Bovino

Desde el trabajo pionero de Sidney Ringer en 1880, se reconoció a los medios salinos como “mínimo básico” para mantener tejidos *in vitro*. Por otra parte, es muy recomendado utilizar otros tipos de fluidos como plasma, suero, linfa, etc. Los cuales eliminan la opción de utilizar un medio salino, ya que éstos contienen desde un inicio los componentes necesarios para el desarrollo de los tejidos (15).

El cultivo exitoso *in vitro* de las células de mamífero, requiere de una suplementación con suero animal de diferente origen para estimular el crecimiento y proliferación celular (16). Un material derivado de animales comúnmente empleado es el suero fetal bovino (SFB). Hay más de 1000 componentes encontrados en SFB, entre ellos se encuentran aminoácidos, proteínas, vitaminas (particularmente vitaminas liposolubles como A, D, E, y K), carbohidratos, lípidos, hormonas, factores de crecimiento, minerales y oligoelementos. Además, el suero amortigua el medio de cultivo, inactiva las enzimas proteolíticas, aumenta la viscosidad media y condiciona la superficie de crecimiento del recipiente de cultivo (5,17,18).

La aplicación del SFB en la investigación básica y aplicada, es muy similar a la de los cultivos celulares, ya que, casi toda investigación que requiera cultivo celular, necesitara suplementar su cultivo con suero. También es utilizado en la manufactura y control de vacunas y fármacos biotecnológicos humanos y veterinarios (19). Al utilizar SFB el crecimiento celular es típicamente (17):

- Rápido.
- Consistente y reproducible.
- Falta de cambios indeseables en la diferenciación.
- No obstaculizado por la introducción de contaminantes perjudiciales.

Además, por lo único que se tendría que preocupar el personal que lo utiliza es por (17):

- Continuidad de suministro.
- Consistencia de lote a lote.

- Resultados reproducibles.
- Fluctuación de precios.
- Integridad del producto.

Cabe mencionar, que, si bien en la actualidad existen medios de cultivo libres de suero, éste no ha podido ser reemplazado en definitiva, ya que su compleja composición aporta los ingredientes indispensables para el crecimiento de la mayoría de las células (20).

El SFB es un subproducto de la industria cárnica. Su producción depende de una serie de factores externos no controlables, como el clima o el consumo de carne (6,17). Si hablamos de las condiciones climáticas, en los últimos años el ganado para la producción del suero se ha agotado debido a las condiciones de sequía sostenida y otros problemas agrícolas, por otra parte, el consumo de la carne es variable dependiendo de la zona que se mencione (10).

Para obtener un SFB con calidad verificable, se comienza desde el momento de la cosecha. El suero debe obtenerse de rebaños que son monitoreados constantemente para detectar enfermedades específicas relevantes en los sectores agrícolas, para continuar hasta el momento en que la botella se sella, congela y envía al comprador (21). Para ello, existen tres puntos críticos que por lo general son tomados en cuenta al momento de la compra del SFB, los cuales son (11):

- La trazabilidad: documentación de verificación del suero referente a su origen geográfico especificado. Aunque a menudo se pasa por alto como una parte crítica de las auditorías de calidad.
- El país de origen: Éste tiene un impacto material en el perfil de riesgo del producto con respecto a la posible falta o presencia de agentes adventicios.
- Las restricciones gubernamentales de importación y exportación: Tanto para las materias primas como para los productos terminados están indisolublemente vinculadas al país geográfico de origen.

Refiriéndose a lo anterior, las áreas geográficas más deseables en el mundo para la adquisición de SFB, son aquellas donde no se encuentran los famosos agentes

adventicios y las enfermedades poblacionales del ganado. Nueva Zelanda, ocupa el primer lugar en ésta categoría, ya que nunca ha presentado casos de encefalitis espongiforme bovina (enfermedad de la vaca loca) o fiebre aftosa. Un caso similar es Australia, Canadá, países de centro y sur América y finalmente México y EE. UU. Por su reciente clasificación a “riesgo insignificante” por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés), que es un perfil de riesgo muy similar al de Australia y Nueva Zelanda (10,12,19).

Actualmente, el uso creciente de SFB para la investigación, el diagnóstico y la fabricación farmacéutica, lo ha llevado a ser un negocio global que cotiza grandes valores en el mercado. Aunque, los volúmenes exactos de la producción global de SFB y su disponibilidad, así, como la demanda mundial, aún se desconocen; puede crear oportunidades para algún tipo de abuso, etiquetado erróneo y/o adulteración del SFB (7).

En 1994, se reportó una venta aproximada 30,000 L de suero proveniente de Nueva Zelanda en todo el mundo, aunque en realidad la cantidad recolectada solo fue de 15,000 L (8). Una investigación de FDA en EE. UU. Mostró que 143 lotes de SFB (280,000 L) se vieron afectados por casos de fraude a nivel global. Como resultado muy visible de esta agitación en el mercado del suero, los precios de SFB se dispararon en 2015 desde aproximadamente € 80 por 500 ml hasta € 1,200 por 500 ml. Debido a estos últimos incidentes, el origen geográfico, el abastecimiento y la trazabilidad de FBS se convirtieron en un problema (7,9–11).

La sangre fetal bovina, es recolecta generalmente por punción cardiaca, ya que es una técnica que minimiza el peligro de contaminación del suero. El procedimiento requiere de personal altamente capacitado y los fetos deben tener al menos 3 meses de edad, de lo contrario el corazón sería demasiado pequeño para poder realizar la técnica (21). El procedimiento es descrito en el siguiente diagrama:

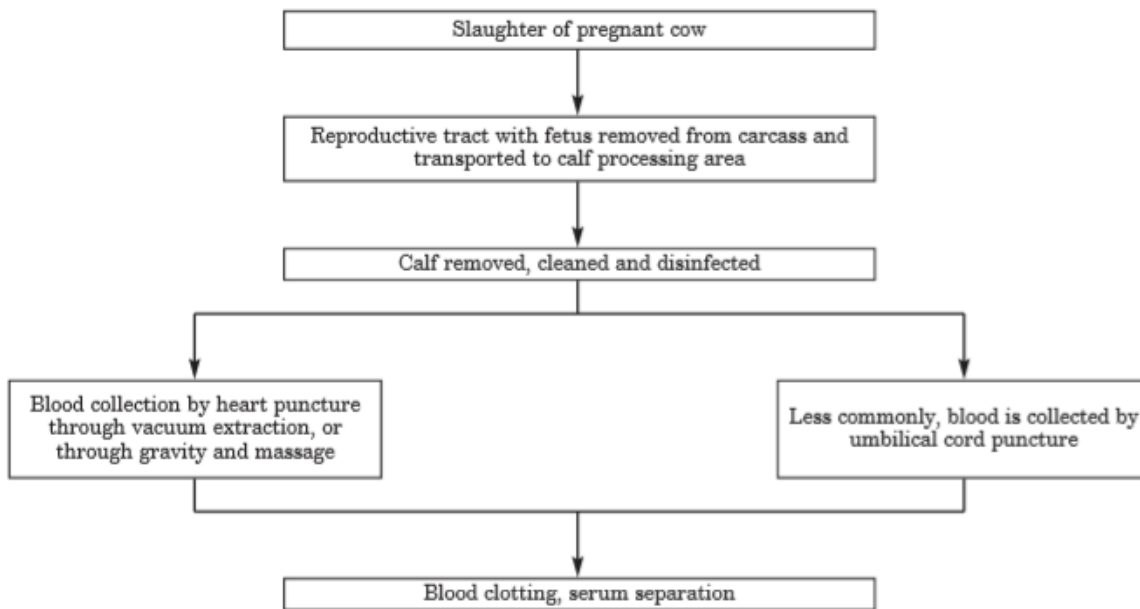


Figura 1. Punción cardíaca para fetos bovinos. Imagen obtenida de: Jochems CEA, Van der Valk JBF, Stafleu FR, Baumans V. *The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem? ATLA Altern to Lab Anim.* 2002;30(2):219–27.

El tiempo que transcurre entre la vaca madre en el procedimiento normal de sacrificio y la punción cardíaca es de aproximadamente 5 minutos o aproximadamente 25-30 minutos, dependiendo del personal que se encuentre en labor. El procedimiento de sangrado dura aproximadamente de 2 a 5 minutos, dependiendo de la edad del feto y del equipo utilizado. Por lo que el procedimiento de sangrado finaliza entre 5-35 minutos después que la madre muere. Dependiendo del tamaño y edad del feto, es la cantidad de suero que se obtiene. Se tiene estimado que, aproximadamente se recupera un 50% del suero después de la coagulación, entonces, un feto de 3 meses produce aproximadamente 150 ml de SFB crudo; uno de 6 meses 350 ml; y un feto de 9 meses (a corto plazo) da 550 ml. Por lo que, la producción mundial de SFB en bruto se estima en alrededor de 500,000 litros al año (21).

El suero recolectado del matadero es precioso, único y vital para las ciencias de la vida. Cabe señalar que el suero animal, especialmente el SFB, como componente de los medios de cultivo celular, ha contribuido enormemente a la salud humana y

animal, superando con creces el valor de la cadena alimentaria animal que se sacrifica y procesa en la producción de carne (19).

### **Contaminación de cultivos y esterilización**

Generalmente el ambiente sanitario está contaminado con una gran cantidad de microorganismos capaces de causar enfermedades e infecciones, además, puede causar la contaminación de medios, cultivos, placas, etc. Por ello, es importante garantizar que todos los artículos que se utilizan para los diferentes procesos, reciban el apropiado tratamiento para reducir los riesgos (22,23).

Los procesos, por los cuales se puede conseguir la disminución o eliminación de la carga microbiana, pueden ser: la limpieza-descontaminación, desinfección y la esterilización. La OMS define a la esterilización como *la técnica de saneamiento cuya finalidad es la destrucción de toda forma de vida, aniquilando todos los microorganismos, tanto patógenos como no patógenos, incluidas sus formas esporuladas, altamente resistentes* (23). Además, existen un conjunto de condiciones ambientales que se deben tomar en cuenta para llevar a cabo el proceso, ya que afectan la cinética de destrucción. Dentro de éstos se encuentran (24):

- Concentración del agente.
- Tiempo de exposición.
- pH del medio.
- Temperatura.
- Presencia de materiales extraños.
- Resistencia propia del microorganismo.
- Número inicial de la población.

Una de las principales fuentes de contaminación de los cultivos celulares, es el propio individuo. Los cultivos celulares se contaminan con microorganismos provenientes de la boca o las manos del personal que realiza el cultivo. Por eso es de gran importancia el uso de guantes y lavarse las manos cuando se vaya a

trabajar dentro del área, así como el uso de sustancias desinfectantes como el etanol (24).

Por otra parte, debido a las regulaciones limitadas del control de calidad, el SFB es una fuente común de contaminación en cultivos de tejido animal, porque la recolección y venta no se lleva a cabo de acuerdo con los estándares manuales adecuados (12).

**Tipos de contaminación de cultivos**

A simple vista, generalmente se puede ver la contaminación de bacterias, hongos (incluidos los mohos) y levaduras, porque el medio se volverá rápidamente turbio y cambiará de color (siempre que se agregue rojo fenol al medio y el indicador de pH no sea la sustancia tóxica más común). Los microscopios ópticos estándar también mostrarán células bacterianas y estructuras fúngicas, por lo que las observaciones microscópicas diarias de los cultivos garantizarán la detección temprana de la contaminación microbiana y permitirán tomar las medidas adecuadas inmediatamente después de que aparezcan los primeros signos. En particular, es necesario eliminar rápidamente los cultivos contaminados para proteger los cultivos cercanos y el entorno de cultivo de tejidos estéril, incluidas las incubadoras, los inodoros y las cabinas de seguridad biológica. La Tabla 2 muestra de manera resumida de donde se pueden contaminar los cultivos y como podría evitarse dicha contaminación (25).

Causa principal	Prevención
<b>Técnica:</b>	
<b><i>Manipulaciones, pipeteo, dispensación</i></b>	
Superficies y equipos no esterilizados	Limpie el área de trabajo de los artículos que no estén en uso inmediato.
Derrames en los cuellos y el exterior de las botellas y en la superficie de trabajo	Limpie regularmente con alcohol al 70%. No vierta líquidos. Dispensar con pipeta, autodispensador o dispositivo de transferencia. Si es inevitable verter: (1) hágalo con un movimiento suave, (2) deseche la botella de la que sirve.
Tocar o sostener la pipeta demasiado cerca de la punta, tocar el cuello de las botellas, el interior de los tapones de rosca	Sostenga las pipetas por encima de las graduaciones. Manipule las pipetas estériles con una funda de envoltura.
Salpicadura del vaso de precipitados	Deseche los desechos en un vaso de precipitados con un embudo o use vacío para extraer los desechos siempre que sea posible.



Polvo sedimentario o partículas de piel que se depositan en el cultivo o botella; manos o aparatos sostenidos sobre un plato, botella, plato abierto	Nunca pase las manos, trabaje sobre vasos abiertos No trabaje encima (flujo laminar vertical y banco abierto) o detrás y encima (campana de flujo laminar horizontal) una botella o plato abierto.
<b><i>Operador cabello, manos, aliento, ropa</i></b>	
El polvo de la piel, el cabello o la ropa cayó o se introdujo en el cultivo.	Lávese bien las manos, use una bata de laboratorio que no suelte pelusa. Utilice una bata de laboratorio reservada exclusivamente para la sala de cultivo. Átese el cabello largo o use una gorra. Aléjese del trabajo cuando sea necesario hablar.
Aerosoles por hablar, toser, estornudar, etc.	Evite trabajar con un resfriado o use una mascarilla.
<b>Materiales y reactivos</b>	
<b><i>Soluciones</i></b>	
Reactivos y medios no estériles	<b>Filtrar</b> o esterilizar en autoclave las soluciones antes de su uso.
Procedimientos de esterilización inadecuados	Supervise el rendimiento de la autoclave con un termómetro de registro o un indicador de esterilidad. Pruebe o cultive soluciones esterilizadas si se sospecha contaminación.
Control de calidad deficiente en el proveedor comercial	Obtenga <b>medios, tapones y sueros</b> solo de proveedores acreditados que certifiquen la calidad y la fuente.
<b><i>Cristalería y tapones de rosca</i></b>	
Polvo y esporas del almacenamiento	Tapas de cubierta con papel de aluminio. Limpie las botellas con alcohol al 70% antes de llevarlas al capó.
<b><i>Instrumentos, pipetas</i></b>	
Esterilidad poco confiable	Utilice <b>suministros desechables, estériles y envueltos individualmente</b> de un proveedor de confianza. Esterilice los artículos reutilizables con calor seco antes de usarlos.
Contacto con una superficie no estéril o algún otro material	No agarre ninguna parte de un instrumento o pipeta que pueda pasar a un recipiente de cultivo.
<b><i>Frascos de cultivo y frascos de medios en uso</i></b>	
Polvo y esporas de la incubadora o el refrigerador.	Utilice tapones de rosca en lugar de tapones. Limpie las botellas antes de colocarlas en la campana. Utilice una contención secundaria para las placas.
Condiciones de incubación o almacenamiento sucias	Cubra los tapones y cuellos de las botellas con papel de aluminio durante el almacenamiento o la incubación. Limpia las tiendas y las incubadoras con regularidad.
Medios debajo de la tapa y extendiéndose hacia el exterior de la botella.	Deseche todas las botellas que muestren derrames en la parte exterior del cuello. No vierta.
<b>Equipamiento y facilidades</b>	
<b><i>Aire ambiente</i></b>	
Corrientes, remolinos, turbulencias, polvo, aerosoles	Dedique un espacio apropiado para el cultivo de tejidos / células Reduzca el tráfico y la actividad extraña. Limpie el piso y las superficies de trabajo con regularidad.
<b><i>Cabinas de bioseguridad de flujo laminar</i></b>	
Filtro perforado	Compruebe los filtros con regularidad en busca de agujeros y fugas.
Filtro sucio	Verifique la caída de presión a través del filtro.
Derrames, particularmente en grietas o debajo de una superficie de trabajo	Desinfecte regularmente alrededor y debajo de la superficie de trabajo. Deje que el alcohol entre en las grietas.

<b>Incubadoras humidificadas con CO<sub>2</sub></b>	
Crecimiento de mohos y bacterias en paredes y estantes en una atmósfera húmeda	Limpiar periódicamente de acuerdo con las especificaciones del fabricante con la desinfección adecuada.
Esporas, etc., transportadas por circulación de aire forzado	Coloque los platos abiertos en cajas de plástico con tapas ajustadas (pero no selle las tapas).
<b>Baños y otros equipos</b>	
Contaminación en baños de agua utilizados para calentar soluciones.	Limpiar y <b>desinfectar el baño de agua con</b> regularidad; Limpie bien los recipientes con alcohol al 70% antes de transferirlos a la cabina de bioseguridad para usarlos cuando estén secos.
Polvo en cilindros de gas, bombas, etc.	Considere usar un baño de calentamiento sin agua (perlas). Limpiar con alcohol al 70% antes de entrar en la sala de cultivo.
<b>Importación de materiales biológicos</b>	
<b>Líneas celulares entrantes</b>	
Contaminación sospechada en la fuente o durante el tránsito	Manipule estas líneas celulares solas, preferiblemente en cuarentena. Compruebe si hay contaminación cultivando un cultivo durante dos semanas sin antibióticos. Inspeccione la contaminación visualmente, mediante microscopía de contraste de fase y tinción <b>Hoechst</b> / DAPI para micoplasma.

*Tabla 2. Causas comunes y prevención de la contaminación microbiana. Obtenida de: Problemas comunes del cultivo celular | Contaminación del cultivo celular | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2021 May 26]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-culture/cell-culture-troubleshooting-contamination.html>*

## **Mycoplasma**

El mycoplasma es un género de bacterias que no tiene pared celular y, por lo tanto, no se ve afectado por los antibióticos que restringen el crecimiento de bacterias al inhibir la formación de las paredes celulares. Tienen una morfología flexible y un tamaño de celda de 0,15 a 0,3 µm, lo que significa que pueden deshacerse de los métodos estándar de filtración de cultivos celulares que suelen utilizar filtros de poros de 0,22 µm. A diferencia de la mayoría de los otros contaminantes bacterianos, el mycoplasma no es obvio en una inspección ocasional y, debido a su tamaño y morfología muy pequeños, es difícil de detectar por microscopía óptica. El título de mycoplasma en el cultivo puede llegar a 10<sup>8</sup> organismos / ml sin provocar la turbidez del medio. Por lo general, no matan las células de mamíferos infectados, pero pueden afectar significativamente el cultivo al cambiar el metabolismo celular, causando aberraciones cromosómicas, ralentizando el crecimiento celular y la interferencia con la unión celular (25,26).

Las diversas fuentes de contaminación por mycoplasmas en el laboratorio pueden presentar desafíos. Debido a que existen ciertos tipos de mycoplasma en la piel humana, pueden introducirse mediante técnicas asépticas deficientes además de suplementos contaminados (como el suero fetal bovino). El mycoplasma es altamente infeccioso entre cultivos de células adyacentes contaminados. El procesamiento de mycoplasma requiere un medio de filtrado y un tampón con una membrana con un tamaño de poro de 0,1  $\mu\text{m}$  o menor, porque un dispositivo de filtro de medio estándar con un tamaño de poro de 0,22 o 0,45  $\mu\text{m}$  no podrá excluir estos pequeños organismos (25,26).

### **Presencia de material genético en el suero**

Los ácidos nucleicos circulantes libres (CNAPS) en plasma y suero se conocen desde hace muchos años. El ADN como el ARN pueden encontrarse en forma de ácidos nucleicos circulantes libres (como ADN nuclear, ADN mitocondrial, ARNm, miARN, ARNip y ARNt) en el plasma y en el suero, y se han encontrado tanto en individuos sanos como en individuos enfermos. Los CNAPS parecen originarse a partir de células sanguíneas, bacterias y virus, destrucción del ADN de la superficie de los glóbulos blancos, necrosis celular y tisular, apoptosis de células nucleosómicas y liberación de células exosómicas, transposones, retrotransposones, liberación espontánea de ADN / ARN o descomposición de complejos de lipoproteínas recién sintetizados (27).

Actualmente, la mayor parte de la investigación sobre el ADN plasmático se centra en aplicaciones de diagnóstico. Sin embargo, es importante darse cuenta de que todavía quedan muchos problemas biológicos sin resolver en este campo. Uno de los problemas es la producción de ADN plasmático, que, aunque se supone que la muerte celular es un mecanismo que puede producirlo, se han planteado otras posibilidades, incluida la secreción activa. Otro problema sin resolver se refiere a la posible función del ADN circulante, en donde datos interesantes informaron que, en algunos casos, las células pueden absorber el ADN circulante y dar lugar a una expresión genética detectable (28).

## Técnicas de esterilización del SFB

En el caso del SFB, existen varios métodos de esterilización. Entre estos métodos podemos encontrar (29–31):

- *Inactivación por calor*: Tiene como objetivo inactivar el sistema del complemento y potenciales inhibidores del crecimiento celular desconocidos.
- *Filtración*: ayuda a la retención de microorganismos y de algunos agentes más pequeños como el mycoplasma.
- *Tratamiento con carbón activado*: El carbón activado se une a moléculas lipofílicas y por ellos es utilizado para eliminar del SFB hormonas.
- *Diálisis*: La diálisis puede eliminar del SFB las moléculas cuyo peso molecular sea menor a 10,000 Da.
- *Irradiación con rayos gamma*: Este proceso puede eliminar virus comúnmente presentes en especies bovinas.

## Tipos de filtración

El objetivo de la filtración, es filtrar una muestra de la mejor manera posible, es decir, consiguiendo el mejor grado de retención de partículas y recuperar la fase útil con el mayor grado de limpieza posible. Lo anterior, hacerlo de la manera más rápida y la mayor economía posible (32).

Existen 4 diferentes tipos de filtración. Entre ellos podemos encontrar:

1.- Microfiltración: que se define como un proceso de separación de membrana que utiliza membranas de tamaños de 0.03 a 10 micras (1 micron= 0.0001 milímetros), tiene un límite de peso molecular (MWCO por sus siglas en inglés) de más de 1,000,000 daltons y funciona a una presión relativamente baja de 100 a 400 kPa (15 a 60 psi). Algunos de los materiales eliminados por este método incluyen arena, limo, arcillas, quistes de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium*, algas y especies bacterianas (31).

2.-Ultrafiltración: este tipo de filtración trabaja con un poro de tamaño aproximado de 0.002 a 0.1 micras, su MWCO es de aproximadamente 10,000 a 100,000 daltons

y su función operacional de presión se aproxima de 200 a 700 kPa (30 a 100psi). La ultrafiltración eliminara las especies bacteriológicas que no son eliminadas por la microfiltración y algunos virus (31).

3.-Nanofiltración: se caracteriza por trabajar con membranas con un poro nominal de 0.001 micras y un MWCO de 1,000 a 100,000 daltons. Trabajar con ésta técnica, requiere una mayor fuerza de presión para atravesar los poros de estas membranas. Requiere un presión operacional cercana a los 600 kpa (90 psi) y puede llegar hasta 1,000 kPa (150 psi). Éste tipo de filtrado, puede eliminar prácticamente todos los quistes, bacterias, virus y materiales húmicos (31).

4.-Osmosis Inversa: El fenómeno de osmosis inversa, se caracteriza por el flujo de un solvente a través de una membrana en condiciones de un gradiente de concentración, agregándole presión a la solución más concentrada y al final se obtiene un solvente puro del otro lado de la membrana (32).

Para el uso de las técnicas anteriormente mencionadas, existe una gran variedad de filtros. Esta diversidad, va desde el material con el que se elabora el filtro, hasta el tamaño del poro. En la variedad de filtros, podemos encontrar (33):

- *Membranas de Acetato de Celulosa:* recomendadas especialmente para aplicaciones que requieren poca unión a proteínas, como filtrar medios de cultivo que contienen sueros.
- *Membranas de Nitrato de Celulosa:* se recomiendan para filtrar soluciones donde las proteínas vinculantes no son una preocupación, para uso general del laboratorio.
- *Membranas de Nylon:* son hidrófilas y se recomienda para aplicaciones que requieren extraíbles muy bajos ya que no contienen agentes humectantes, detergentes o tensioactivos.
- *Membranas de Polietersulfona (PES):* son muy recomendables para filtrar medios de cultivo celular ya que tienen una unión baja a proteínas y extraíbles.

- *Membranas de Celulosa Regenerada*: Son hidrofóbicas, utilizadas para disolventes ultralimpios, desgasificadores y fases móviles utilizadas en aplicaciones de HPLC.
- *Membranas de politetrafluoretileno (PTFE)*: ideales para filtrar gases, incluido el aire humidificado, además, por su cualidad de resistencia química extrema, son muy útiles para filtrar solventes u otros productos químicos agresivos.
- *Filtros de fibra de vidrio*: son utilizadas como filtro de profundidad para la prefiltración de soluciones. Tienen, además, una alta capacidad de carga de partículas y son ideales para prefiltrar soluciones sucias y difíciles, como sueros.

### **Impresión 3D**

La impresión 3D también es conocida como impresión tridimensional, es un método que te permite la elaboración de objetos tridimensionales con una impresora especializada que coloca varias capas bidimensionales de algún material una sobre la otra. Se puede comparar con la impresión bidimensional de tinta sobre el papel, la diferencia aquí, es el material a utilizar como tinta, que puede ser algún tipo de plástico. La impresión 3D, es utilizada generalmente en la producción de prototipos para el diseño de algún nuevo producto, los equipos de impresión los podemos encontrar en fábricas, industrias, instituciones educativas, instituciones de investigación e inclusive para uso personal (34).

Las impresoras 3D son las que llevan a cabo el proceso, la cuales están vinculadas a un programa informático instalado en un ordenador. Los programas de modelado que se pueden utilizar son Autodesk 123D, Tinkercard, OpenSCAD, Blender, Maya, entre otros. El formato que utilizan estos programas es un formato STL. La técnica de impresión en 3D se llama deposición fundida, la cual consta de calentar un filamento del algún tipo de polímero hasta una temperatura aproximada de 215°C, en donde un dispositivo (llamado extrusor) deposita el material en capas delgadas sobre una superficie de fricción (34).

Aunque crear objetos a base de filamentos de plástico fundido parece un poco complicado, los modelos de impresoras 3D desarrollados en la industria de la impresión tienen una cierta calidad de producción y están diseñados para poder moldear los detalles de impresión más pequeños para obtener el objeto deseado. Con la ayuda de las funciones de la impresora 3D, cualquiera puede convertirse en usuario para crear objetos únicos, personalizados, copiados o restaurados. Estos modelos impresos se pueden utilizar como decoración, “herramientas” e incluso piezas de reparación (34).

### **Características del material a utilizar**

El filamento ABS, es uno de los filamentos de plástico más utilizados para la impresión 3D de electrodomésticos, automóviles y fundas de teléfonos. Se utiliza en la impresión 3D cuando se calienta entre 230°C y 260°C, por lo que es un material resistente capaz de soportar altas temperaturas, además de que es reutilizable y puede soldarse por medio de procesos químicos (35).

### **OBJETIVOS**

*Objetivo General:* Caracterizar suero fetal bovino obtenido de la industria cárnica para cultivo celular

*Objetivos particulares:*

- Elaborar un prototipo de filtrado para el suero por medio de impresión 3D.
- Obtener sangre fetal bovina de la industria cárnica.
- Separar el suero de la sangre fetal bovina por centrifugación.
- Eliminar componentes celulares por microfiltración del SFB.
- Evaluar esterilidad del SFB con caldo de soya y tripticaseína como prueba microbiológica.
- Evaluar la presencia de Mycoplasma en el SFB con medio especializado de crecimiento para mycoplasma.
- Evaluar nivel de pH del SFB con tiras reactivas para pH.
- Evaluar la osmolaridad del SFB con osmómetro.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Evaluar concentración de proteínas totales del SFB con Pierce™ BCA Protein Assay Kit de Thermoscientific.
  - Evaluar concentración de DNA por espectrofotometría.
  - Evaluar la proliferación celular con el SFB obtenido mediante MTT.

## **HIPÓTESIS**

- H0: No es posible realizar la caracterización de suero fetal bovino obtenido de la industria cárnica para su uso en el cultivo celular.
- HA: Es posible realizar la caracterización de suero fetal bovino obtenido de la industria cárnica para su uso en el cultivo celular.

## **METODOLOGÍA**

### **Tipo y diseño de estudio**

El estudio que se realizó es de tipo experimental *in vitro*, el cual, consta de obtener SFB para el cultivo celular. Para ello, se tomaron en cuenta algunos métodos de esterilización del SFB y parámetros de sueros comerciales. De los cuales, se tomaron en consideración la microfiltración, niveles de pH, osmolaridad, concentración de proteínas totales, presencia/ausencia de Mycoplasma, proliferación celular y concentración de DNA como prueba externa a los parámetros tradicionales; esperando resultados positivos. Se utilizó un SFB comercial como control.

En el caso del dispositivo de filtración, se buscó la manera de generarlo a partir de un material termo resistente y que pueda hacerse a partir de impresión 3D, el material escogido para su elaboración fue el filamento 3D ABS, que es un material que se utiliza hoy en día en una gran variedad de aplicaciones en la industria. Material generalmente muy duradero y fuerte, ligeramente flexible y bastante resistente al calor.

La caracterización de los parámetros del SFB, se medirán a través de kits comerciales y técnicas clínicas (36) en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Diagnóstico Molecular y Biomateriales.



Siguiendo los lineamientos del REGLAMENTO DE ÉTICA PARA EL USO DE ANIMALES EN LA DOCENCIA E INVESTIGACIÓN EN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES (CEADI-UAA) y siguiendo lo dictaminado por la Norma Oficial Mexicana NOM-024-ZOO-1995, “Especificaciones y características zoonosanitarias para el transporte de animales, sus productos y subproductos, productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos”. El suero fue recolectado por el personal capacitado de FREASA, posteriormente fue trasladado, en condiciones de congelamiento, a las instalaciones de Ciudad Universitaria UAA para su proceso en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Diagnóstico Molecular y Biomateriales.

**Definiciones conceptuales y operacionales.**

Variable	Descripción	Tipo de variable	Escala	Unidad de medición
Esterilidad del filtrado	El aniquilado de la mayoría o todos los microorganismos, tanto patógenos como no patógenos, incluidas sus formas esporuladas, altamente resistentes.	Dependiente	Cualitativamente al realizar pruebas microbiológicas	Si/No
Crecimiento celular (proliferación)	Es el incremento del número de células por división celular.	Dependiente	Superficie cubierta	Porcentaje (%)
Presencia de Mycoplasma	Presencia o ausencia del	Dependiente	Cualitativamente al realizar medio de cultivo	Si/No

	microorganismo tipo Mycoplasma.			
Medición de DNA	Cantidad de material genético extraído del SFB.	Dependiente	Concentración	ng/μl
Proteínas totales	Característica de la edad del animal bovino. El SFB tiene la concentración de proteína más baja de los tipos de suero bovino.	Dependiente	Concentración	g/dL
pH	El suero es parte de un entorno fisiológico que apoya la viabilidad celular. El rango de pH también confirma que el suero no ha sido adulterado.	Dependiente	Nivel	N/A
Osmolaridad	Refleja la concentración de electrolitos y solutos. Asegura que el material no se diluya.	Dependiente	Concentración	mOsm/kg

**Obtención de sangre fetal bovina**

Esta parte del proceso, fue realizada por personal capacitado de FREASA (Frigorífico y Empacadora de Aguascalientes), ubicados en Carretera Panamericana Km. 21 Tramo Ags. Zac, Unión Ganadera, 20300 San Francisco de los Romo, Ags.

La sangre fue obtenida por la técnica de punción cardiaca. Para poder conseguirla del feto, primeramente, se realiza la extracción de los componentes viscerales del bovino preñado sacrificado por el rastro, en donde se obtiene el feto y se traslada a una zona estéril dedicada a la extracción sanguínea. Cuando se proceda a la extracción, el feto debe de ser colocado en decúbito lateral derecho, dejando el lado izquierdo accesible y, además, éste debe ser limpiado con soluciones desinfectantes y antimicóticas para continuar con la punción cardiaca. El material requerido para llevar a cabo la técnica fue: una aguja, tubo vacutainer y una bolsa sanguínea de un solo uso. Retomando la técnica, se limpia en primera instancia con alcohol la zona donde se realizará la punción (entre la 2da y 3ra costilla), posteriormente, se introduce la aguja teniendo como objetivo el ventrículo izquierdo. Dependiendo la situación, podemos utilizar técnicas de masaje, gravedad o el tubo vacutainer para obtener la sangre en la bolsa de contención (Bolsa BLORECEP de 500ml ACD con Citrato Trisódico 2.20 gr, Ácido cítrico 0.80 gr, Dextrosa 2.45 gr y H<sub>2</sub>O libre de pirógenos) o tubo falcon de 30 ml, y se mantienen en una hielera en frío hasta su procesamiento.

### **Separación del suero de la sangre fetal bovina**

Obtenida la muestra sanguínea y después de haber sido trasladada al laboratorio siguiendo los lineamientos requeridos (antes de los 30-40 min transcurridos después de la toma) (37,38), se centrifugó la muestra en tubos ependorf nuevos de 2 ml a 3,000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se extrajo el suero con pipetas desechables procurando no extraer componentes sanguíneos y se colocó en tubos falco nuevos de 15 o 30 ml. Finalmente, se realizaron alícuotas de suero en tubos nuevos de 2 ml y se procedieron a resguardar a -20°C hasta el momento de su uso.

Nota: Como no toda la sangre pudo ser procesada antes de los 30-40 min después de su toma, solo se consiguió un volumen total de 10 ml de suero. El proceso de separación sanguíneo, se siguió llevando a cabo las veces necesarias hasta obtener el mayor volumen posible (aproximadamente 60 ml), éste último suero se encontraba hemolizado, por lo cual fue utilizado para la estandarización de las diferentes técnicas de medición. Por otra parte, también se obtuvo una muestra

sanguínea que tenía anticoagulante, por lo que, al momento de realizar la separación de componentes, se obtenía un componente conocido como “plasma”, el cual también fue incluido dentro de todas las pruebas definiendo así nuestros grupos de la siguiente manera:

- Suero Comercial (nuestro control)
- Suero Obtenido de la Industria Cárnica (sin anticoagulante)
- Plasma (sangre que contenía anticoagulante).

La diferencia entre plasma y suero, es efectivamente el estado en el que se realiza el método de separación de componentes sanguíneos. En el caso del suero la sangre se coagula y en el caso del plasma, esta nunca llega a coagularse.

#### **Filtración del SFB obtenido para la eliminación de componentes celulares**

La eliminación de los componentes celulares se realizó con el método de microfiltración. Para ello se utilizaron filtros de jeringa de 0.2  $\mu\text{m}$ , ya que los volúmenes utilizados eran muy pequeños. A nuestros 3 grupos se les aplicó el mismo proceso de filtración conforme se iban utilizando y eran colocados en tubos nuevos estériles de 2 ml, a los cuales se les colocaba en su folio el indicativo de “F1” para su identificación.

#### **Evaluación de esterilidad con pruebas microbiológicas**

Para las pruebas de esterilidad, se utilizó caldo de soya y tripticaseína marca Bioxon. Para ello se preparó 50 ml para la elaboración de 10 tubos de prueba de 5 ml cada uno. Se siguieron las instrucciones de acuerdo al fabricante, para lo cual se disolvió 1.5 gr del polvo en 50 ml de agua grado miliQ. Lo anterior fue a una temperatura de 75°C por 10 min. Finalmente, después del vaciado de los 5 ml en los tubos, se autoclavaron a 120 psi durante 35 min y terminado el proceso se resguardaron a 4°C hasta su uso.

La realización de la prueba de esterilidad, constó de preparar 7 tubos los cuales contenían 200  $\mu\text{l}$  de:

1. Suero comercial sin filtrar

2. Suero obtenido de la industria cárnica sin filtrar
3. Plasma sin filtrar
4. Suero comercial filtrado (F1)
5. Suero obtenido de la industria cárnica filtrado (F1)
6. Plasma filtrado (F1)
7. Control positivo (saliva)

Preparados los tubos, se metieron en la estufa bacteriológica a 37°C por 24 hrs y pasado el tiempo de incubación se tomaron resultados.

### **Evaluación de la presencia/ausencia de Mycoplasma**

La prueba de presencia/ausencia de Mycoplasma fue realizada con Mycoplasma Agar, MO660-500G de SIGMA. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se preparó 100ml de medio para 15 cajas Petri pequeñas. Se disolvieron 3.55 gr del agar en 100 ml de agua grado miliQ a 80°C durante 10 min aproximadamente, verificando que en el medio no presentara grumos. Finalmente, se realizó el vaciado del medio en las cajas dentro de la campana de flujo laminar, se rotularon, se esperó a que solidificaran y se resguardaron a 4°C hasta el momento de su uso.

Para la prueba de Mycoplasma, se sembraron 7 cajas con hisopos estériles. Las cuales constaron de lo siguiente:

1. Suero comercial sin filtrar
2. Suero obtenido de la industria cárnica sin filtrar
3. Plasma sin filtrar
4. Suero comercial filtrado (F1)
5. Suero obtenido de la industria cárnica filtrado (F1)
6. Plasma filtrado (F1)
7. Control positivo (raspadura de la epidermis facial)

Preparadas las cajas, se metieron en la estufa bacteriológica a 37°C por 24 hrs y pasado el tiempo de incubación se tomaron resultados.

## **Evaluación de pH**

La prueba para medir el pH, se elaboró con Hydrion, Plastic pH Indicators Strips. Es un método fácil de usar y rápido de medir, ya que se basa en una escala colorimétrica que es proporcionada por el mismo fabricante.

Para la medición se tomaron en cuenta los siguientes grupos:

1. Suero comercial sin filtrar
2. Suero obtenido de la industria cárnica sin filtrar
3. Plasma sin filtrar
4. Suero comercial filtrado (F1) suplementado con medio de cultivo celular DMEM.
5. Suero obtenido de la industria cárnica filtrado (F1) suplementado con medio de cultivo celular DMEM.
6. Plasma filtrado (F1) suplementado con medio de cultivo celular DMEM.

La descripción del medio de cultivo DMEM se encuentra en el apartado de prueba de proliferación. Se decidió realizar la medición de pH después de que se combinaran las muestras con el medio por el motivo de que, al preparar el medio, éste es filtrado con filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  antes de ser resguardado y utilizado.

## **Preparación de muestras en dilución para las mediciones de concentración de proteínas totales y concentración de DNA.**

De acuerdo a los diferentes kits y equipos requeridos para las mediciones, la concentración de los componentes del SFB en su totalidad, no podían ser evaluados correctamente. Por tal motivo, se decidió diluir la muestra. Se usó un factor de dilución (FD) de 32, lo que quiere decir que se diluyó la concentración del SFB 32 veces. Para obtener el valor anteriormente mencionado, se utilizó la concentración de proteínas totales como se explica a continuación:

El valor para proteínas totales del SFB comercial es de 3.3 gr/dl aproximadamente, que es igual a 33000  $\mu\text{g/ml}$ . Para poder realizar una adecuada medición con la curva de calibración del kit comercial BCA (valor máximo de concentración de 2000  $\mu\text{g/ml}$ ), se tuvo que utilizar un factor de dilución (FD) de 32.

Calculo del factor de dilución:

$$\text{Formula: } FD=CI/CF$$

Dónde: FD= Factor de dilución, CI= Concentración Inicial, CF= Concentración final.

Sustituyendo datos, y tomando en cuenta que se quiere obtener una concentración final de 1030 µg/ml, la ecuación quedaría de la siguiente manera.

$$FD= 33000 \mu\text{g/ml} / 1030 \mu\text{g/ml} = 32.03$$

Para obtener la concentración final de 1030 µg/ml, lo que se hizo fue dividir la concentración de 33000 µg/ml entre 2 en sucesión hasta llegar al valor requerido.

$$33000/2= 16500, \quad 16500/2= 8250, \quad 8250/2= 4125, \quad 4125/2= 2062.5 \quad \text{y} \\ 2062.5/2= 1031.25$$

Ya con el FD, se procedió a procesar las muestras de las pruebas de DNA y proteínas totales.

### **Evaluación de osmolaridad**

La osmolaridad fue medida en un Osmómetro automático modelo 5004, siguiendo el manual de operaciones que proporciona el fabricante. Brevemente, el protocolo constó de: conectar y calibrar el equipo, seleccionar el rango de lectura que se desea medir, colocar en un tubo ependorf 100 µl de la muestra y realizar la lectura.

La medición de osmolaridad, nos indica si alguna muestra puede estar alterada, lo anterior quiere decir: que el SFB no se haya diluido con alguna otra sustancia para vender así más volumen sin la calidad necesaria.

### **Evaluación de concentración de proteínas totales**

Se utilizó el Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ref. 23227) de ThermoScientific para la medición de proteínas totales. El ensayo de proteína BCA combina bien la reducción conocida de Cu 2+ a Cu 1+ por proteína en medio alcalino con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso (Cu 1+ ) por ácido bicinonínico (BCA) (39).

Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante. Desde la preparación del reactivo de trabajo, la preparación de las muestras y la curva de calibración.

La preparación del reactivo se basa en una fórmula ya establecida, la cual es:

$$(\# \text{ de estándar} + \# \text{ de desconocidos}) * (\# \text{ de réplicas}) * (\text{el volumen por muestra del reactivo de trabajo}) = \text{Volumen total requerido del reactivo de trabajo.}$$

De igual manera, siguiendo lo establecido por el kit comercial, se elaboró la curva de calibración utilizando lo indicado para concentración máxima de 2000 µg/ml, presentado en la siguiente tabla.

Table 1 Preparation of diluted albumin [BSA] standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20–2,000 µg/mL)			
Vial	Volume of Diluent (µL)	Volume and Source of BSA (µL)	Final BSA Concentration (µg/mL)
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0 = Blank
Dilution Scheme for Enhanced Test Tube Protocol (Working Range = 5–250 µg/mL)			
Vial	Volume of Diluent (µL)	Volume and Source of BSA (µL)	Final BSA Concentration (µg/mL)
A	700	100 of Stock	250
B	400	400 of vial A dilution	125
C	450	300 of vial B dilution	50
D	400	400 of vial C dilution	25
E	400	100 of vial D dilution	5
F	400	0	0 = Blank

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

30 January 2020

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

Tabla 3. Preparación de la albumina diluida para la curva patrón. Pierce. BCA Protein Assay Kit 23225. 2020;(2161296):0–3.

Para la preparación de las muestras para lectura en placa de 96 pocillos, se pipetearon 25µl de cada estándar o desconocido por replica en cada uno de los pocillos de la placa. Posteriormente se agregaron 200 µl del reactivo de trabajo y se llevaron a incubar a 37°C por 2 horas. Finalmente, en el lector de placas de 96 pocillos Multiskan FC (SN 357-914771) de ThermoScientific se hicieron las lecturas a 620nm y se tomaron los resultados para su posterior interpretación.



## **Evaluación de concentración de DNA**

El protocolo para medir la presencia y concentración de DNA en SFB fue el de Fenol-Cloroformo y Etanol con modificaciones, el cual está dividido en tres fases, las cuales se explican brevemente a continuación:

1.- Lisis Celular: Primeramente, se centrifuga la muestra 5 min a 270 g, en seguida se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 100 µl de PBS. Se incuba la muestra a -80°C por 30 min y se pasa al sonicador. Se aplican 20 kilohertz en 2 tandas de 10 seg para romper las células, una vez hecha la lisis, se pasan a centrifugar las muestras a 10,000 g por 20 min. Finalmente se retira el sobrenadante en un tubo ependorf estéril nuevo para proseguir con la siguiente fase.

2.- Separación de Fases: Del sobrenadante obtenido de la fase anterior, a los tubos se les agrega 250 µl de Fenol-cloroformo y se pasan a vortex continuo hasta obtener una consistencia lechosa. El siguiente paso es, llevarlos a centrifugar a 10,000 g por 5 min para finalmente observar una separación de 2 fases, de la cual, se toma la que se encuentra en la parte superior, evitando llevarse algún contaminante de la parte inferior y se procede a la siguiente fase del protocolo.

3.-Purificación del DNA: De lo que se obtuvo de la fase anterior, a las muestras le agregamos 200 µl de cloroformo y se llevan a centrifugar a 10,000 g por 10 min para obtener un sobrenadante y llevarlo a un tubo nuevo. Al sobrenadante le agregamos 1/10 de volumen de acetato de sodio al 3 molar y dos volúmenes de etanol al 100%, posteriormente, se dejan precipitando toda la noche a -80°C. Terminando la precipitación, se llevan las muestras a centrifugar a 10,000 g por 30 min a 4°C, al finalizar la centrifugación, se extrae el mayor volumen posible del sobrenadante y a lo que queda en el tubo se le agrega 100 µl de etanol al 70% y de nueva cuenta se centrifuga 10 min a 10,000 g (los 2 pasos anteriores del etanol al 70% y la centrifugación, pueden repetirse de 2 a 3 veces, ya que son lavados para limpiar el materia genético). Finalmente, se extrae el mayor sobrenadante posible y se deja evaporar el etanol restante que no se pudo retirar. Se resuspende el material genético en 100 µl de agua grado miliQ y se procede a realizar las lecturas de ácidos nucleicos en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de ThermoScientific.

## **Evaluación de la proliferación celular**

Para la prueba de proliferación celular, se utilizó un medio de cultivo DMEM bajo en glucosa que ya contenía L-Glutamina y Piruvato de sodio de la marca biowest. Además, se le agrego la solución antibiótica/antimicótica de Sigma (A5955) y finalmente se suplementó con el SFB comercial (el suero control) Sigma (F2442).

Cabe destacar que se prepararon 3 tipos de medio para esta evaluación, el anteriormente mencionado con suero comercial, y otros dos que contienen exactamente lo mismo, con la excepción de que uno estaba suplementado con el suero obtenido de la industria cárnica y el otro con plasma.

La prueba de viabilidad celular, se llevó a cabo con el método de MTT, el cual, es un protocolo que permite medir la viabilidad y proliferación celular con una escala colorimétrica. El experimento fue realizado en placas de 96 Pocillos y leídos en el lector de placas de 96 pocillos Multiskan FC (SN 357-914771) de ThermoScientific a 620 nm.

Para medir la viabilidad celular, se decidió hacer medidas a los 3, 7, 14 y 21 días para ir observando cómo iban creciendo las células en la placa. El número de células que se sembró por pocillo se obtuvo de la siguiente manera:

Preparación de la curva de calibración para lectura mínima de células que detectaba el espectrofotómetro:

- Se cultivaron en una caja de cultivo T-25 osteoblastos, de los cuales, al momento de llegar a confluencia, por el método de tripsinización, se recolectaron. Por conteo en la cámara de Neubauer (40) y siguiendo la formula  $TC/4 \times 10,000 \times FD$  (TC= total de células contadas en los 4 cuadrantes, FD= factor de dilución), se obtuvo un aproximado del número total de células, el cual fue de 2,235,000.
- Las células se resuspendieron en 1 ml de medio, del cual se tomaron 447,000 células para el pozo que contendría el mayor número de células. A partir de ese número, se hicieron diluciones al 50% para reducir la concentración celular dentro de los pozos y de esa manera poder formar la curva patrón de

detección mínima de células. Cabe mencionar, que la curva fue realizada por triplicado y a un volumen final de 200  $\mu$ l. Como dictaba el protocolo, el cálculo sería el siguiente:

$$2,235,000 - 1\text{ml} = 447,000 \text{ células} \times 3 = 1,341,000 \text{ células}$$

$$X - 0.2\text{ml}$$

Las 1,341,000 células, fueron sembradas para la realización de la curva, para la cual se utilizaron 600  $\mu$ l del mililitro del medio con osteoblastos. El volumen restante se usó para la elaboración del experimento.

Volúmenes de medio suplementado con los diferentes grupos y cantidad de células a sembrar:

- Del tubo que contenía las 2,235,000 células, solamente sobraron 400  $\mu$ l. En tubos individuales, se traspasó 1/3 del volumen del medio con células (133.33  $\mu$ l) y se centrifugaron a 900 rpm por 5 min. Terminada la centrifugación, se descartó el sobrenadante y cada tubo se resuspendió con 1 ml de los diferentes medios:
  - Medio con suero comercial.
  - Medio con suero obtenido de la industria cárnica.
  - Medio con plasma.
- Resuspendidos, se realizó la siembra de 1,000 células por pozo. Pero como la cantidad de células que había por mililitro de suero no era la misma, se calcularon los volúmenes necesarios a sembrar en cada pozo y obtener las 1,000 células.
  - Tubo con medio suplementado con SFB comercial.
$$90,000 \text{ células} - 1 \text{ ml de medio} = 0.011 \text{ ml}$$
$$1,000 \text{ células} - X$$
  - Tubo con medio suplementado con SFB obtenido de la industria cárnica.

78,250 células – 1 ml de medio = 0.012 ml

1,000 células – X

- Tubo con medio suplementado con plasma.

165,000 células – 1 ml de medio = 0.006 ml

1,000 células – X

Sembradas las 1,000 células, se prosiguió a realizar las mediciones conforme se mencionaba al principio de éste apartado. Además, como era células en proliferación, se aplicó cambio de medio cada tercer día hasta que se les realizaba la medición.

Nota: La decisión de sembrar 1,000 células por pozo, fue gracias a que la cantidad mínima de células que detectaba el espectrofotómetro era esa cuando se llevó a cabo la curva de calibración.

Ensayo de viabilidad y proliferación con MTT Assay Kit (Cell Proliferation) marca abcam:

El fundamento de la técnica se basa en el potencial redox que tienen las células de mamífero viables. Las células reducen el MTT a un producto de formazán fuertemente pigmentado, que, al ser solubilizados, pueden ser leídos por un lector de microplacas (41).

El protocolo constó de agregar 50 µl de medio libre de suero y 50 µl de la solución a cada pocillo a medir. Hecho lo anterior, se pasaron a incubar las células durante 3 horas a 37°C. Terminado el proceso de incubación, se extrajo la solución y se le agregaron 150 µl del solvente MTT en cada pozo. Colocado el solvente, se cubrió la caja con aluminio y se llevaron al shaker durante 15 min y finalmente, se realizaron las lecturas en el lector de placas de 96 pocillos a 620 nm para obtener los resultados.

## **Procedimientos de recolección de información, instrumentos a utilizar y métodos de control de calidad de datos.**

La recolección de datos para el proyecto se llevó a cabo por medio de una bitácora personal, los cuales posteriormente se transfirieron a una base de datos de Microsoft Excel como respaldo. Para un buen control en la obtención de los datos, se asignaron folios a cada uno de las pruebas realizadas por el investigador.

## **Procedimientos para garantizar los aspectos éticos en investigaciones**

Para cumplir los aspectos éticos al momento de la obtención del suero fetal, se hizo principal referencia a los capítulos primero, segundo, octavo y noveno, incluyendo todos sus artículos respectivos, del Reglamento de Ética para el Uso de Animales en la Docencia e Investigación en la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CEADI-UAA) encontrado en la Legislación Universitaria, apartado de reglamentos de aplicación general y con el código SGC: DI-PL-NO-37. Además, se siguió lo dictaminado por la NOM-024-ZOO-1995 de los Estados Unidos Mexicanos. Cabe destacar, que el investigador no tuvo contacto directo con los animales de los cuales se obtuvo el suero.

## **Conflicto de interés**

Los autores no presentaron ningún conflicto de interés para la realización de este proyecto.

## **Plan de tabulación y análisis de los resultados**

Se caracterizó el SFB y el plasma obtenido de la industria cárnica para compararlo con el SFB comercial. Después de su caracterización, se realizó la prueba de proliferación celular en placa de 96 pocillos para probar la eficacia de medios DMEM suplementados con el suero y plasma obtenidos. Además, se hicieron hasta 5 réplicas para la obtención de datos. Los osteoblastos, junto con los materiales y reactivos, fueron proporcionados por el Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Diagnóstico Molecular y Biomateriales, ubicado en la unidad Médico Didáctica de la UAA.

Para el análisis estadístico se calcularon medias, medianas, desviación estándar y se hizo prueba ANOVA de dos colas o una vía, según era el caso, con el programa estadístico R versión 4.0.3; donde se consideró un nivel de confianza del 95%.

## RESULTADOS

### Características del suero obtenido de la industria cárnica

El SFB que se obtuvo de la industria cárnica, presentó una coloración ámbar clásica de todos los SFB. De igual manera mostró un nivel de glucosa de 37 mg/dL, creatinina de 2.73 mg/dL, ácido úrico de 2 mg/dL, fósforo de 10.5 mg/dL, calcio de 16 mg/dL, albúmina 2.63 g/dL e índice aterogénico de 3.6. En la Tabla 4, se puede observar de una manera resumida los valores anteriormente mencionados junto con otros más que se incluyeron en la caracterización general.

ANALITO	VALOR DE LA MUESTRA
Color	Ámbar
Glucosa (mg/dL)	37
Creatinina (mg/dL)	2.73
Ácido úrico (mg/dL)	2.0
Fósforo (mg/dL)	10.5
Calcio (mg/dL)	16
Bilirrubina total (mg/dL)	0.8
Alanin aminotrasnferasa (TGP) (U/L)	8
Fosfatasa alcalina (ALP) (U/L)	280
Proteínas totales (g/ dL)	3.81
Albúmina (g/dL)	2.63
Hierro sérico (Ug/dL)	169
Amilasa sérica (U/L)	49
Globulina (g/dL)	1.18
Índice aterogénico	3.6

Tabla 4. Características del SFB obtenido de la industria cárnica.

Para el análisis general de estos datos, se envió una muestra de SFB al LABORATORIO DE PATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO EN SALUD ANIMAL ubicado en Av. Canal Interceptor N° 502, Col. San José del Arenal, CP 20020, Aguascalientes, Aguascalientes. El análisis aportó información relevante sobre las características generales de nuestro suero y poder verificar algunos datos como el de proteínas totales.

**Evaluación de esterilidad con pruebas microbiológicas**

Para las pruebas microbiológicas, se realizaron dos mediciones. Una al momento que se obtuvo el suero y la otra a un mes después de haberlo obtenido y resguardado a -20°C. En la Figura 2, podemos observar nuestros tres grupos en su primera medición, presentando un resultado negativo, que era lo que se estaba esperando al momento de realizar esta prueba. Las Figuras 3 y 4, muestran la segunda medición por duplicado de los grupos suero y control, en las cuales se presenta nuevamente un resultado negativo. Por otro lado, podemos observar en la Figura 5 nuestro control positivo, el cual presenta un caldo turbio por el crecimiento de microorganismos.



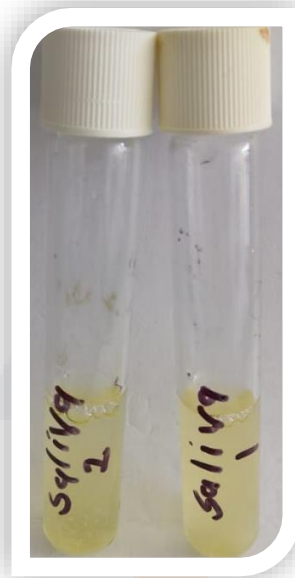
*Figura 2. Pruebas microbiológicas. Primera medición de esterilidad de los 3 grupos a evaluar.*



*Figura 3. Pruebas microbiológicas. Segunda medición de esterilidad del grupo control.*



*Figura 4. Pruebas microbiológicas. Segunda medición de esterilidad del grupo suero.*



*Figura 5. Pruebas microbiológicas. Control positivo.*

### **Evaluación de la presencia/ausencia de Mycoplasma**

Una vez realizada la incubación de 24 hrs a 37°C de los agares, se visualizaron a simple vista la presencia/ausencia de mycoplasma. En el caso de los grupos en los que el suero no se filtraba, se esperaba la presencia del microorganismo, pero se obtuvo como resultado la ausencia del mismo (Figuras 6, 7 y 8). Para el caso de los grupos con suero filtrado, no se esperaba la presencia de mycoplasma ya que desde la previa evaluación no se encontraba en nuestras muestras, y en efecto, en las Figuras 9, 10 y 11 se puede observar que no hubo presencia de ningún microorganismo. Para poder aseverar que efectivamente no hubo crecimiento de mycoplasma, en la Figura 12, podemos observar nuestro control positivo a mycoplasma, el cual fue obtenido de una muestra de raspado epitelial del investigador.



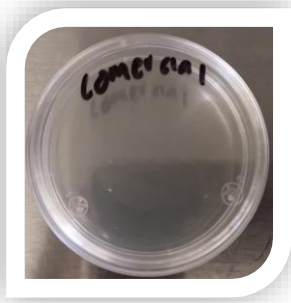


Figura 6. Mycoplasma control. Imagen del agar que muestra la ausencia de mycoplasma en el grupo control antes de filtrar.



Figura 7. Mycoplasma plasma. Imagen del agar que muestra la ausencia de mycoplasma en el grupo plasma antes de filtrar.

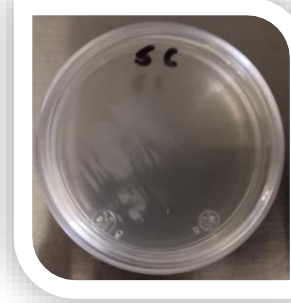


Figura 8. Mycoplasma suero. Imagen del agar que muestra la ausencia de mycoplasma en el grupo suero antes de filtrar.

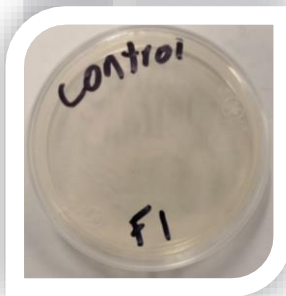


Figura 9. Mycoplasma control F1. Imagen del agar que muestra la ausencia de mycoplasma en el grupo control después de filtrar.

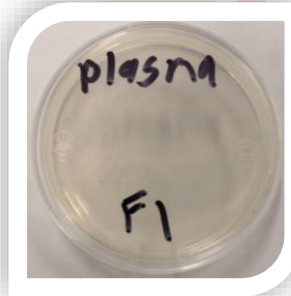


Figura 10. Mycoplasma plasma F1. Imagen del agar que muestra la ausencia de mycoplasma en el grupo plasma después de filtrar.

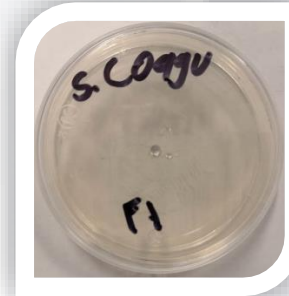


Figura 11. Mycoplasma suero F1. Imagen del agar que muestra la ausencia de mycoplasma en el grupo suero después de filtrar.

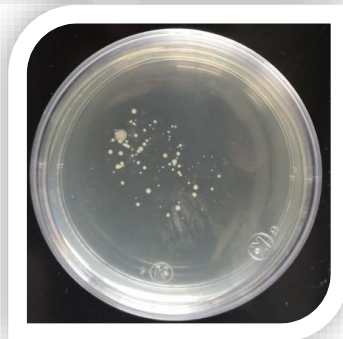


Figura 12. Control Positivo de mycoplasma.

### Concentración de DNA

La diferencia de medias de la variable concentración de DNA (ng/μl) se evaluó con ANOVA dos vías, debido a que en la Figura 13 se observa una interacción entre los factores filtración y grupos, la normalidad fue evaluada gráficamente mediante qqPlot y la homogeneidad de las varianzas mediante Levene's test. La diferencia entre grupos fue significativa con  $F=42.06$ , con 5 y 24 grados de libertad con  $p=4.167e-11$ , los factores de los grupos, filtración y la interacción de estos fue estadísticamente significativa con  $p<0.05$ . Para poder observar de una manera más visual las diferencias, observe la Figura 14.

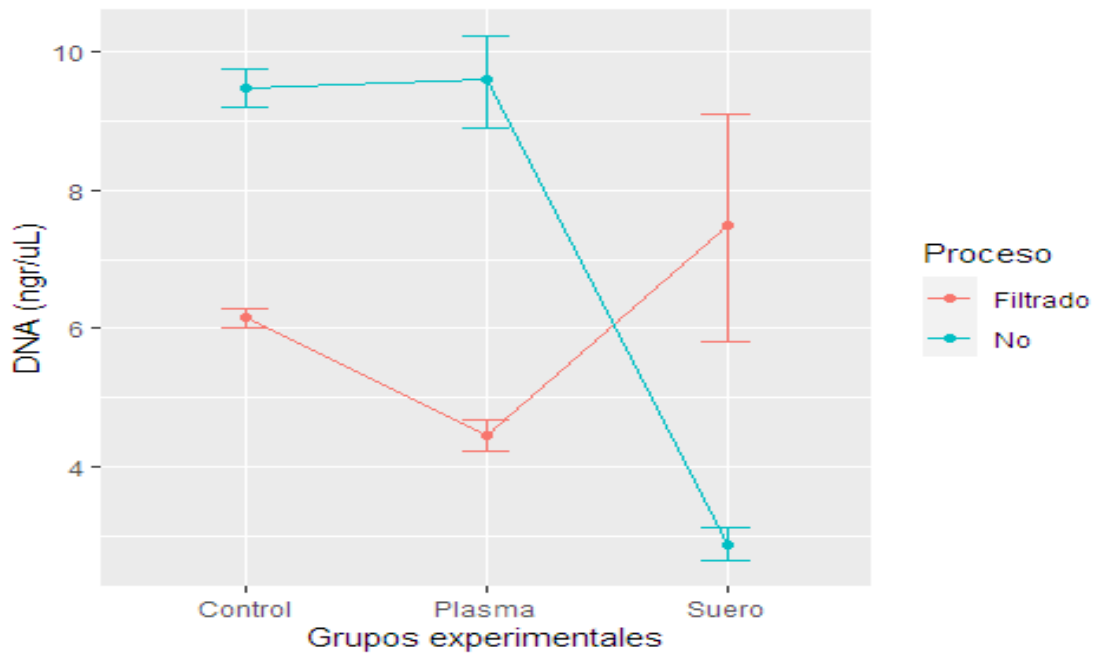


Figura 13. Interacción entre grupos DNA. La gráfica muestra la interacción que hay entre el factor grupos y el factor filtrado o no de los datos obtenidos de la concentración de DNA.

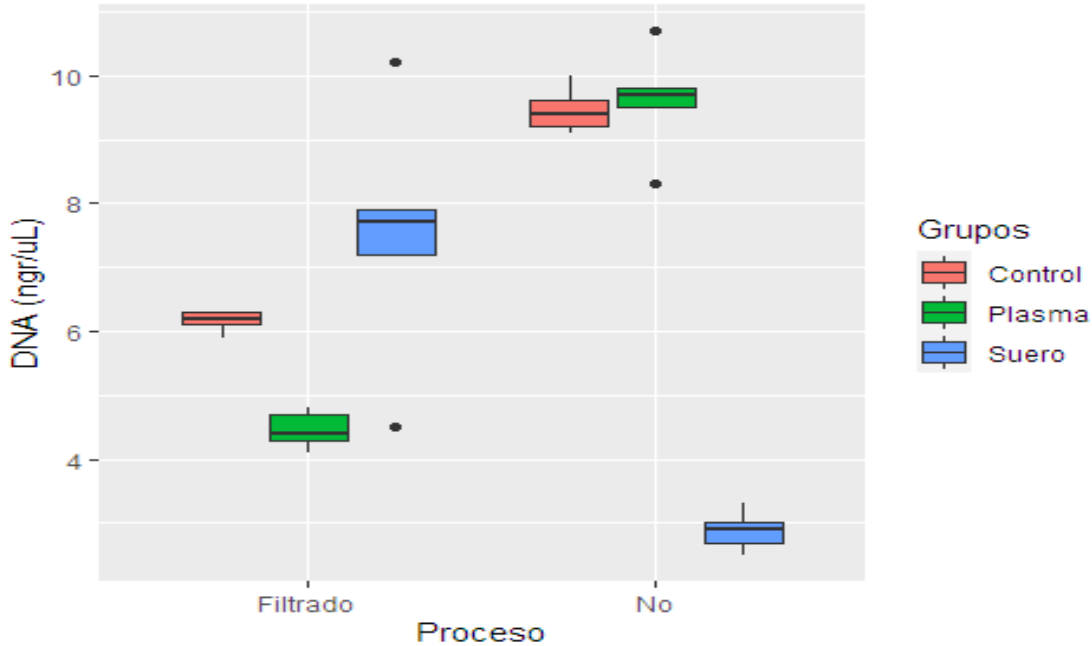


Figura 14. Qqplot, concentración de DNA. El qqplot muestra como en el apartado de filtrado, hay diferencias estadísticas entre nuestros tres grupos. En el apartado de no filtrado, no hay diferencias entre los grupos de plasma y control, pero si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos plasma/suero y suero/control.

### Concentración de proteínas totales

La diferencia de medias de la variable concentración de proteínas totales (mg/dl) se evaluó con ANOVA de una vía, debido a que en la Figura 15 se observa que no hay interacción entre los factores filtración y grupos, la normalidad fue evaluada gráficamente mediante qqPlot y la homogeneidad de las varianzas mediante Levene's test. La diferencia entre grupos fue significativa con  $F=11.95$  y  $14.61$  en el grupo del filtrado y el no filtrado respectivamente, con 2 y 12 grados de libertad en ambos grupos y con  $p=0.001396$  en el grupo de los filtrados,  $p=0.0006087$  en los no filtrados. Por lo que, la relación entre grupos y la filtración fue estadísticamente significativa con  $p<0.05$ . En la Figura 16 se puede observar de una manera visual las diferencias que hay entre los grupos y por el factor de filtración.

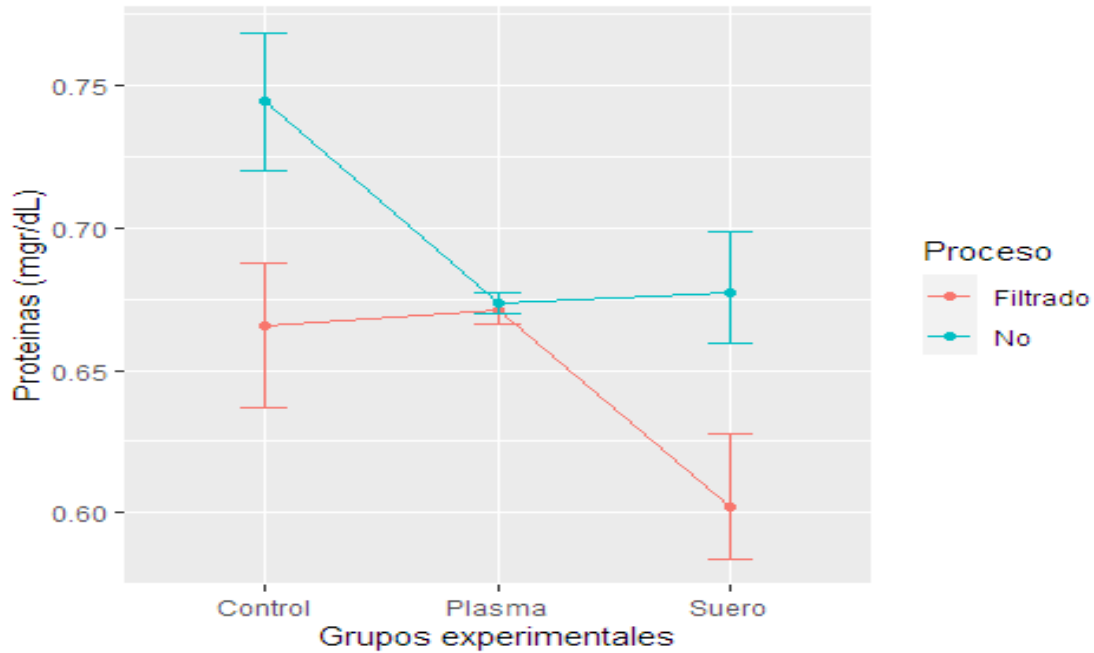


Figura 15. Interacción entre grupos Proteínas totales. La gráfica muestra la ausencia de interacción entre el factor grupos y el factor filtrado o no de los datos obtenidos de proteínas totales.

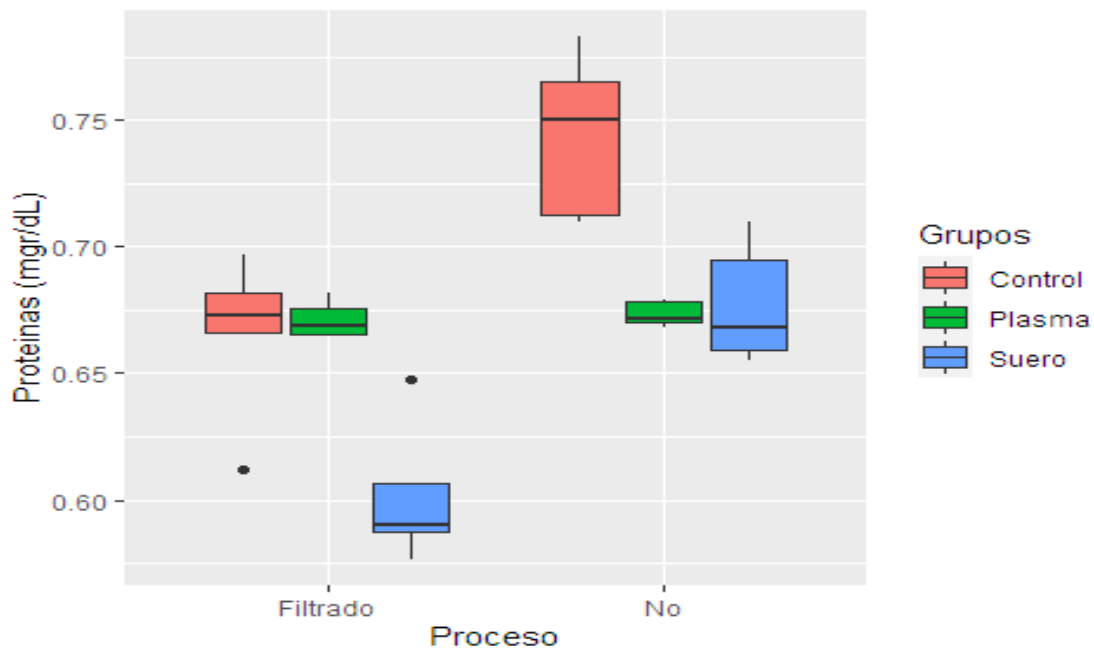
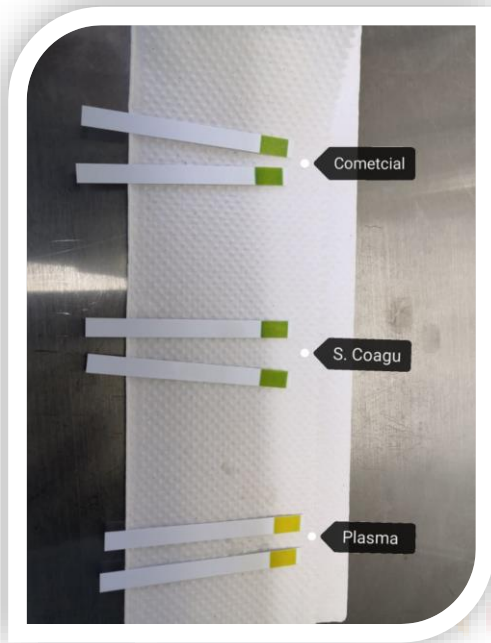


Figura 16. Qqplot, concentración de proteínas totales. El qqplot muestra como en el apartado de filtrado, hay diferencias entre el plasma/control y el suero. En el apartado de no filtrado, no hay diferencias entre los grupos de plasma y suero, pero si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos plasma/control y suero/control.

### Evaluación del pH

Como podemos observar en la Figura 17, los pH obtenidos para el grupo de muestras sin filtrar, fueron de 7.0 para el control, 7.0 para el suero y 6.0 para el plasma. En el caso del grupo de las muestras filtradas, que ya contenían medio de cultivo para su utilización en la prueba de viabilidad, los pH obtenidos fueron de 7.0 en los 3 grupos (Figura 18).



*Figura 17. pH muestra antes de filtrar. En la imagen se observan las tiras reactivas mostrando el nivel de pH de cada uno de los tres grupos antes de ser filtrados.*



*Figura 18. pH muestra después de filtrar. En la imagen se observan las tiras reactivas mostrando el nivel de pH de cada uno de los tres grupos después de suplementar medio de cultivo utilizado en las pruebas de viabilidad.*

### Osmolaridad

La diferencia de medias de la variable osmolaridad (mOsm/kg) se evaluó con ANOVA dos vías, debido a que en la Figura 19 se observa una interacción entre los factores filtración y grupos, la normalidad fue evaluada gráficamente mediante qqPlot y la homogeneidad de las varianzas mediante Levene's test. La diferencia entre grupos fue no significativa con  $F=0.923$ , con 5 y 24 grados de libertad con  $p=0.4833$ , los factores de los grupos, filtración y la interacción de estos no fue

estadísticamente significativa con  $p > 0.05$ . En la Figura 20 se puede observar de una manera visual como no hay diferencias entre grupos y el factor filtración.

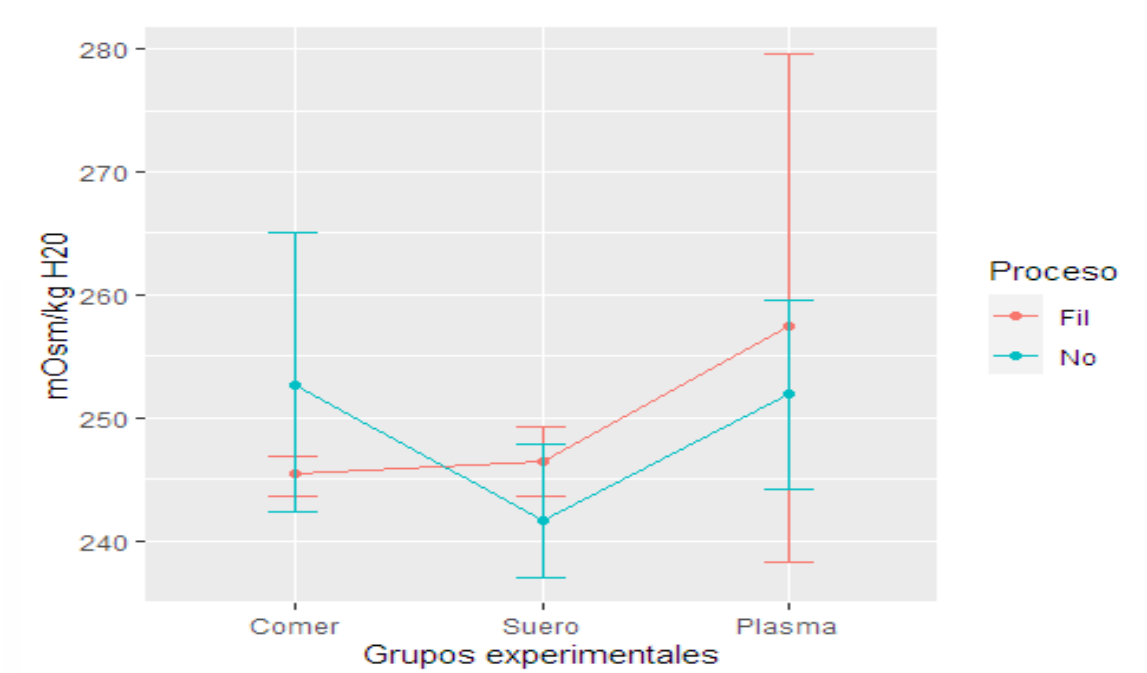


Figura 19. Interacción Osmolaridad. La gráfica muestra la interacción que hay entre el factor grupos y el factor filtrado o no de los datos obtenidos de osmolaridad.

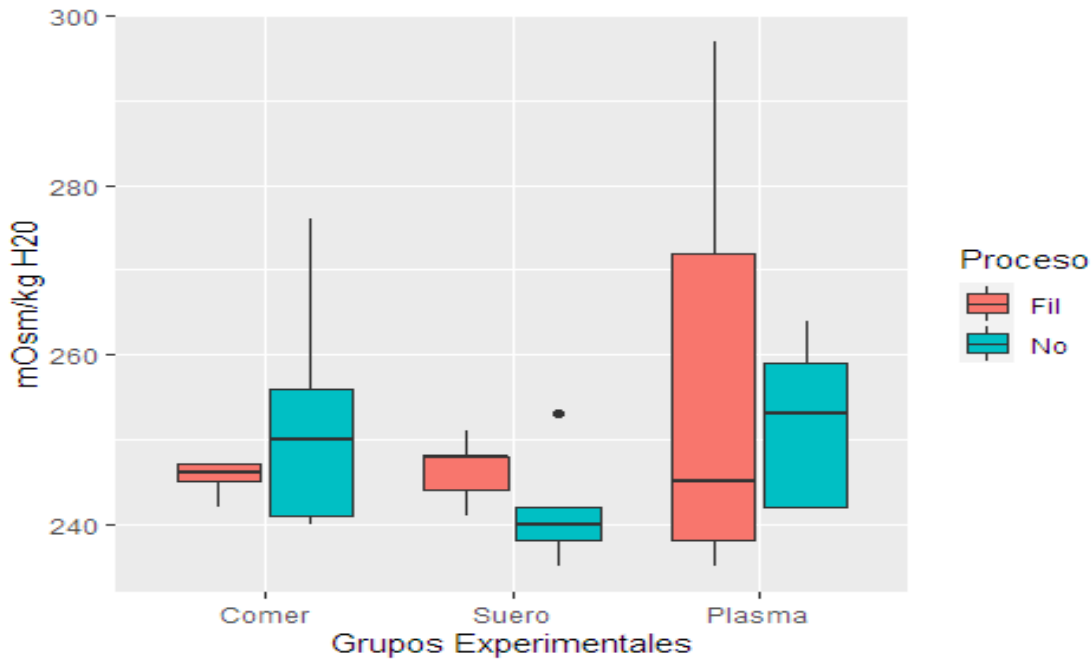


Figura 20. Qqplot, Osmolaridad. El qqplot muestra como en los tres grupos no hay diferencias significativas entre la variable de filtración.

**Viabilidad celular**

En la figura 21 se puede observar que la diferencia entre curvas de crecimiento entre los grupos experimentales fue evaluada a partir del porcentaje de viabilidad celular a través del tiempo, esta comparación se realizó mediante una Prueba de Razón de Verosimilitud con un valor de LR=0.031124 con 4 grados de libertad y un valor de p=0.999.

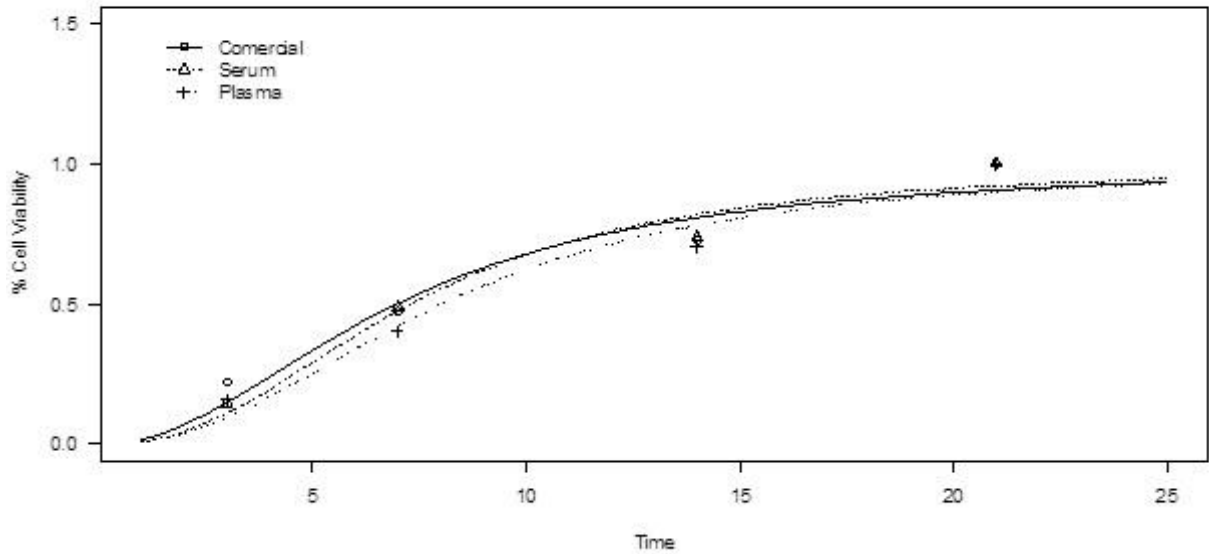


Figura 21 Curva de viabilidad celular. En la gráfica se observa como la tendencia de crecimiento (en porcentaje) de las células osteoblásticas a 21 días, es positiva. Se puede verificar de igual manera, que, en los diferentes días de medición, el porcentaje de viabilidad era casi el mismo en cada uno de los grupos.

### Dispositivo de Filtración

En el Anexo 1, podemos observar una breve descripción del prototipo de filtración que se elaboró por medio del filamento para impresión 3D ABS y sus planos dimensionales. El dispositivo se realizó buscando que el suero que se filtre a través de este, se mantenga ajeno a componentes contaminantes de la manera más eficiente posible. Brevemente, el prototipo del filtro cuenta con una posición de soporte de una jeringa de 10 mL. También cuenta con 1 orificio de recolección, donde se coloca el extremo de salida de los filtros desechables. Los filtros se aseguran a las jeringas por medio de un mecanismo de “cuerda” como se muestra en la Figura 22, evitando que haya espacio para una posible contaminación. Además, cuenta con un orificio lateral que permite la utilización de bombas de vacío para que por presión negativa se filtre todo el contenido de la jeringa. Finalmente, el dispositivo cuenta con una adaptación de rosca o “cuerda” para que se pueda fijar en el recipiente de recolección, permitiendo un sellado completo y poder utilizar la bomba de vacío para realizar el proceso de filtrado. En la Figura 23, podemos



observar una visión general de como es el dispositivo con el recipiente de recolección y desconectado de la bomba de vacío.



*Figura 22. Visualización de la jeringa y el filtro desechable, unidos por el sistema de rosca o cuerda.*



*Figura 23. Visualización del dispositivo de filtración. Se observa como da soporte a la jeringa que ya cuenta con su filtro y está lista para el proceso de filtrado.*

## DISCUSIÓN

El objetivo de este proyecto fue la caracterización de SFB obtenido de la industria cárnica para su uso en cultivo celular y compararlo con un SFB comercializado. Como ya se sabe, el ganado mexicano es apto para la obtención y producción del mismo, ya que México está libre de las principales enfermedades cuarentenarias desde su nombramiento en 2016 hasta fecha (42–44).

Se sabe que la sangre para producir éste reactivo tiene que ser de fetos, es obtenida por punción cardíaca para evitar riesgos de contaminación y debe de ser tomada por personal altamente capacitado (21). La principal razón para obtener la muestra a partir de esa etapa gestacional es porque el feto se encuentra dentro de la madre; está protegido por la conocida “barrera placentaria”, que es una barrera natural que defiende al organismo en desarrollo de cualquier tipo de infección (45). Otro aspecto que ayuda a la defensa del feto es que en el momento de la fecundación y el óvulo llega a la etapa de implantación en el útero, la mayoría de los procesos de señalización para que este proceso se lleve a cabo son de inflamación, lo que significa que las células inmunitarias siempre están presentes en todo momento,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

umentando las defensas frente a los contaminantes; lo que confirma que la obtención de suero de fetos para cultivo celular es efectivamente la mejor opción (46).

Otra de las pruebas que se llevó a cabo en el proyecto, fue la medición de la osmolaridad. La osmolaridad es una de las pruebas de mayor importancia por debajo de las pruebas de esterilidad. La prueba mide la concentración de solutos nutritivos que tienen los reactivos. El mantener los niveles adecuados (dentro de los estándares) es de vital importancia ya que el presentar los niveles adecuados permite a las células del cultivo celular crecer de manera rápida y constante, además de evitar malformaciones morfológicas por falta de nutrientes. Tal es el caso de Escorcía y Caballero 2019 (47) y Escorcía, Vergara y Díaz Caballero (2018) (48) en donde experimentan con diferentes concentraciones de SFB para ver la proliferación celular de dos tipos de células bucales. Observan como bajas concentraciones de lo que normalmente se utiliza (suplementación al 10% de SFB), influyen enormemente en el crecimiento y desarrollo de las células, incluso llegan a provocar cambios morfológicos en ellas. Por eso, es pertinente tener un suero con su concentración establecida (260 – 340 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O) ya que, si una baja o nula suplementación de SFB afecta directamente a las células, hay que imaginarse que daño causaría un SFB que no contenga las concentraciones adecuadas.

Si se observan los resultados, sobre todo enfocándose en la prueba final de viabilidad celular, se puede observar que, en los 3 grupos a 21 días de crecimiento, mantienen el mismo porcentaje de viabilidad. Dicho esto, se puede suponer que el plasma podría usarse para complementar los medios de cultivo. Aunque en realidad no sería correcto en lo absoluto.

El problema es el fibrinógeno. El fibrinógeno es un zimógeno, el cual es un precursor enzimático inactivo que participa principalmente en la cascada de coagulación, su función primordial es la de formación de fibrina para la formación del coagulo que “tapa” el vaso sanguíneo lesionado. Es conocido también como una proenzima que no requiere de un activador proteico como tal, sino que simplemente con un cambio bioquímico en el medio puede ser activado. Pero el fibrinógeno, no solamente tiene

esa función, también interviene en procesos como la distribución, adhesión y señalización plaquetaria, proliferación de fibroblastos y células endoteliales, cicatrización y respuesta inflamatoria; además, es capaz de unirse a proteínas como fibronectina (facilitando su incorporación a la matriz extracelular), factores de crecimiento para fibroblastos (FDF-2,  $\beta$ -FGF) y endotelio vascular (VEDF) que estimulan la angiogénesis, y la interleucina-1 $\beta$  que interviene en inflamación, por lo que, es una proenzima de amplio campo de acción (49). Es por eso que el suero sigue siendo la mejor opción para suplementar medios de cultivo a comparación del plasma.

Finalmente, se encontraron diferencias significativas en algunas de las pruebas de caracterización realizadas, pero nótese que en la prueba de viabilidad ninguno de los datos tiene un efecto significativo al suplementar el medio de cultivo con suero el obtenido de la industria cárnica. Por lo tanto, aunque el proyecto solamente está centrado en una primera etapa de caracterización, se puede sugerir que el suero obtenido puede ser utilizado en cultivos celulares.

## **CONCLUSIONES**

- De acuerdo con los resultados, podemos concluir que el suero obtenido de la industria cárnica no mostró diferencias significativas en los aspectos de manutención y proliferación celular en comparación con el suero comercial.
- Si no se tiene a disposición SFB, el plasma podría utilizarse en casos de emergencia como sustituto para mantener ciertos cultivos celulares.
- Si se obtiene un SFB en condiciones asépticas desde la obtención en el rastro, hasta su procesamiento en el laboratorio, éste puede ser utilizado para suplementar medio de cultivo para cultivos celulares.

## **PROSPECTOS FUTUROS PARA EL PROYECTO**

Primeramente, lo que sigue por realizar de este proyecto, son las pruebas faltantes de detección viral exigidas por la ISIA. Lo anterior, permitirá que el suero elaborado sea acreditado para su distribución a nivel nacional e internacional. Por otro lado,

terminar las modificaciones pertinentes del dispositivo de filtración, con el objetivo de escalar el volumen del suero a procesar. Finalmente, teniendo estandarizado los procesos para la obtención del SFB, realizar un estudio de mercado que permita la verificación de costos de producción y mercado, que permitan culminar con el posible nacimiento de una pequeña empresa que pueda dedicarse a la producción de este reactivo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro MM, Herrero Martinez E. Desarrollo de las Técnicas de Cultivos Celulares. Esc gestión Sanit [Internet]. 2014;1(1):0–71. Available from: <https://www.formacionegs.com/archivos/1325673989.pdf>
2. Hudu SA, Alshrari AS, Syahida A, Sekawi Z. Cell culture, technology: Enhancing the culture of diagnosing human diseases. J Clin Diagnostic Res. 2016;10(3):DE01–5.
3. Calvo-castro LA, Guerrero-barrantes M. Cultivo in vitro de autoinjertos epiteliales para el tratamiento de lesiones en la piel. Rev Tecnol en Marcha Ing Tejidos. 2015;28(5):33–45.
4. Beltrán Vargas NE, González de la Rosa CH. TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA DE TEJIDOS. Universidad Autónoma Metropolitana, editor. México: Cuajimalpa de Morelos; 2016. 198 p.
5. Saragih J, Shilkrot R, Lélis Baggio D, Emami S, Millán Escrivá D, Ievgen K, et al. ATCC ® ANIMAL CELL CULTURE GUIDE tips and techniques for continuous cell lines [Internet]. Vol. 11, ORDER. 2011 [cited 2020 Mar 19]. Available from: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)
6. Brindley DA, Davie NL, Culme-Seymour EJ, Mason C, Smith DW, Rowley JA. Peak serum: Implications of serum supply for cell therapy manufacturing. Regen Med. 2012;7(1):7–13.
7. van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. ALTEX. 2018;35(1):99–118.

8. Hodgson J. To Treat or Not to Treat: That Is the Question for Serum. *Nat Biotechnol.* 1995;13(4):334–7.
9. Berg D. Traceability Overview [Internet]. 2009 [cited 2020 Mar 19]. Available from: <https://www.serumindustry.org/traceability/traceability-overview/>
10. Versteegen R. Serum: What, When, and Where? *BioProcessing* [Internet]. 2016;15(1):18–21. Available from: <https://bioprocessingjournal.com/index.php/article-downloads/708-j151-serum-what-when-and-where>
11. Siegel W, Foster L. Fetal Bovine Serum: The Impact of Geography. *BioProcessing* [Internet]. 2013;12(3):28–30. Available from: <https://bioprocessingjournal.com/index.php/article-downloads/540-j123-fetal-bovine-serum-the-impact-of-geography>
12. Vera A. VJ, Parra A. JL, Ramírez N. GC, Villamil LC. El virus de la D.V.B. como agente contaminante en cultivo de tejidos animales. *Biomédica.* 1992;12(1):10–4.
13. Tavira CA, Ortega A, Dávila I, Estrada S, Meneses A. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica *Animal cell culture in pharmaceutical biotechnology : research and perspectives.* *Rev Mex Ciencias Farm* [Internet]. 2009;40(4):35–46. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/237036855\\_Alcances\\_y\\_perspectivas\\_del\\_cultivo\\_de\\_celulas\\_animales\\_en\\_la\\_biotecnologia\\_farmaceutica](https://www.researchgate.net/publication/237036855_Alcances_y_perspectivas_del_cultivo_de_celulas_animales_en_la_biotecnologia_farmaceutica)
14. Miceli DC, Abate CM, Winik BC, Valdecantos PA, Rodán Olarte M, Estévez MC, et al. Introducción Al Cultivo Celular. In: *Conceptos teoricos y practicos para el estudio de celulas y biomoleculas* [Internet]. 1st ed. San Miguel, Tucumán: CONICET; 2008. p. 55–80. Available from: [http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo\\_celular.pdf](http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf)
15. Willmer EN. *Cells and Tissues in Culture: Methods, Biology, and Physiology* [Internet]. 1st ed. Vol. 1, *The Quarterly Review of Biology.* London:

ACADEMIC PRESS INC; 1967 [cited 2020 Mar 19]. 21–28 p. Available from: [https://books.google.com.mx/books?id=GyflBAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=GyflBAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

16. Van Der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol Vitro*. 2004;18(1):1–12.
17. Conceptos básicos de FBS | Thermo Fisher Scientific - MX [Internet]. [cited 2020 Mar 31]. Available from: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment/culture-media/fbs-basics.html>
18. Gibco FBS - ISIA Traceability Certified and Fingerprinting Origin Guarantee | Thermo Fisher Scientific - MX [Internet]. [cited 2022 Apr 2]. Available from: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs/gibco-fbs-isia-traceability-certified-and-fingerprinting-origin-guarantee.html>
19. Nielsen OB, Hawkes P. Fetal Bovine Serum and the Slaughter of Pregnant Cows: Animal Welfare and Ethics. *Bioprocess J*. 2019;18:1–4.
20. Smolko EE, Lombardo JH, Degiorgi CF, Quattrini D, Michelin S. Sera Radiosterilization : Studies. 1995;45(2):275–81.
21. Jochems CEA, Van der Valk JBF, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem? *ATLA Altern to Lab Anim*. 2002;30(2):219–27.
22. Hernández Navarrete MJ, Celorrio Pascual JM, Lapresta Moros C, Solano Bernad VM. Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clínica*, ELSEVIER [Internet]. 2014;32(10):681–8. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-fundamentos-antisepsia-desinfeccion-esterilizacion-S0213005X14001839>

23. Organización Mundial de la Salud. MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO. Vol. 3, MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO. 2004. 181 p.
24. Eskes C, Boström AC, Bowe G, Coecke S, Hartung T, Hendriks G, et al. Good cell culture practices & in vitro toxicology. Toxicol Vitr [Internet]. 2017;45(March):272–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.022>
25. Problemas comunes del cultivo celular | Contaminación del cultivo celular | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2021 May 27]. Available from: <https://www.sigmapaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-culture/cell-culture-troubleshooting-contamination.html>
26. Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of mycoplasma contamination in cell culture [Internet]. Vol. 13, Cell Journal. 2012 [cited 2021 May 27]. p. 203–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3584481/>
27. Karatayli E, Altunoğlu YÇ, Karatayli SC, Yurdaydin C, Bozdayi AM. Free circulating nucleic acids in plasma and serum as a novel approach to the use of internal controls in real time PCR based detection. J Virol Methods. 2014;207:133–7.
28. Lo YMD. Circulating nucleic acids in plasma and serum: An overview. Ann N Y Acad Sci. 2001;945:1–7.
29. Pérez-garcía R, García R, Gonzalez E, Solozábal C, Ramírez R, Martín-rabadán P, et al. Guía de gestión de calidad del líquido de diálisis (LD). GUIAS Clin Y Doc CONSENSO LA SEN [Internet]. 2016;36(3):217–332. Available from: <https://www.revistanefrologia.com/es-guia-gestion-calidad-del-liquido-articulo-S0211699516000047>
30. Chulluncuy CNC. Tratamiento de agua para consumo humano. Ing Ind [Internet]. 2011;29:153–224. Available from:

[https://revistas.ulima.edu.pe/index.php/Ingenieria\\_industrial/article/view/232](https://revistas.ulima.edu.pe/index.php/Ingenieria_industrial/article/view/232)

31. Minnesota Rural Water Association. Chapter19: Membrane Filtration. Minnesota Water Work Oper Man [Internet]. 2001;1–12. Available from: <http://www.mrwa.com/WaterWorksMnl/Chapter 19 Membrane Filtration.pdf>
32. Guizard C. TECNICAS MEMBRANARIAS de FILTRACION de LIQUIDOS Microfiltracion – Ultrafiltracion – Nanofiltracion – Osmosis inversa. Módulo enseñanza en fenómenos interfaciales [Internet]. 1999;2(1):56. Available from: <https://es.firp-ula.org/wp-content/uploads/2019/07/S451B.pdf>
33. Corning®. Corning Filtration Guide: Innovative Products for Filtration and Ultrafiltration. Tech Notes [Internet]. 2011;1:20. Available from: [https://www.corning.com/catalog/cls/documents/selection-guides/t\\_filterselectionguide.pdf](https://www.corning.com/catalog/cls/documents/selection-guides/t_filterselectionguide.pdf)
34. Prado A, Arellano B, López M, Bandala S. Metodología de la impresión tridimensional: Modelado de Deposición Fundida (FDM). 2016;(December). Available from: [https://www.researchgate.net/publication/310160907\\_Metodologia\\_de\\_la\\_impresion\\_tridimensional\\_Modelado\\_de\\_Deposicion\\_Fundida\\_FDM](https://www.researchgate.net/publication/310160907_Metodologia_de_la_impresion_tridimensional_Modelado_de_Deposicion_Fundida_FDM)
35. Guía completa: plásticos en la impresión 3D - 3Dnatives [Internet]. [cited 2020 Apr 1]. Available from: <https://www.3dnatives.com/es/plasticos-impresion-3d-22072015/>
36. Velázquez Salgado R. MANUAL DE PRÁCTICAS BIOQUÍMICA CLÍNICA. Bioquim Clin [Internet]. 2009;(Clave 1807):160. Available from: <https://bioquimica.quimica.unam.mx/wp-content/uploads/2021/06/1807-Bioquímica-clínica-Manual.pdf>
37. Elliott P, Peakman TC. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. Int J Epidemiol. 2008;37(2):234–44.
38. Fontél KS, Bøtner A, Belsham GJ, Lohse L. Diagnostic comparison of serum



and EDTA-stabilized blood samples for the detection of foot-and-mouth disease virus RNA by RT-qPCR. J Virol Methods [Internet]. 2019;270(March):120–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.05.003>

39. ThermoFisher Scientific. BCA Protein Assay Kit 23225. User Guid [Internet]. 2020;(2161296):1–13. Available from: [https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html?ef\\_id=Cj0KCQjw6J-SBhCrARIsAH0yMZgk0zxt97qr6PH2NLNNbp3mq6k2fD4DeYa8WTjo3xDo1qrT3wwMM4YaApJkEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!53](https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html?ef_id=Cj0KCQjw6J-SBhCrARIsAH0yMZgk0zxt97qr6PH2NLNNbp3mq6k2fD4DeYa8WTjo3xDo1qrT3wwMM4YaApJkEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!53)
40. Bastidas O. Conteo Celular con Hematocitómetro. Tech Note-Neubauer Chamb Cell Count [Internet]. 2011;1–6. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Dr\\_Majid\\_Azizi/post/How\\_can\\_I\\_measure\\_the\\_amount\\_of\\_cells\\_in\\_a\\_solution\\_with\\_filamentous\\_fungi/attachment/59d625bfc49f478072e9a7c0/AS%3A272167168610329%401441901117902/download/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Dr_Majid_Azizi/post/How_can_I_measure_the_amount_of_cells_in_a_solution_with_filamentous_fungi/attachment/59d625bfc49f478072e9a7c0/AS%3A272167168610329%401441901117902/download/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf)
41. ThermoFisher Scientific. CyQUANT™ MTT Cell Viability Assay [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 6]. p. 1–3. Available from: [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V13154?ef\\_id=CjwKCAiAhreNBhAYEiwAFGGKPGbSUSGs0XHhVodkzoMHC3Rriki0i46NVliBXx04ebotJAWZYAqB3hoC5nkQAvD\\_BwE:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!472740161496!p!!g!!mtt&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_gaw](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V13154?ef_id=CjwKCAiAhreNBhAYEiwAFGGKPGbSUSGs0XHhVodkzoMHC3Rriki0i46NVliBXx04ebotJAWZYAqB3hoC5nkQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!472740161496!p!!g!!mtt&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw)
42. ¿A qué nos referimos con estatus sanitario? | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx [Internet]. [cited 2021 Dec 6]. Available from: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/a-que-nos-referimos-con-estatus-sanitario>
43. Servicio Nacional de Sanidad I y CA. México entre los países libres de las enfermedades cuarentenarias más importantes de rumiantes:OIE [Internet].

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria | Gobierno  
| gov.mx. 2016 [cited 2020 Nov 4]. Available from:  
<https://www.gob.mx/senasica/prensa/mexico-entre-los-paises-libres-de-las-enfermedades-cuarentenarias-mas-importantes-de-rumiantes-oie>

44. Estatus Sanitario Oficial - OIE - Organizacion Mundial de Sanidad Animal [Internet]. [cited 2021 Dec 6]. Available from: <https://www.oie.int/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/estatus-sanitario-oficial/>
45. Purizaca Benites M. La placenta y la barrera placentaria. Rev Peru Ginecol y Obstet. 2015;54(4):270–8.
46. Salazar Torres L, Ávila Gamboa D. Inmunología perinatal. Femina [Internet]. 2014;42(4):185–92. Available from: <http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2014/v42n4/a4591.pdf>
47. Simancas Escorcía V, Díaz Caballero A. Impacto de la concentración de suero fetal bovino sobre las células epiteliales dentales. Entramado [Internet]. 2019 Jan 10;15(1):276–84. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1900-38032019000100276](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-38032019000100276)
48. Simancas-Escorcía V, Vergara Hernández C, Díaz-Caballero A. Influencia del suero fetal bovino en el cultivo de fibroblastos gingivales. Av Odontoestomatol [Internet]. 2018;34(6):299–309. Available from: <http://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v34n6/0213-1285-odonto-34-6-299.pdf>
49. Malagón D, Cardozo C, Godoy R. Uso de fibrinógeno humano en la generación de soportes para la obtención de equivalentes tisulares. Rev Colomb Biotecnol [Internet]. 2011;13(2):243–53. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/28029>

**ANEXOS**

**Anexo 1: Dispositivo de filtración obtenido por la impresión 3D.**

El dispositivo fue creado por medio de impresión 3D con filamento ABS, éste permite sostener 1 jeringa de 10 ml con su propio filtro. El dispositivo está hecho de tal forma que provoca un sellado total entre el mismo filtro y el recipiente de recolección, lo que permite filtrar el suero contenido en las jeringas por medio de una bomba de vacío y ser recolectado de una manera sencilla y rápida.

